



Untersuchung zur zellulären Funktion von Ataxin-2

Diplomarbeit von
Lina-Mareike Milbrand

Angefertigt am
Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin
Abteilung Vertebrate Genomics, Prof. Dr. Hans Lehrach
Arbeitsgruppe Dr. Sylvia Krobitch

Eingereicht am Fachbereich Biochemie,
der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Gutachter

Prof. Dr. H. Lerach

Prof. Dr. R. Walther

Kandidat

Lina-Mareike Milbrand

Eigenständigkeitserklärung gemäß PO Biochemie § 33 Abs. 1

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit „Untersuchung zur zellulären Funktion von Ataxin-2“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Berlin, den 18. August 2008

Lina-Mareike Milbrand

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Polyglutaminerkrankungen	1
1.2	Spinozerebellare Ataxie Typ 2	2
1.3	Aufbau und Funktion des Ataxin-2-Proteins	4
1.4	Ataxin-2 beeinflusst die Pathogenität anderer Polyglutaminerkrankungen	6
1.5	Zielsetzung	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Material	9
2.1.1	Chemikalien	9
2.1.2	Lösungen	11
2.1.3	Bakterienstamm und Medien	13
2.1.4	Hefestamm und Medien	13
2.1.5	Zelllinie und Medien	14
2.1.6	Antikörper	15
2.1.7	Plasmide	16
2.1.8	DNA- und Proteinstandards	18
2.2	Methoden	18
2.2.1	Plasmidpräparation	18
2.2.2	Bestimmung der DNA-Konzentration	19
2.2.3	Agarose-Gelelektrophorese	19
2.2.4	Zellkultivierung	19
2.2.5	Transfektion von Säugerzellen	20
2.2.6	Transfektion von Säugerzellen mit siRNA	20
2.2.7	Zelllyse	20
2.2.8	Proteinbestimmung	21
2.2.9	Koimmunopräzipitation	21
2.2.10	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	21
2.2.11	Proteintransfer auf eine Membran	21
2.2.12	Immunologischer Nachweis von Proteinen	22
2.2.13	Immunfluoreszenzmikroskopie	22
2.2.14	Yeast-Two-Hybrid-Analysen	22

3	Ergebnisse	25
3.1	Die Interaktion von Ataxin-2 und Crm1	25
3.1.1	Nachweis der Interaktion zwischen Ataxin-2 und Crm1 mittels Koimmunopräzipitation	25
3.1.2	Studien zur zellulären Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2	27
3.1.3	Studien zur zellulären Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2 unter oxidativem Stress	27
3.1.4	Einfluss von Leptomycin B auf die zelluläre Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2	29
3.1.5	RNAi-Experimente mit Ataxin-2	32
3.1.6	RNAi-Experimente mit Crm1	37
3.2	Die zelluläre Lokalisation von Ataxin-2	42
3.2.1	Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Ataxin-1-Proteins	42
3.2.2	Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Ataxin-7-Proteins	46
3.2.3	Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Huntingtin-Proteins	48
3.2.4	Blockieren des Crm1-abhängigen Kernexports mit Leptomycin B	52
3.2.5	Die Bildung von Stress Granules unter oxidativem Stress	55
4	Diskussion	61
	Abbildungsverzeichnis	65
	Tabellenverzeichnis	67
	Literaturverzeichnis	69

1 Einleitung

1.1 Polyglutaminerkrankungen

Polyglutaminerkrankungen sind dominant vererbte, neurodegenerative Krankheiten, welche zur Familie der Trinukleotiderkrankungen gehören. Diese Familie von Erkrankungen zeichnet sich dadurch aus, dass eine Expansion von Basentriplettwiederholungen innerhalb eines Gens aus und wird in zwei Klassen eingeteilt. Bei Erkrankungen der ersten Klasse befindet sich die Trinukleotidexpansion im kodierenden Bereich des Gens; zu dieser Klasse gehört die Familie der Polyglutaminerkrankungen. In der zweiten Klasse befindet sich die Trinukleotidexpansion im nicht-kodierenden Bereich des Gens; zu dieser Klasse gehören zum Beispiel die spinocerebellare Ataxie Typ 8 und das fragile X-Syndrom [RH97].

Die Familie der Polyglutaminerkrankungen umfasst die Erkrankungen Chorea Huntington (HD), spinobulbäre Muskelatrophie, dentatorubrale phallidolusysiane Atrophie (DRPLA) und die SCA-Erkrankungen 1, 2, 3, 6, 7 und 17 (siehe Tabelle 1.1). Ursache für diese Erkrankungen, die meist im mittleren Lebensalter von 30-60 Jahren auftreten, ist eine Expansion von Wiederholungen des Triplets CAG in den die Krankheit verursachenden Genen, welches für die Aminosäure Glutamin in den Genprodukten kodiert. Gene von gesunden Individuen weisen einen gewissen Grad an Polymorphie bezüglich der Anzahl der CAG-Wiederholungen auf. Wird eine bestimmte Anzahl von CAG-Wiederholungen im Gen überschritten, kommt es zum Ausbruch der Erkrankung, wobei die Schwere mit dem Grad der Expansion der CAG-Wiederholungen zunimmt. Tendenziell nimmt der Grad der CAG-Expansion von einer zur nächsten Generation zu, was zu einem früheren und verstärkten Auftreten der Symptome führt. Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet [RH97].

Tabelle 1.1: Übersicht über die Familie der Polyglutaminerkrankungen: $n(W) \equiv$ Anzahl der aufeinanderfolgenden Glutamine beim Wildtyp, $n(P) \equiv$ Anzahl der aufeinanderfolgenden Glutamine beim pathogenen Typ [BB06].

Krankheit	Kürzel	Protein	$n(W)$	$n(P)$
Chorea Huntington	HD	Huntingtin	6-35	36-200
Spinocerebellare Ataxie Typ 1	SCA1	Ataxin-1	6-39	40-82
Spinocerebellare Ataxie Typ 2	SCA2	Ataxin-2	15-24	32-200

Tabelle 1.1: Übersicht über die Familie der Polyglutaminerkrankungen (Fortsetzung): $n(W) \equiv$ Anzahl der aufeinanderfolgenden Glutamine beim Wildtyp, $n(P) \equiv$ Anzahl der aufeinanderfolgenden Glutamine beim pathogenen Typ [BB06].

Krankheit	Kürzel	Protein	$n(W)$	$n(P)$
Spinozerebellare Ataxie Typ 3 (Machado-Joseph Disease)	SCA3 (MJD)	Ataxin-3	16-36	61-84
Spinozerebellare Ataxie Typ 6	SCA6	P/Q Kalziumkanal	4-20	20-29
Spinozerebellare Ataxie Typ 7	SCA7	Ataxin-7	4-35	37-306
Spinozerebellare Ataxie Typ 17	SCA17	TATA-Box Bindeprotein (TFIID)	25-42	47-63
Dentatorubrale phallidoluysiane Atrophie	DRPLA	Atrophin-1	7-34	49-88
Spinale und bulbuläre muskuläre Atrophie	SBMA	Androgenrezeptor	9-36	38-62

Zudem führt die Verlängerung des CAG-Trinukleotidbereichs zu einer Instabilität des expandierten Allels. Die Instabilität des Allels tritt auch in der Keimbahn auf und führt mit einer Wahrscheinlichkeit von fast 100 % zu einer veränderten Anzahl an CAG-Wiederholungen bei den Nachkommen [RH97, SBS⁺04, Har82].

1.2 Spinozerebellare Ataxie Typ 2

Wie bereits erwähnt, gehört die spinozerebellare Ataxie Typ 2 (SCA2) zu den Polyglutaminerkrankungen und wird autosomal-dominant vererbt. Das klinische Bild von SCA2 wurde erstmals 1971 in Indien beschrieben [WS71]. Weltweit gehört SCA2 zu den drei häufigsten Typen von autosomal, dominant vererbten SCA-Erkrankungen [LBRA08]. In Deutschland werden 27% aller autosomal, dominant vererbten Ataxien als SCA2 diagnostiziert.

Ursächlich für die Erkrankung ist eine Expansion des Triplets CAG im sogenannten SCA2-Gen, welches erstmals 1996 identifiziert und kloniert wurde [ISY⁺96, PNN⁺96, STI⁺96]. Dieses Gen ist auf Chromosom 12 lokalisiert und besteht aus 25 Exons. Im SCA2-Gen kommen 22 CAG-Wiederholungen am 5'-Ende des Gens vor. Dieser Bereich wird durch 2 CAA-Codons unterbrochen. Man geht davon aus, dass die CAA-Unterbrechungen für eine Stabilisierung des Gens bei der Vererbung sorgt [LBRA08]. Zu Erkrankungen kommt es, wenn 32 bis 200 aufeinanderfolgende CAG-Wiederholungen im Gen vorliegen, die meist nicht unterbrochen sind.

Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen wurde gezeigt, dass die Expression des SCA2-Gens nicht nur im Gehirn, sondern auch in anderen Geweben wie den Muskeln, dem

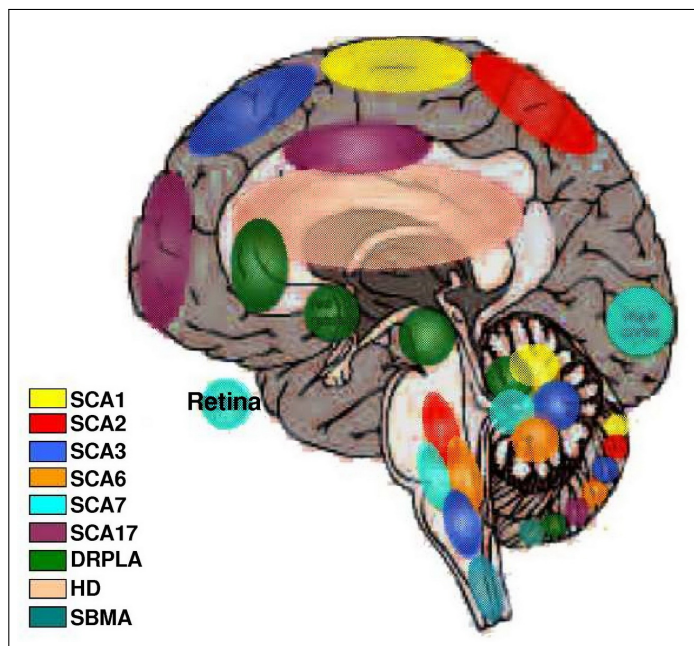


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der vorwiegend betroffenen Gehirnregionen der bisher bekannten Polyglutaminerkrankungen [TRX⁺06]

Herz, den Nieren oder der Milz erfolgt. Im Gehirn wird es vornehmlich im Amygdala, Nukleus Caudatus, Corpus Callosum, Hippocampus, Thalamus, Substantia Nigra und in den Purkinje-Zellen des Kleinhirns gebildet [LBRA08].

Die Symptome von SCA2-Patienten sind unter anderem zerebellare Ataxie (Störungen des Bewegungsapparates), Parkinsonismus (Parkinsonähnliche Auswirkungen), Mimikverlust, Ruhetremor (ruckartige Muskelbewegungen), depressive, apathische Antriebsminderung, Amyotrophie (geringer Muskeltonus), Dysphagie (Probleme beim Schlucken), Ophthalmoparese (Paralyse der Muskeln, die für die Augenbewegung zuständig sind), Areflexia (fehlende oder verringerte neurologische Reflexe in den unteren Extremitäten), periphere Neuropathie, Inkontinenz und Demenz [TRX⁺06, LBRA08].

Verursacht wird das Krankheitsbild durch Atrophien im Zerebellum (insbesondere der Purkinje-Zellen), der Brücke (Pons, im Hinterhirn), dem Frontallappen, der Medulla oblongata („verlängertes Mark“), dem Cranialnerv und der grauen Substanz im Mittelhirn (siehe Abbildung 1.1) [LBRA08]. Dem Verlust der Purkinje-Zellen im Zerebellum wird eine tragende Rolle im Verlauf der Krankheit zugesprochen, denn sie sind die einzigen Zellen im zentralen Nervensystem, die einen GluR δ 2-Rezeptor exprimieren [AMK⁺93]. Fehlt dieser Rezeptor, kommt es zu Störungen der synaptischen Plastizität und somit zu einer Störung der motorischen Kontrolle auf zellulärer Ebene und des motorischen Lernens auf der Verhaltensebene [KIA⁺95, MM03]. Obwohl nicht alle Wirkmechanismen genau geklärt sind, steht der GluR δ 2-Rezeptor mit vielen anderen postsynaptischen Proteinen in Wechselwirkung und nimmt eine Schlüsselposition in der Funktion des Kleinhirns ein [Hir06]. Das Absterben der Purkinje-Zellen wird der

Erhöhung des zellulären Ataxin-2-Niveaus zugeschrieben, woraus geschlossen wurde, dass die Konzentration des Ataxin-2 mit dem Ablauf der Krankheit korreliert und für die zellulären Dysfunktionen mit verantwortlich ist [NRW⁺07].

1.3 Aufbau und Funktion des Ataxin-2-Proteins

Wie bereits beschrieben kodiert das SCA2-Gen für das Ataxin-2-Protein, welches aus 1312 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 140 141 Da aufweist. Ataxin-2 ist ein überwiegend basisches Protein, welches eine saure Region besitzt, die eine LSm- und eine LSmA-Domäne enthält (Abbildung 1.2) [AGWL04].

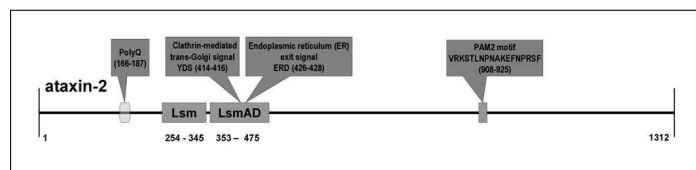


Abbildung 1.2: Ataxin-2-Domänen [Gol06]

Diese LSm-Domäne (like-Sm) ist stark konserviert. LSm-Domänen spielen eine wichtige Rolle bei der prä-mRNA-Prozessierung, sowie der RNA-Modifikationen, dem prä-mRNA-Splicing, dem RNA-Decapping und dem Abbau von RNA-Molekülen. Die LSm-Domäne von Ataxin-2 ist mit der LSmAD (LSm-assoziierten Domäne) assoziiert. Diese Domäne besteht in erster Linie aus α -Helices und besitzt ein Clathrin-vermitteltes trans-Golgisignal (Aminosäuren 414-416) und ein Ausgangssignal für das Endoplasmatische Retikulum (Aminosäuren 426-428).

Des Weiteren weist das Ataxin-2-Protein in der C-terminalen Region ein sogenanntes PAM2-Motiv auf, welches an die C-terminale Region des poly(A)-Bindeproteins (PABP) binden kann [SP06]. Das zelluläre PABP-Niveau steht in umgekehrter Proportionalität zum zellulären Ataxin-2-Level [NRW⁺07].

Die poly(Q)-Region, die bei einer Verlängerung zum Ausbruch der SCA2-Erkrankung führt, ist im N-terminalen Bereich von Ataxin-2 lokalisiert (Abbildung 1.2).

Die biologische Funktionen des Ataxin-2-Proteins ist bisher noch weitgehend unklar. Einblicke in die zelluläre Funktion des Proteins konnten durch Protein-Protein-Interaktionsstudien genommen werden. Es konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 mit den Proteinen Endophilin-A1 und -A3, sowie Secrogranin-1, α -Aktinin 1 und 2 interagiert (siehe 1.3). Diese Interaktionspartner besitzen wichtige Funktionen in Transportmechanismen und der Membrankrümmung während der Endozytose, so dass das Ataxin-2-Protein an diesen Funktionen beteiligt sein könnte [NRW⁺07].

Auf Grund der Domänenstruktur des Ataxin-2-Proteins wurde für das Ataxin-2 eine wichtige Rolle im RNA-Metabolismus postuliert [AGWL04]. Weitere Anhaltspunkte für die Richtigkeit des Postulats ergaben sich aus der Entdeckung der Interaktion von Ataxin-2 mit dem poly(A)-Bindeprotein PABP [BMF⁺05], der RNA-Helicase DDX6 [NRW⁺07] und dem Ataxin-2-Bindeprotein A2BP [SHP00].

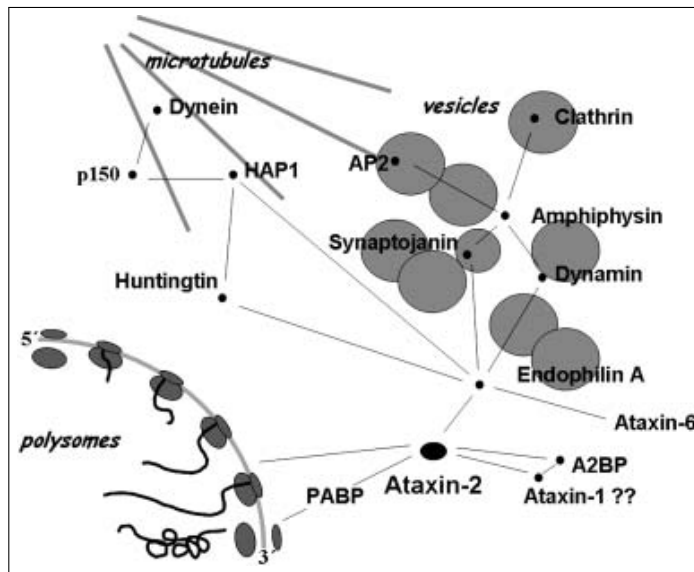


Abbildung 1.3: Ataxin-2 Interaktionsnetzwerk [LBRA08]

Zudem zeigte sich, dass Ataxin-2 eine Komponente von sogenannten Stress Granules ist. Diese entstehen, wenn Säugerzellen zum Beispiel oxidativen Stress, Hitzeschock oder UV-Einstrahlung, ausgesetzt werden [NRW⁺07]. Diese zellulären Strukturen bestehen aus untranslatierten mRNA-Molekülen und Proteinen [BP08]. Die mRNA-Moleküle die in den Stress Granules vorhanden sind, können dort degradiert, gespeichert oder zur weiteren Translation genutzt werden [SP06, RNA⁺05]. Interessanterweise scheint das Ataxin-2 eine wichtige Funktion in der Bildung von Stress Granules zu spielen. Durch Knock-Down-Experimente wurde gezeigt, dass ein verringertes zelluläres Level an Ataxin-2 zu einer verringerten Anzahl an Stress Granules führt [NRW⁺07]. Weitere wichtige Bestandteile von Stress Granules sind das TIA-1- und das TIAR-Protein [KCL⁺00]. Diese beiden Proteine sind für die Zusammenlagerung von Stress Granules verantwortlich.

In der Hausmaus *M. musculus* führt ein Defizit an Ataxin-2 zu Fettleibigkeit und reduzierter Fertilität. Das Fehlen von Ataxin-2 führte zu einem signifikanten Rückgang der Insulinrezeptoren im Gehirn und der Leber, was mit erhöhten Insulinlevel in diesen Organen einherging und Dyslipidemia bewirkte. In der Leber führte das erhöhte Insulinlevel zusätzlich zu einer Akkumulation von Glykogen und Fett. Daraus resultierend wurden sogar Tiere mit erhöhter Bewegungsrate oder verringerter Essenszufuhr fettleibig. Auf zellulärer Ebene wurde ein erhöhtes Level von Insulinrezeptor-kodierenden mRNA-Molekülen festgestellt, welche jedoch nicht translatiert wurden, was auf dem Einfluss des Ataxin-2 auf die Endozytose zu beruhen scheint [LBBL⁺08].

Des Weiteren wurde für das Ataxin-2 von *M. musculus* gezeigt, dass es an den Endozytosekomplex binden kann. Bei der Überexpression von Ataxin-2 konnte eine Verringerung der Anzahl von endozytotischen EGF-Rezeptoren nachgewiesen werden [NSL⁺08].

EGF besitzt einen neurotrophischen Effekt und ein Verlust von EGF-Rezeptoren führt in Mäusen zu neurodegenerativen Prozessen und zum Tod. Andere Tyrosinkinase-Rezeptoren, wie der Insulinrezeptor, scheinen auch mit Ataxin-2 in Wechselwirkung zu stehen und reguliert zu werden. Das Ataxin-2 scheint somit auch einen Einfluss auf die Signalweiterleitung an der Plasmamembran zu besitzen.

Die Erkenntnisse über die zelluläre Funktion des Ataxin-2 können durch Studien homologer Proteine noch erweitert werden. Für das humane Ataxin-2 wurden homologe Proteine unter anderem in *S. cerevisiae*, *C. elegans* und *D. melanogaster* gefunden.

In der Taufliege *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass dAtaxin-2 dosisabhängig die Bildung von Aktinfilamenten beeinflusst. Die Beeinflussung der Aktinfilamentsynthese kann sich in defekten Sinnesborsten, Degeneration einiger Gewebe, Sterilisation von weiblichen Fliegen, Apoptose und einer erhöhten Sterblichkeitsrate manifestieren [SJP02]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass dAtaxin-2 sich mit Polyribosomen zusammenlagert [SP06]. Dies zeigt einen möglichen Einfluss auf mRNA-Transport, -Stabilität und/oder -Translation. Das Ergebnis über die Zusammenlagerung mit Polyribosomen konnte nachfolgenden auch am humanen Ataxin-2 nachgewiesen werden [SP06].

Im Fadenwurm *C. elegans* zeigten Studien mit dem Ataxin-2-Homolog cAtaxin-2, dass eine Verringerung der cAtaxin-2-Aktivität zu diversen Defekten in der Keimbahn führen [CDP04]. Das cAtaxin-2 scheint die Regulation der Differenzierung von Spermien und Eizellen zu beeinflussen. Viele Defekte, die in *C. elegans*-Würmern mit verringertem cAtaxin-2-Level beobachtet wurden, scheinen Prozesse zu betreffen, die normalerweise durch einen Translationsrepressor namens GLD-1 kontrolliert werden [CDP04]. Möglicherweise funktioniert die Regulation der Translation über die Bindung an das PABP, welches an Komponenten der Translationsmaschinerie binden kann und sie beeinflusst. *C. elegans* Ataxin-2 könnte also die Translation regulieren, indem es an PABP bindet. Es könnte dabei sowohl als positiver, wie auch als negativer Regulator dienen [SP06].

In der Hefe *S. cerevisiae* wurde das Pab1-Bindeprotein (Pbp1) als Homolog zum Ataxin-2 beschrieben. Dieses besitzt, wie das humane Protein, eine LSM- und eine LSMA-Domäne und ist am RNA-Metabolismus beteiligt. Das Pbp1 reguliert die Polyadenylierung und bindet an das poly(A)-Bindepotein (Pab1) [MAJ98].

Die bisher bekannten Interaktionen des Ataxin-2 sind Abbildung 1.3 zusammenfassend dargestellt.

1.4 Ataxin-2 beeinflusst die Pathogenität anderer Polyglutaminerkrankungen

Interessanter Weise gelang es kürzlich zu zeigen, dass Ataxin-2 die Pathogenese anderer Polyglutaminerkrankungen beeinflussen kann.

Für die SCA1-Erkrankung wurde das Ataxin-2 erfolgreich als Modulator beschrieben. In *D. melanogaster* konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von dAtaxin-

1Q82 zu abnormalen, degenerierten Augenphänotypen führt. Wurde in diesen Organismen die Expression des dAtaxin-2 verringert, so führte es zu weniger stark degenerierten Augenphänotypen. Wurde in diesen Organismen das dAtaxin-2 jedoch überexprimiert, so führte es zu stärkerer Degeneration als bei alleiniger Überexpression von dAtaxin-1Q82. Der Effekt der dAtaxin-2-Expressionsrate auf den Degenerationsgrad der Augen zeigte den modulatorischen Effekt des dAtaxin-2 und legte eine Interaktion zwischen dAtaxin-1 und dAtaxin-2 nahe. So konnte bei Überexpression von dAtaxin-1Q82 gezeigt werden, dass es, normalerweise zytoplasmatisch verteiltes, dAtaxin-2 in den Zellkern rekrutiert. Dieser Sachverhalt konnte nur für die Überexpression von dAtaxin-1Q82 und nicht für Varianten mit kürzeren poly(Q)-Regionen (dAtaxin-1Q2, dAtaxin-1Q30) beobachtet werden. Des Weiteren konnte durch Herstellung eines dAtaxin-2-Proteins mit einem exogenen nukleären Lokalisationssignal (NLS) die Lokalisation des dAtaxin-2 vom Zytoplasma in den Kern geändert werden, was im Ergebnis eine dramatische Erhöhung der Toxizität bewirkte. Somit wurde nahegelegt, dass nicht nur der Expressionsgrad von dAtaxin-2 modulatorischen Effekt zeigt, sondern auch die Lokalisation [ARPL⁺07].

Für die SCA7-Erkrankung wurde das Ataxin-2-Protein ebenfalls erfolgreich als Modulator beschrieben [LLM⁺07]. Das dAtaxin-7-Protein besitzt drei nukleäre Lokalisationssignale (NLS) und ein nukleäres Exportsignal (NES) [YGP⁺07]. Es konnte gezeigt werden, dass die expandierte Form des dAtaxin-7 die nukleosomale Histonacetylierung unterbricht und ein erniedrigtes dAtaxin-2-Level die Zellen vor diesen Auswirkungen schützt [LLM⁺07].

1.5 Zielsetzung

Da vorangegangene Analysen dieser Arbeitsgruppe deutlich zeigten, dass Ataxin-2 und sein Hefehomolog Pbp1 sowohl strukturell als auch funktionell miteinander verwandt sind, ist zu vermuten, dass die für die Hefe beschriebenen Interaktionen auch auf das humane System übertragbar sind. Es konnten bereits einige in dem Hefeinteraktionsnetzwerk beschriebenen Interaktionen auf das humane System übertragen werden. Das Ziel dieser Arbeit ist eine weitere Interaktion dieses Netzwerkes auf das humane System zu übertragen. Hierbei lag der Fokus auf der beschriebenen Interaktion von Pbp1 und Crm1. Das Crm1 ist ein wichtiger Exportfaktor für Proteine und RNA-Moleküle aus dem Nukleus. Mit Hilfe von Adaptermolekülen kann das Crm1 an NES von Proteinen binden und über die Kernporen aus dem Zellkern transportieren [NLL⁺07]. Diese Interaktion könnte es ermöglichen, dass Pbp1 den Export von Proteinen und RNA-Molekülen aus dem Nukleus beeinflusst.

Zunächst sollte die Interaktion zwischen Crm1 und dem humanen Ataxin-2 mittels Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden. Zusätzlich sollte diese Proteininteraktion mittels RNAi-Technik und Experimenten zur Stressinduktion weitergehend analysiert werden. Abschließend sollte die Signifikanz der Interaktion in Bezug auf den beobachteten Modulatoreffekt des Ataxin-2-Proteins auf andere Polyglutaminerkrankungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Tabelle 2.1: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Adenin	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Bakto-Pepton	Difko
Benzonase	Merck
Betain	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Dynabeads	Dynal Biotech
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glukose	Merck
Glycerin	Merck
Glycin	Merck
Histidin	Sigma-Aldrich
Hoechst (bisBenzimide)	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	Difko

Tabelle 2.1: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Leptomycin B	LC Laboratories
Leucin	Sigma-Aldrich
Lithiumacetat (LiAc)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Uelzena
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Merck/Sigma-Aldrich
Natriumchlorid (NaCl)	Merck/Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-meta-Arsenit (NaAsO_2)	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom AG
<i>p</i> -Phenylendiamin (PDA)	Sigma-Aldrich
Polyethylenimin (PEI)	Polysciences, Inc.
Protease Inhibitor mit EDTA (Complete PI Cocktail Tablets)	Roche
Rotiphorese (Acrylamid 30 %)	Roth
Sorbitol	Sigma-Aldrich
SuperSignal West Femto	Pierce
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Invitrogen
Tris (Trizema Base)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck
Trypsin	Biochrom AG
Tryptophan	Sigma-Aldrich
Uracil	Sigma-Aldrich
Western Lightning	PerkinElmer Life Sciences
X-Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-Galactosid)	Roth
X-Phosphat (BCIP)	Sigma-Aldrich
Xylenphenolblau	Roth

Tabelle 2.1: Chemikalien (Fortsetzung)

Chemikalie	Hersteller
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco

2.1.2 Lösungen

Tabelle 2.2: Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
AP (Alkalische Phosphatase)-Puffer	100 mM Tris-HCL, pH 9,5 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂
Blockpuffer	5 % Magermilchpulver in 1 % PBS
5× Blotpuffer	240 mM Tris 200 mM Glycin 0,185 % SDS
Elektrophoresepuffer (10× SDS-PAGE Laufpuffer)	250 mM Tris 192 mM Glycin 1 % SDS
Hefetransformations-Mix 1	0,1 M LiAc 1,0 M Sorbitol 0,5× TE
Hefetransformations-Mix 2	0,1 M LiAc 1× TE
Ladepuffer (Agarosegel)	4 % Glycerin 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenzanolblau
Laemmlipuffer	250 mM Tris, pH 6,8 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50 % Glycerin 10 % DTT
Lysepuffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 mM EDTA

Tabelle 2.2: Lösungen (Fortsetzung)

Name der Lösung	Zusammensetzung
	1 % Triton-X 1 µl/10 ml Benzonase 1:25 Proteaseinhibitor
Mounting-Medium	90 µl 90 % Glycerin in PBS (ca. pH 8) 10 µl 10× <i>p</i> -Phenylendiamin
Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT)-Lösung	50 mg/ml in 70 % DMF
10× PBS	80 g NaCl ₂ 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l H ₂ O
Proteaseinhibitor-Stocklösung	1 Tablette Complete PI Cocktail in 2 ml H ₂ O
Sammelgelpuffer, pH 6,8	125 mM Tris 0,1 % SDS
TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Puffer	10 mM Tris 5 mM Eisessig 0,5 mM EDTA
10× TBS (Tris-Buffered Saline)	0,2 M Tris-HCl, pH 7,5 5 M NaCl
TE (Tris-EDTA)-Puffer, pH 7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA
4× Trenngelpuffer, pH 8,8	30 mM Tris 0,1 % SDS
X-Gal-Stammlösung	1 M 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal) 2 % DMF
X-Phosphat	20 mg/ml in H ₂ O
Z-Puffer, pH 7,0	16,1 g/l Na ₂ HPO ₄ · 7 H ₂ O 5,5 g/l NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 0,75 g/l KCl 0,246 g/l MgSO ₄ · 7 H ₂ O

2.1.3 Bakterienstamm und Medien

Bakterienstamm

Tabelle 2.3: Bakterienstamm

Bakterienstamm	Genotyp	Herkunft
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10(Tet^r)</i>]	Stratagene

Medien für Bakterien

Tabelle 2.4: Bakterien-Medien

Name des Mediums	Zusammensetzung
Luria-Bertani-Medium (LB) ¹ , pH 7,0	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
Luria-Bertani-Medium (LB) ¹ , pH 7,0	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl 100 µg/ml Ampicillin

2.1.4 Hefestamm und Medien

Hefestamm

Tabelle 2.5: Hefestamm

Hefestamm	Genotyp
L40ccua	<i>MATa his3Δ200 trp1-901 leu2-3,112 LYS2:: (lexAop)₄-HIS3 URA3:: (lexAop)₈-lacZ ADE2:: (lexAop)₈-URA3 GAL4 gal80 can1 cyh2</i>

Dieser Stamm wurde von Prof. Dr. Erich Wanker, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin, zur Verfügung gestellt. [GLS⁺04]

¹Für die entsprechenden Festmedien wurden noch 17 g/l Bakto-Agar hinzugefügt.

Hefemedien

Tabelle 2.6: Hefemedien

Hefemedien	Zusammensetzung
Einfriermedium	6,7 g/l YNB 1 M Betain 20 g/l Glukose 1 % Glycerin 0,2 g/l Adenin 0,2 g/l Histidin 0,2 g/l Uracil 0,2 g/l Tryptophan 0,2 g/l Leucin
SD II-Medium ¹	20 g/l Glukose 6,7 g/l YNB 0,2 g/l Adenin 0,2 g/l Uracil 0,2 g/l Histidin
SD IV-Medium ¹	20 g/l Glukose 6,7 g/l YNB 0,2 g/l Adenin
Yeast Peptone Dextrose-Medium	10 g/l Hefeextrakt 20 g/l Pepton 20 g/l Glukose 0,2 g/l Adenin

2.1.5 Zelllinie und Medien

Zelllinie

Tabelle 2.7: Zelllinie

Name	Organismus	Organ	ATCC®- Nummer
HeLa	Homo sapiens	Gebärmutterhals	CCL-2 TM

¹Für die entsprechenden Festmedien wurden noch 17 g/l Bakto-Agar hinzugefügt.

Zellkulturmedien

Tabelle 2.8: Zellkulturmedien

Medien	Zusammensetzung
DMEM-Zellkulturmedium	500 ml DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin

2.1.6 Antikörper

Tabelle 2.9: Antikörper

Name	Organismus	Verdünnung für		Hersteller
		Mikroskopie	Western Blot	
anti-ATXN2	Maus	1 : 200	1 : 1000	BD Bioscience
anti-Crm1	Maus	1 : 200	1 : 1000	BD Bioscience
anti-Crm1	Kaninchen	1 : 100	1 : 1000	Santa Cruz
anti-TIA1	Ziege	1 : 100		Santa Cruz
anti-TIAR	Maus	1 : 100	-	BD Bioscience
anti-NFκB	Kaninchen	1 : 100	-	Santa Cruz
anti-Myc	Kaninchen	1 : 500	1 : 1000	Sigma-Aldrich
anti-Flag	Kaninchen	1 : 500	1 : 5000	Sigma-Aldrich
anti-Flag	Maus	1 : 500	-	Sigma-Aldrich
POD-anti-Maus IgG	Ziege	-	1 : 1000	Sigma-Aldrich
AP-anti-Maus IgG	Kaninchen	-	1 : 5000	Dianova
Cy3-anti-Ziege IgG	Kaninchen	1 : 500	-	Dianova
Cy3-anti-Hase IgG	Ziege	1 : 500	-	Dianova
Alexa 488 anti-Maus	Ziege	1 : 500	-	Invitrogen
FITC-anti-Maus IgG	Ziege	1 : 500	-	Dianova

2.1.7 Plasmide

Die folgenden Vektoren wurden für die Expression von Proteinen in eukaryontischen Zellen sowie für das Yeast-Two-Hybrid-System genutzt.

pCMV-Myc

Der pCMV-Myc-Vektor ist ein für eukaryontische Zellen geeignetes Expressionsplasmid. Über ein Ampicillinresistenzgen (AmpR) kann der Vektor selektiert werden. Weiterhin besitzt der Vektor ein Polyadenylierungssignal (SV 40) und einen bakteriellen Replikationsursprung (pUC origin) (siehe Abbildung 2.1). Dieser Vektor war Grundlage für die Plasmide pCMV-Myc/HDQ25 und pCMV-Myc/HDQ72. Dieses Plasmide enthalten Sequenzen, die für den N-terminalen Bereich von Huntingtin (Aminosäuren 1-68) mit 25 bzw. 72 aufeinanderfolgenden Glutaminen kodieren und wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

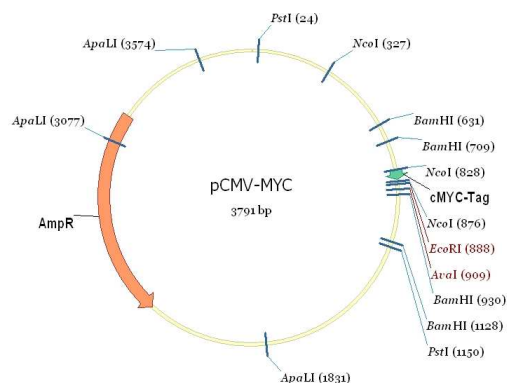


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Vektors pCMV-Myc. Dargestellt ist die AmpR, der MYC-Tag und die Restriktionsschnittstellen

pcDNA1; pcDNA3.1

Die Vektoren sind ebenfalls Expressionsvektoren für eukaryontische Zellen. Diese Plasmide besitzen eine Ampicillinresistenzgen zur Selektion sowie einen Flag-Tag.

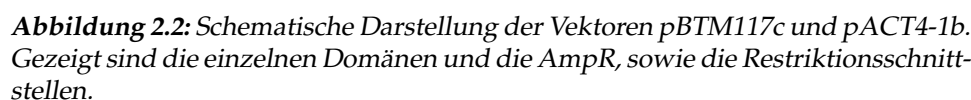
Der Vektor pcDNA1 war Grundlage für die Plasmide pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82. Beide Vektoren beinhalten die kodierenden Sequenzen für Ataxin-1 mit 30 bzw. 82 aufeinanderfolgenden Glutaminen. Bezogen wurden diese Vektoren von Dr. Flaviano Giorgini, Uni Leicester, England.

Der Vektor pcDNA3.1 war Grundlage für die Plasmide pcDNA3.1/SCA7Q10 und pcDNA3.1/SCA7Q60. Die Plasmide enthalten die Sequenzen des Ataxin-7 mit 10 bzw. 60 aufeinanderfolgenden Glutaminen. Bezogen wurde dieser Vektor von Dr. Dider Devys, CNRS/INSERM/ULP, Frankreich.

Der Vektor ist ein Expressionsvektor für eukaryontische Zellen. Er besitzt ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion und einen Flag-Tag. Die Vektor war Grundlage für die Plasmide pTL-FlagC/HDQ25 und pTL-FlagC/HDQ72. Diese Plasmide beinhalteten Sequenzen für Huntingtin mit 25 bzw. 72 aufeinanderfolgenden Glutaminen.

Der pBTM117c-Vektor wurde als Bait-Vektor für Yeast-Two-Hybrid-Analysen eingesetzt. Er besitzt ein Ampicillinresistenzgen zur Selektion, sowie die TRP1- und CAN1-Gene. Der Vektor ist ein Multikopie-Plasmid und enthält zudem die Sequenzen für die DNA-Bindedomäne LexA (siehe Abbildung 2.2a). Der Vektor war Grundlage für die Plasmide pBTM117c/HDQ25, pBTM117c/HDQ46 und pBTM117c/HDQ72. Diese Plasmide beinhalten die Sequenzen, welche für den N-terminalen Bereich von Huntingtin mit 25, 46 und 72 aufeinanderfolgenden Glutaminen kodieren. Des Weiteren wurde der Vektor pBTM117c als Grundlage für das Plasmid und pBTM117c/Ataxin-2F4 verwendet, welches die Sequenz für das Ataxin-2 Fragment 4 (Aminosäuren 481-815 des Ataxin-2-Proteins) beinhaltet (siehe 2.3).

Dieser Vektor wurde als Prey-Vektor für die Yeast-Two-Hybrid-Analyse verwendet. Als Auxotrophiemarker dient in diesem Vektor das LEU2-Gen. Des Weiteren besitzt der



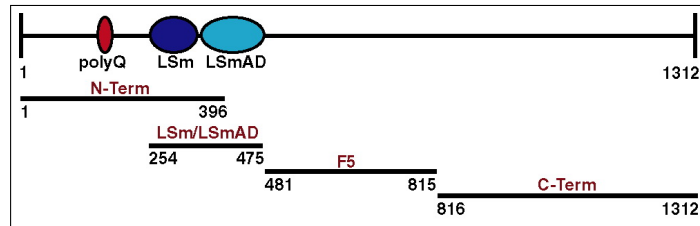


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Ataxin-2-Fragmente. Der rote Kreis symbolisiert die poly(Q)-Region, der dunkelblaue die LSm-Domäne und der hellblaue die LSmA-Domäne. Die Zahlen unter den Linien geben die Positionen der Aminosäuren an. Die kürzeren Linien repräsentieren die exprimierten Regionen in den Yeast-Two-Hybrid-Analysen. Über den Linien steht in rot der Name des Fragmentes (C-Terminus entspricht Fragment 4). [NRW⁺ 07]

Vektor ein Ampicillinresistenzgen und stellt ebenfalls ein Multikopie-Plasmid dar. (siehe Abbildung 2.2b). Dieser Vektor war Grundlage für die Plasmide pACT4-1b/Ataxin-2-22NT, pACT4-1b/Ataxin-2LSm, pACT4-1b/Ataxin-2F5, pACT4-1b/Ataxin-2F4 und pACT4-1b/PABC. Diese Plasmide beinhalteten die Sequenzen der Ataxin-2-Fragmente (siehe Abbildung 2.3) und des PABC-Proteins.

2.1.8 DNA- und Proteinstandards

Als Proteinmarker wurde der PageRuler™Plus Prestained Protein Ladder von Fermentas verwendet.

Als DNA-Marker diente 1 kb DNA-Ladder von Biolabs.

2.2 Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation

Zur Präparation von Plasmiden aus *E. coli* wurden DNA-Mini- bzw. Midi-Präparationskits (Mini Kit von Qiagen, PeqLab, Fermentas; Midi Kit von Invitrogen) verwendet.

Für eine Minipräparation wurden 3 ml LB-Amp Medium mit einem entsprechenden *E. coli*-Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli*-Zellen zentrifugiert (13 000 rpm, 5 Minuten, Raumtemperatur) und in 250 µl Resuspendierungspuffer (Solution I) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 250 µl Lysepuffer (Solution II) versetzt, die Ansätze leicht geschüttelt und 2 Minuten inkubiert. Danach wurden die Lysate mit 350 µl Neutralisierungspuffer (Solution III) versetzt und zentrifugiert (13 000 rpm, 5 Minuten, Raumtemperatur). Die Überstände wurden auf Säulen gegeben und zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Säulen 2× mit Waschpuffer gewaschen. Zum Eluieren der DNA wurden 50 µl destilliertes Wasser verwendet.

Für eine Midipräparation wurden 50-200 ml LB-Amp-Medium mit einem entsprechenden *E. coli*-Klon angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Im An-

schluss wurden die Kulturen zentrifugiert (4 000 rpm, 10 Minuten, Raumtemperatur), die Zellen in 10 ml Resuspendierungspuffer aufgenommen und mit 10 ml Lysepuffer versetzt. Diese Ansätze wurden für 5 Minuten inkubiert, mit 10 ml Precipitationspuffer versetzt und auf die Säulen gegeben. Die Säulen wurden anschließend mit 15 ml Waschpuffer gewaschen und die DNA mit 5 ml Eluierungspuffer eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 3,5 ml Isopropanol versetzt und zentrifugiert (30 Minuten, 15 000 g, 4°C). Das DNA-Pellet wurde mit 3 ml 70% Ethanol gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten, 15 000 g, 4°C), an der Luft getrocknet und im Anschluss in 100 µl Wasser gelöst.

2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösung, die wie unter 2.2 beschrieben hergestellt wurde, wurde mit Hilfe eines „NanoDrop ND-1000“ bestimmt. Hierfür wurden 2 µl der DNA-Probenlösung auf die dafür vorgesehene Messvorrichtung aufgetragen und die Konzentration aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Zur weiteren Kontrolle wurde die DNA-Probe mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Für ein 1 %iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose mit 50 ml TAE aufgekocht und danach 0,5 g/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Diese Lösung wurde in eine Gelkammer gegossen und ein Taschenkamm in die noch flüssige Lösung gesteckt. Nach dem Aushärten des Gels wurde TAE als Laufpuffer hinzugegeben und die Taschen mit den DNA-Proben befüllt. Das Gel wurde für 30-60 Minuten einer elektrischen Spannung von 60 V ausgesetzt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe eines UV-Illuminators die Banden sichtbar gemacht und dokumentiert.

2.2.4 Zellkultivierung

Zur Kultivierung von HeLa-Zellen wurden die Zellen in 20 ml DMEM bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit für 72-96 Stunden inkubiert. Zur Vorbereitung der Zellen für die entsprechenden Experimente bzw. zur weiteren Kultivierung wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 5-10 min bei 37°C mit 0,5 ml Trypsin inkubiert und anschließend in 10 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden 300 000 bis 800 000 Zellen in 20 ml frischem Medium ausgesät und inkubiert.

Zur Kultivierung der Zellen in 6 well-Platten wurden 80 000 bis 240 000 Zellen mit 2 ml Medium ausgesät und 12-48 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Bei Verwendung von 12 well-Platten wurden 30 000 bis 50 000 Zellen mit 1 ml Medium versetzt und ebenfalls 12-48 Stunden unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert.

Zur Induktion von **oxidativem Stress** wurden HeLa-Zellen mit 0,5 mM Natrium-*meta*-Arsenit für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

Zur Blockierung des Crm1-abhängigen Exports mit **Leptomycin B (LMB)** wurden die HeLa-Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB behandelt.

2.2.5 Transfektion von Säugerzellen

Für Transfektionsexperimente wurden HeLa-Zellen, wie unter 2.2.4 beschrieben, in einer 6 well-Platte kultiviert und mit 3 µg des entsprechenden Expressionsplasmides, 10 µl PEI und 200 µl 150 mM NaCl versetzt. Anschließend wurden die Transfektionsansätze zur Expression der Proteine für 8-48 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.6 Transfektion von Säugerzellen mit siRNA

Für die Experimente wurden folgende siRNA-Moleküle mit einer Konzentration von 20 µM von Qiagen eingesetzt:

Ataxin-2:

Hs_ATXN2_2HP-siATXN2# 2	(Ataxin-2 siRNA #2)
Hs_ATXN2_2HP-siATXN2# 3	(Ataxin-2 siRNA #3)

Crm1:

Hs_XPO1_1 SI03023342	(XPO1 siRNA 1)
Hs_XPO1_2 SI03052210	(XPO1 siRNA 2)
Hs_XPO1_5 SI00051856	(XPO1 siRNA 5)
Hs_XPO1_6 SI00051863	(XPO1 siRNA 6)

300 ng der entsprechenden siRNA-Moleküle wurden mit 6 µl Hiperfect (Qiagen) und 100 µl DMEM (ohne FBS) gemischt und 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Transfektionsmix zu 60 000-75 000 HeLa-Zellen gegeben, welche in 12 well-Platten inkubiert wurden. Dieser Ansatz wurde für 68-72 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

2.2.7 Zelllyse

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die HeLa-Zellen, wie unter 2.2.4 beschreiben, kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 300 µl Lysepuffer versetzt (30 Minuten, 4°C) und die Zelllysate zentrifugiert. Als Alternative wurde die Lyse mit „Complete Lysis-M“ (Roche) durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit 200-800 µl Complete Lysis-M-Puffer versetzt und die Ansätze für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Von den Zelllysaten wurde die Proteinkonzentration, wie im folgenden Abschnitt beschrieben (siehe 2.2.8), bestimmt .

2.2.8 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration von Zelllysaten wurde mit Hilfe eines „Bio-Rad Protein-Assays“, der auf der Proteinbestimmung nach Bradford beruht, bestimmt.

Dafür wurden 200 µl der Bio-Rad-Lösung mit 5 µl des Zelllysates und 800 µl PBS vermischt und die Absorption bei 595 nm mit Hilfe eines Photometers bestimmt.

2.2.9 Koimmunopräzipitation

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden HeLa-Zellen, wie unter 2.2.5 und 2.2.7 beschrieben, lysiert. Je 200 µg Lysat wurden mit 1 µl des primären Antikörpers (gegen Ataxin-2 bzw. Crm1) versetzt und die Ansätze nachgehend für 60 Minuten auf einem Rotationsrad bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde der sekundäre Antikörper, welcher an „Dynabeads® M280“ (Dyna) gekoppelt ist, zu den Ansätzen gegeben und diese für weitere 1-3 Stunden bei 4°C inkubiert.

Anschließend wurden die Ansätze 3× mit BSA und 4× mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Dynabeads in 15 µl Laemmli-puffer aufgenommen, die Ansätze für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und anschließend die Ansätze mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

2.2.10 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Trennung von Proteinen mittels SDS-Polyacrylamidgels wurde ein 10%iges Trenngel (1,85 ml Trenngelpuffer, 2,5 ml Acrylamid, 3,125 ml H₂O, 75 µl APS, 7,5 µl TEMED) verwendet, welches nach dem Gießen mit 200 µl Isopropanol überschichtet wurde. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol wieder entfernt und das 5%ige Sammelgel (3,125 ml Sammelgelpuffer, 625 µl Acrylamid, 37,5 µl APS, 3,75 µl TEMED) gegossen. Anschließend wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gebracht (Protean II System). Die Kammer wurde mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt und der Täschenkamm aus dem Gel gezogen. Die Proben wurden auf das Gel geladen und das Gel für 10-20 Minuten einer elektrischen Spannung von 70 V ausgesetzt. Nachdem die Proben in das Trenngel eingetreten waren, wurde die Spannung auf 200 V erhöht.

2.2.11 Proteintransfer auf eine Membran

Zum Transfer von Proteinen auf eine Membran wurde die Semi-Dry-Methode durchgeführt. Eine Blotkammer von Invitrogen wurde in folgender Weise bestückt:

- 3× in Blotpuffer getränkte 3 mm Whatmanpapiere
- in Blotpuffer getränkte Nitrozellulosemembran (Whatman, Protean Pure Nitrocellulose Transfer and immobilization membrane, Perkin Elmer)
- Acrylamidgel
- 3× in Blotpuffer getränkte 3 mm Whatmanpapiere

Anschließend wurde die Apparatur geschlossen. Der Proteintransfer erfolgte pro Membran bei 150 mA für 60 Minuten.

2.2.12 Immunologischer Nachweis von Proteinen

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen wurde die Membran in 20 ml 5 %-Blockpuffer gelegt und für 60 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Verdünnungen: siehe Tabelle 2.9) für 60 Minuten bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran 3× mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper inkubiert für weitere 1-3 Stunden inkubiert. Abschließend wurde die Membran 5× mit PBS gewaschen und daraufhin mit 300 µl „Super Signal West Femto Maximum Sensitivity“ versetzt. Ein lichtempfindlicher Film (GE Healthcare, Amersham Hyperfilm™ ECL, High performance chemiluminescence film) wurde auf die Membran gelegt und der Film mit Hilfe eines Entwicklerautomaten entwickelt und das Ergebnis mit einer Kamera dokumentiert.

2.2.13 Immunfluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden HeLa-Zellen, wie unter 2.2.4 beschrieben, auf Deckgläschen ausgesät. Anschließend wurden die HeLa-Zellen 1× mit PBS gewaschen und für 10 Minuten mit –20°C kaltem Methanol zur Fixierung und Permeabilisierung behandelt. Zur Sättigung unspezifischer Bindungen wurden die Zellen anschließend für 30 Minuten mit 3 % BSA/PBS inkubiert. Nach der Inkubation wurde der primäre Antikörper (z.B. Ataxin-2, TIAR) zu den Zellen gegeben und die Ansätze für 40-60 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2× mit PBS gewaschen und für weitere 40-60 Minuten mit dem sekundären Antikörper inkubiert, welcher entweder an Fluoresceinisothiocyanat (FITC bzw. Alexa 488, grün) oder Cy3 (rot) gekoppelt war. Anschließend wurden die Ansätze 1× mit PBS gewaschen und zur Verringerung des Hintergrunds für 5 Minuten mit 50 mM NH₄Cl behandelt. Zur Färbung des Zellkerns wurden die Zellen 1× mit PBS gewaschen und für 20 Sekunden mit Hoechst (bis-Benzimid 10 µg/ml in PBS) behandelt. Im Anschluss wurden die Zellen 3× mit PBS gewaschen und mit Mountingmedium (10 µl PDA (0,1 mg/ml), 90 µl Glycerin (90 %)) auf einen Objektträger gegeben. Im Anschluss wurden die Zellen mit einem inversen, konfokalen Mikroskop (LSM 510 META; Axiovert 200M; Zeiss) betrachtet. Die Aufnahmen wurden mit AxioVision Rel 4.6 für weitere Verwendungen bearbeitet.

2.2.14 Yeast-Two-Hybrid-Analysen

Für Yeast-Two-Hybrid-Analysen wurde eine Über-Nacht-Kultur des Hefestamms L40-ccua angezogen und am darauffolgenden Tag auf eine OD_{600 nm} von 0,3 eingestellt. Diese Kultur wurde anschließend bei 30°C bis zu einer OD_{600 nm} von 0,6-0,8 inkubiert. Anschließend wurde die Hefekultur zentrifugiert (5 Minuten, 2 000 rpm, Raumtemperatur), das Zellpellet in 10 ml 1× TE resuspendiert und die Zellsuspension erneut zentrifugiert (5 Minuten, 2 000 rpm, Raumtemperatur). Anschließend wurden das Zellpel-

let in 1 ml Hefetransformationsmix 1 resuspendiert und der Ansatz für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 40 µl des Ansatzes wurden zu einem Mix aus 300 ng Plasmid, 5 µl Heringssperma DNA (10 µg/µl) und 230 µl Mix 2 gegeben. Diese Transformationsansätze wurden für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze mit 30 µl DMSO versetzt und die Ansätze für 7 Minuten bei 42°C inkubiert. Danach wurden die Ansätze zentrifugiert (3 000 rpm, 5 Minuten, Raumtemperatur), die Zellpellets jeweils in 50 µl Wasser resuspendiert und die Zellsuspensionen auf SD II-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten für 72 Stunden bei 30°C inkubiert.

Zum Nachweis der Reportergenaktivität wurden die jeweiligen Transformanden isoliert und in je 200 µl Einfriermedium in eine 96 well-Platte eingerührt und für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen auf SD II, SD IV und eine Membran (Micron Separations Inc., 22,2 × 22,2 cm) gestempelt und für weitere 72-96 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran zur Lyse der HeLa-Zellen in flüssigem Stickstoff inkubiert und anschließend auf zwei Whatmanpapiere gegeben, welche in 10 ml Z-Puffer, 156 µl X-Gal und 100 µl DTT getränkt worden waren. Die Membran wurde anschließend für 3-4 Stunden bei 37°C inkubiert. Abschließend wurde das Wachstum auf den SD II- und SD IV-Platten verglichen und das Ergebnis der Membran als Nachweis der Aktivität des lacZ-Gens dokumentiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Interaktion von Ataxin-2 und Crm1

Eine bioinformatische, datenbankgestützte Analyse zeigte, dass das Ataxin-2-Hefehomolog Pbp1 mit vielen Proteinen in Wechselwirkung steht, welche eine Funktion im zellulären mRNA-Metabolismus besitzen [RAN⁺05]. In der Arbeitsgruppe konnte eine strukturelle und funktionelle Verwandtschaft von Ataxin-2 und Pbp1 belegt werden, was zu der Hypothese führte, dass sich im Hefeinteraktionsnetzwerk dargestellten Protein-Protein-Interaktionen auf das humane System übertragen lassen. Diese Hypothese konnte in vorangegangenen Arbeiten für verschiedene Interaktionen bestätigt werden [NRW⁺07].

In dieser Diplomarbeit sollte die Interaktion zwischen Pbp1 und Crm1 im humanen System verifiziert werden. Das Crm1-Protein ist einer der wichtigsten Exportfaktoren für Proteine und RNA-Moleküle aus dem Zellkern. Es kann an nukleäre Exportsignale (NES) von Proteinen binden und darüber den Transport dieser Proteine aus dem Zellkern vermitteln [NLL⁺07].

3.1.1 Nachweis der Interaktion zwischen Ataxin-2 und Crm1 mittels Koimmunopräzipitation

In einem ersten Schritt sollte die putative Interaktion zwischen Ataxin-2 und Crm1 mittels Koimmunopräzipitation überprüft werden.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit den Expressionsplasmiden pCMV-Myc, pCMV-Myc/Ataxin-2Q22 und pCMV-Myc/Ataxin-2Q79 transient transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation lysiert. Nach der Herstellung der Lysate wurden 20 µg des Lysates mit 1 µl eines spezifischen Antikörpers gegen Crm1 inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit anti-Kaninchen-IgG-Dynabeads behandelt (siehe 2.2.9). Als Kontrollen diente in dieser Analyse zum Einen das Lysat der Zellen, welche mit pCMV-Myc transfiziert waren. Eine Inkubation dieses Proteinlysates mit dem spezifischen Antikörper gegen Crm1-Antikörper schließt unspezifische Proteinbindungen aus, die im Western Blot auf gleicher Laufhöhe wie Ataxin-2-Banden zu erkennen wären. Zum Anderen wurden die Lysate ohne Zugabe des primären Antikörpers nur mit Dynabeads behandelt, um unspezifische Wechselwirkungen der Proteine mit Dynabeads auszuschließen. Als weitere Kontrolle wurden mit PBS inkubierte Dynabeads und der spezifische Antikörper gegen Crm1 auf das Polyacrylamidgel aufgetragen, um unspezifische Antikörperbanden auf dem Western Blot zu erkennen und somit falsche Positivergebnisse auszuschließen. Zum Nachweis, ob Ataxin-2Q22 bzw. Ataxin-2Q79

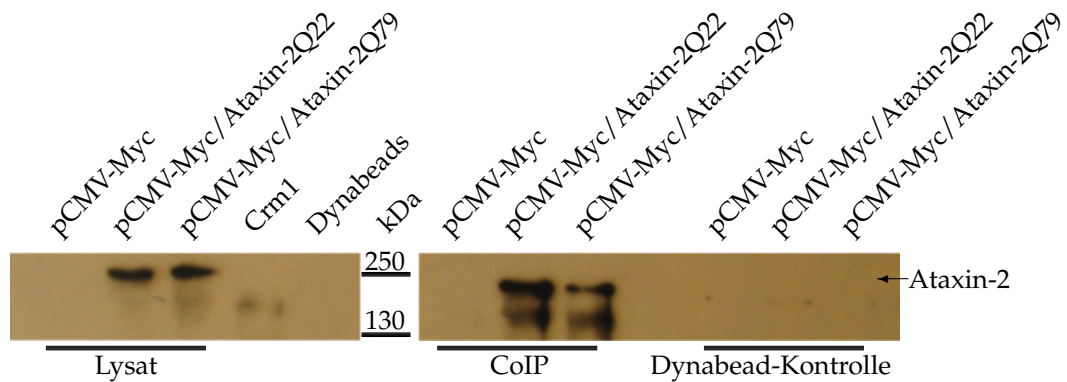


Abbildung 3.1: Nachweis der Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pCMV-Myc, pCMV-Myc/Ataxin-2Q22 und pCMV-Myc/Ataxin-2Q79 transient transfiziert und nach 24 Stunden Inkubationszeit lysiert. Für die Koimmunopräzipitation (CoIP) wurden jeweils 20 µg Zelllysate mit 1 µl Crm1-Antikörper und anschließend mit Dynabeads inkubiert. Um unspezifische Bindungen von Ataxin-2 an die Antikörper auszuschließen wurden die Lysate ohne Zugabe des primären Antikörpers behandelt (Dynabeads). Zum Nachweis der überexprimierten Proteine wurden verwendeten Lysate auf ein SDS-Gel aufgetragen. Zur weiteren Kontrolle wurde 1 µl Crm1-Antikörper und 15 µl Dynabeads in Probenpuffer aufgenommen, 5 Minuten bei 95°C denaturiert und ebenfalls auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Lysate wurden elektrophoretisch getrennt und anschließend für einen Immunoblot verwendet. Dieser Blot wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Ataxin-2 (1 : 1000) und POD-anti-Maus IgG (1 : 1000) entwickelt.

in Assoziation mit Crm1 präzipitiert werden kann, wurden die Ansätze auf einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und Ataxin-2 immunologisch nachgewiesen. Für den Immunologischen Nachweis wurde als primärer Antikörper ein spezifischer Ataxin-2-Antikörper verwendet und die Membran anschließend mit dem sekundären Antikörper, ein an POD gekoppelter anti-Maus IgG-Antikörper, inkubiert und entwickelt.

In Abbildung 3.1 ist ein Western Blot der Koimmunopräzipitation dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnte Ataxin-2 mit 22 und 79 Glutaminen spezifisch mit einem Antikörper gegen Crm1 präzipitiert werden. Es sind weder unspezifische Antikörperbanden noch unspezifische Bindungen von Ataxin-2 an Dynabeads zu erkennen. Somit kann dieser Interaktionsnachweis als spezifisch angesehen werden.

Bei Verwendung von endogenem Ataxin-2 mit der gleichen Versuchsanordnung zeigte die Koimmunopräzipitation keine Präzipitate (Daten nicht gezeigt), was in zu geringen endogenen Ataxin-2 Konzentrationen begründet sein könnte.

3.1.2 Studien zur zellulären Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2

Nachdem mit Hilfe der Koimmunopräzipitation eine Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden die intrazelluläre Lokalisation dieser beiden Proteine untersucht werden.

In einem ersten Schritt wurde eine Einzelfärbung der Proteine durchgeführt, um die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 bestimmen zu können. Im zweiten Schritt erfolgte eine Doppelfärbung, um eine mögliche Kolo-kalisation der beiden Proteine untersuchen zu können.

Hierfür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät (siehe 2.2.4) und 24 Stunden inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Verwendung spezifischer Antikörper gegen Ataxin-2 und Crm1 (siehe 2.2.13).

Die Einzelfärbung (Abbildung 3.2) zeigte für Crm1 eine überwiegend nukleäre Verteilung. Dabei war zusätzlich eine Strukturbildung im Kern zu erkennen. Weiterhin konnte eine schwache zytoplasmatische Lokalisation für Crm1 festgestellt werden. Ataxin-2 hingegen war vornehmlich im Zytoplasma verteilt.

Die Doppelfärbung (Abbildung 3.3) zeigte für beide Proteine eine ähnliche Verteilung wie in der Einzelfärbung. Eine deutliche Kolo-kalisation von Ataxin-2 und Crm1 ist nicht zu erkennen. Da jedoch auch Crm1 schwach im Zytoplasma lokalisiert ist, könnte es dort zu einer Interaktion der beiden Proteine kommen.

3.1.3 Studien zur zellulären Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2 unter oxidativem Stress

In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 unter Stressbedingungen seine Lokalisation ändert und in Stress Granules akkumuliert [NRW⁺07]. Um zu überprüfen, ob Crm1 unter Stressbedingungen ebenfalls eine veränderte Lokalisation aufweist wurden im nächsten Schritt Lokalisationsstudien für Crm1 unter

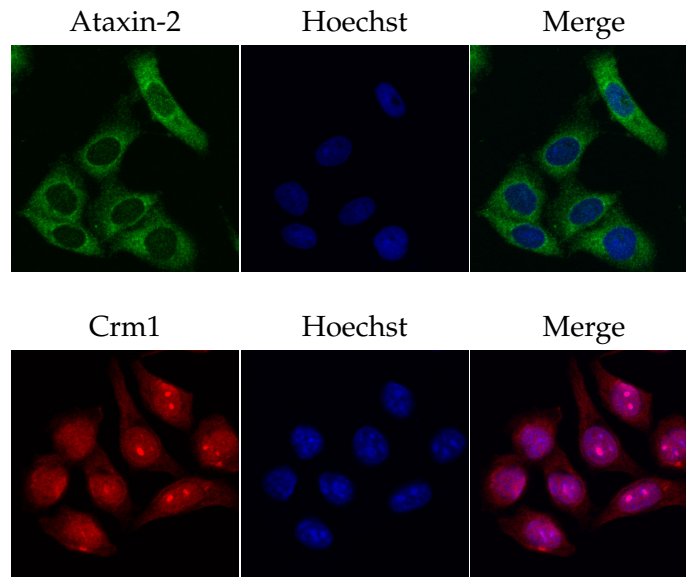


Abbildung 3.2: Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 bzw. Crm1 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 oder Crm1 gefärbt. Für die Färbung des Zellkerns wurde Hoechst verwendet.

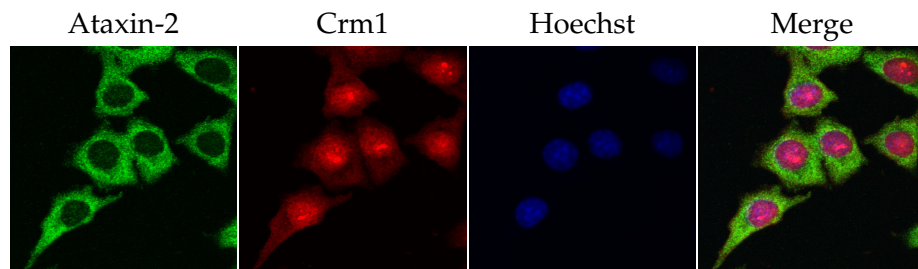


Abbildung 3.3: Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Für die Färbung des Zellkerns wurde Hoechst genutzt.

Stressbedingungen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen wie im vorherigen Versuch für die Immunfluoreszenzmikroskopie ausgesät, im Anschluss eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt, fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt.

In Abbildung 3.4 (oben), ist zu erkennen, dass Ataxin-2, wie bereits beschrieben in Stress Granules im Zytoplasma vorliegt. Eine Änderung der Lokalisation von Crm1 konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Als zusätzliche Kontrolle für die Lokalisation von Crm1 unter oxidativen Stressbedingungen, wurde als weiteres Markerprotein das TIAR mit in die Untersuchung einbezogen. Die HeLa-Zellen wurden wie oben beschreiben ausgesät, einer der zwei Ansätze mit Arsenit behandelt und die Zellen fixiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte über spezifische Antikörper gegen Crm1 und TIAR.

Wie die Abbildung 3.4 (unten) zeigt, akkumuliert TIAR unter Arsenitbehandlung in zytoplasmatischen Stress Granules und liegt weiterhin im Zellkern vor. Wie zuvor ist die Lokalisation des Crm1 nicht verändert und größtenteils nukleär. Auf Grund dieser Ergebnisse kann geschlossen werden, dass Crm1, trotz der beschriebenen Interaktion mit Ataxin-2, nicht mit Stress Granules assoziiert.

3.1.4 Einfluss von Leptomycin B auf die zelluläre Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2

Leptomycin B (LMB) ist ein spezifischer Hemmer des Crm1-abhängigen Protein- und RNA-Transportes aus dem Zellkern [NLL⁺07]. Eine Behandlung von Zellen mit LMB führt zu veränderten Lokalisationen einiger Proteine, da für diese Proteine der Kernexport blockiert wird. Eines der davon betroffenen Proteine ist NFκB. Dieses Protein ist ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle in der Immunantwort und der Pathogenese von Krebs und Diabetes besitzt. NFκB ist ein zytoplasmatischer Proteinkomplex, der über den Crm1-abhängigen Kernexport aus dem Zellkern transportiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von Zellen mit Leptomycin B zu einer Akkumulation von NFκB im Zellkern führt. [KGK⁺07] Aus diesem Grund wurde NFκB als Kontrolle für eine Blockade des Kerntransportes durch LMB in die folgenden Untersuchungen eingeschlossen.

Um zu überprüfen, ob eine Behandlung der Zellen mit LMB einen Einfluss auf die Lokalisation von Ataxin-2 besitzt, wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und anschließend für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB inkubiert. Im Weiteren wurden die Zellen für die Immunfluoreszenz fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen NFκB und Ataxin-2 behandelt.

NFκB zeigt unter normalen Bedingungen eine zytoplasmatische Verteilung (Abbildung 3.5). Nach der LMB-Behandlung akkumuliert NFκB im Zellkern. Dieses Ergebnis führt zu dem Befund, dass unter den gewählten Bedingungen der Crm1-abhängige Transport von NFκB aus dem Zellkern gehemmt ist. In der Abbildung ist weiterhin zu erkennen, dass Ataxin-2 sowohl mit als auch ohne LMB-Behandlung zytoplasmatisch lokalisiert ist. Es konnte somit keine Änderung der Lokalisation von Ataxin-2 festgestellt werden.

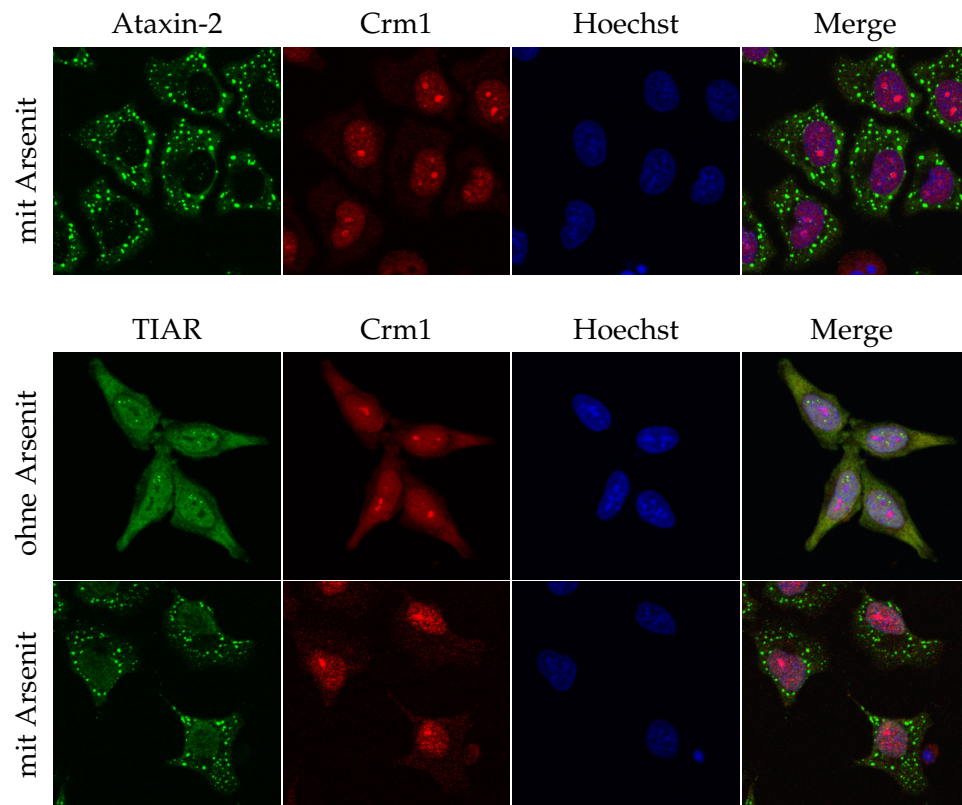


Abbildung 3.4: Intrazelluläre Lokalisation von Crm1 unter Stressbedingungen in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 0,5 mM Arsenit inkubiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert. Die Visualisierung der Proteine erfolgte mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen Ataxin-2, Crm1 und TIAR. Für die Färbung des Zellkerns wurde Hoechst verwendet.

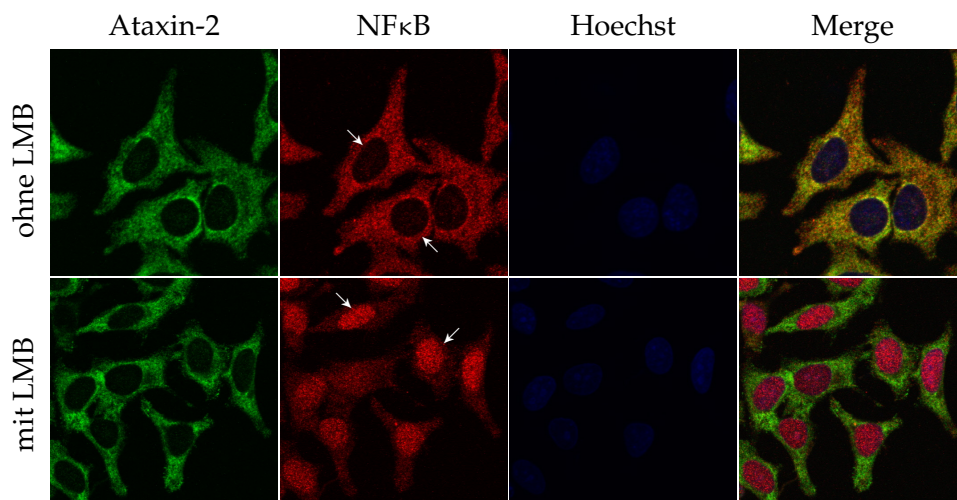


Abbildung 3.5: Intrazelluläre Lokalisation von NF κ B in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB inkubiert und anschließend für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit Antikörpern gegen NF κ B und Ataxin-2 gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile markieren den Zellkern in dem das NF κ B nach LMB-Behandlung akkumuliert.

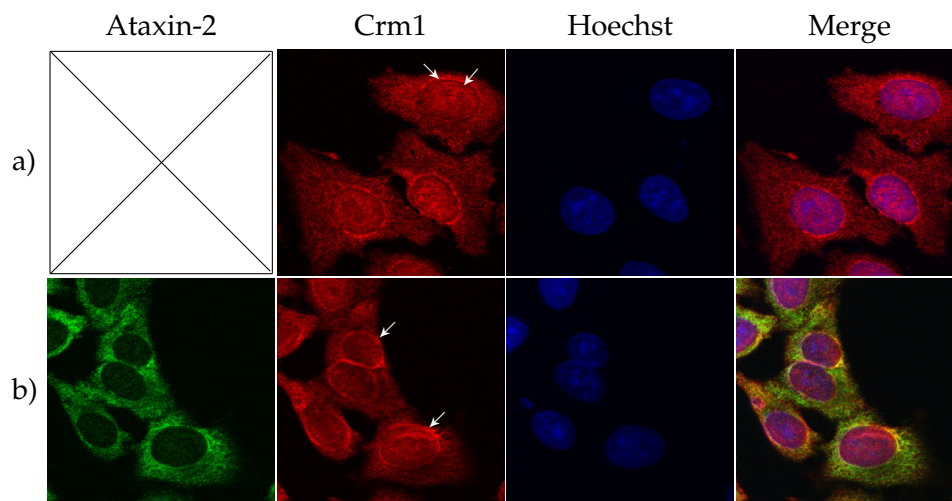


Abbildung 3.6: Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 nach LMB-Behandlung in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weitere 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Für die Färbung des Zellkerns wurde Hoechst benutzt. Die Pfeile zeigen die Ringstruktur des Crm1 um die Kernmembran.

Für die Analyse der zellulären Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 bei LMB-Behandlung wurden ebenfalls HeLa-Zellen unter gleichen Bedingungen ausgesät, behandelt und anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt.

Crm1 zeigt unter LMB-Behandlung (Abbildung 3.6, a) eine ringförmige Anreicherung um den Kern herum. Diese Anreicherungen des Crm1 nach LMB-Behandlung sind mit weißen Pfeilen verdeutlicht. Abgesehen davon ist das Crm1 wie zuvor sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär lokalisiert.

Die Doppelfärbung (Abbildung 3.6, b, Merge) zeigt eine Überlagerung der Ataxin-2- und Crm1-Färbung um die Kernmembran, was auf eine Kolo-kalisation in diesen Bereichen hindeutet.

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass Ataxin-2 trotz Interaktion mit Crm1 nicht Crm1-abhängig transportiert wird, da es sonst nach LMB-Behandlung seine Lokalisation in den Kern hätte ändern müssen.

3.1.5 RNAi-Experimente mit Ataxin-2

Die Ataxin-2-Konzentration beeinflusst die endogene Konzentration diverser anderer Proteine, mit denen es in Wechselwirkung steht. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass das endogene PABP-Level umgekehrte Proportionalität zum Ataxin-2-Level aufweist [NRW⁺07]. Aufgrund der gezeigten Interaktion zwischen Ataxin-2 und Crm1 stellte sich die Frage, ob die Veränderung der endogenen Konzentration von Ataxin-2 einen Einfluss auf das Crm1-Level oder die Crm1-Lokalisation zeigt. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt.

Zunächst wurde die Konzentration des Ataxin-2 mit Hilfe von spezifischen siRNA-Molekülen gegen Ataxin-2 in einem Knock-Down-Versuch verringert. Im ersten Schritt wurde die Wirksamkeit der Ataxin-2-siRNA mit einem Immunoblot überprüft. Hierfür wurden vier Ansätze von HeLa-Zellen vorbereitet. Ein Ansatz wurde ohne siRNA belassen (Kontrolle), ein Ansatz mit einer unspezifisch bindenden siRNA (non sil siRNA) transfiziert und zwei Ansätze mit zwei verschiedenen Ataxin-2-siRNA transfiziert (Ataxin-2-siRNA #2 und Ataxin-2-siRNA #3). Nach 68 stündiger Inkubationszeit (siehe 2.2.6) wurden die Zellen lysiert. 20 µg der Lysate wurden auf einem SDS-Polyacrylamid-gel getrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Diese Membran wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen Ataxin-2 entwickelt. Nach der Entwicklung wurde die Membran gewaschen und mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR entwickelt, um die einheitliche Beladung des Gels sicherzustellen. Als Letztes wurde die Membran erneut gewaschen und gegen Crm1 entwickelt, um die Auswirkungen des veränderten Ataxin-2-Level auf das Crm1-Level sichtbar zu machen.

Bei der Entwicklung des Western Blots gegen Ataxin-2 (Abbildung 3.7, Ataxin-2) sind deutliche Unterschiede in den Bandenintensitäten des Proteins zu beobachten. Die Proteinbanden für den Ansatz mit non sil siRNA und den Kontrollansatz ohne siRNA weisen eine stärkere Intensität auf, als die Banden der mit spezifischer siRNA behandelten Proben. Der Ataxin-2-Knock-Down zeigt die höchste Wirkung bei Verwendung von siRNA #3. Hier ist kaum noch Ataxin-2 nachzuweisen.

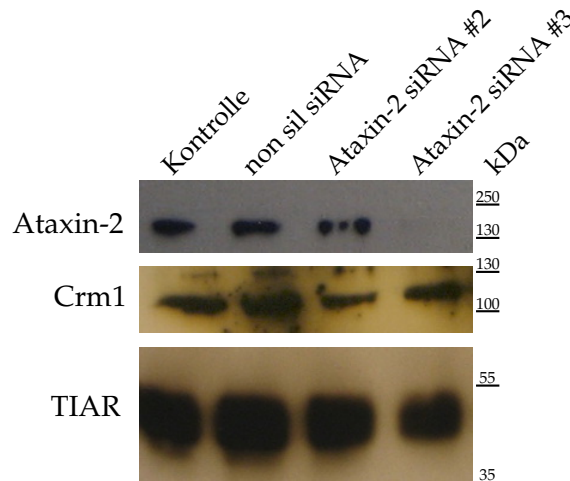


Abbildung 3.7: Analyse eines Ataxin-2-Knock-Downs in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Molekülen gegen Ataxin-2 transfiziert und 68 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und 20 µg der Lysate mittels Immunoblotanalyse untersucht. Als Kontrolle diente eine Probe ohne siRNA (Kontrolle) und eine Probe mit unspezifischer siRNA (non sil siRNA). Für die Entwicklung wurden spezifische Antikörper gegen Ataxin-2, Crm1 und TIAR verwendet.

Anhand der Entwicklung gegen TIAR (Abbildung 3.7, TIAR) kann man erkennen, dass in allen Ansätzen die gleiche Menge an Lysat eingesetzt wurde.

Die Crm1-Entwicklung weist für alle vier Ansätze die gleiche Proteinbandenintensität auf (Abbildung 3.7, Crm1). Daraus ergibt sich, dass die Konzentration an Ataxin-2 keinen Einfluss auf die Crm1-Konzentration nimmt.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie bietet die Möglichkeit das Ergebnis des Immunoblots zu verifizieren. Des Weiteren lassen sich Aussagen hinsichtlich der Lokalisation von Crm1 in Abhängigkeit des Ataxin-2-Niveaus treffen. Hierfür wurden erneut vier Ansätze von HeLa-Zellen mit den gleichen siRNA-Molekülen (ohne siRNA, non sil siRNA, siRNA #2, siRNA #3) transfiziert. Die Ansätze ohne siRNA und mit non sil siRNA dienen wiederum als Kontrolle. Nach 68 Stunden Inkubation wurden die HeLa-Zellen fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 behandelt. Die aufgenommenen Fluoreszenzintensitäten wurden auf die Kontrollprobe eingestellt. Anschließend wurde bei gleicher Intensität aufgenommen, so dass anhand der Fluoreszenzintensität der Aufnahmen Konzentrationsunterschiede erkannt werden können.

Die Immunfluoreszenz zeigt für die Kontrollen ohne siRNA und mit non sil siRNA keine Intensitätsveränderungen für das Ataxin-2 und das Crm1 (Abbildung 3.8). Im Gegensatz dazu zeigt die Ataxin-2-Färbung (Abbildung 3.8, Ataxin-2) bei Verwendung von siRNA #2 und siRNA #3, an den mit weißen Pfeilen markierten Stellen, eine Abnah-

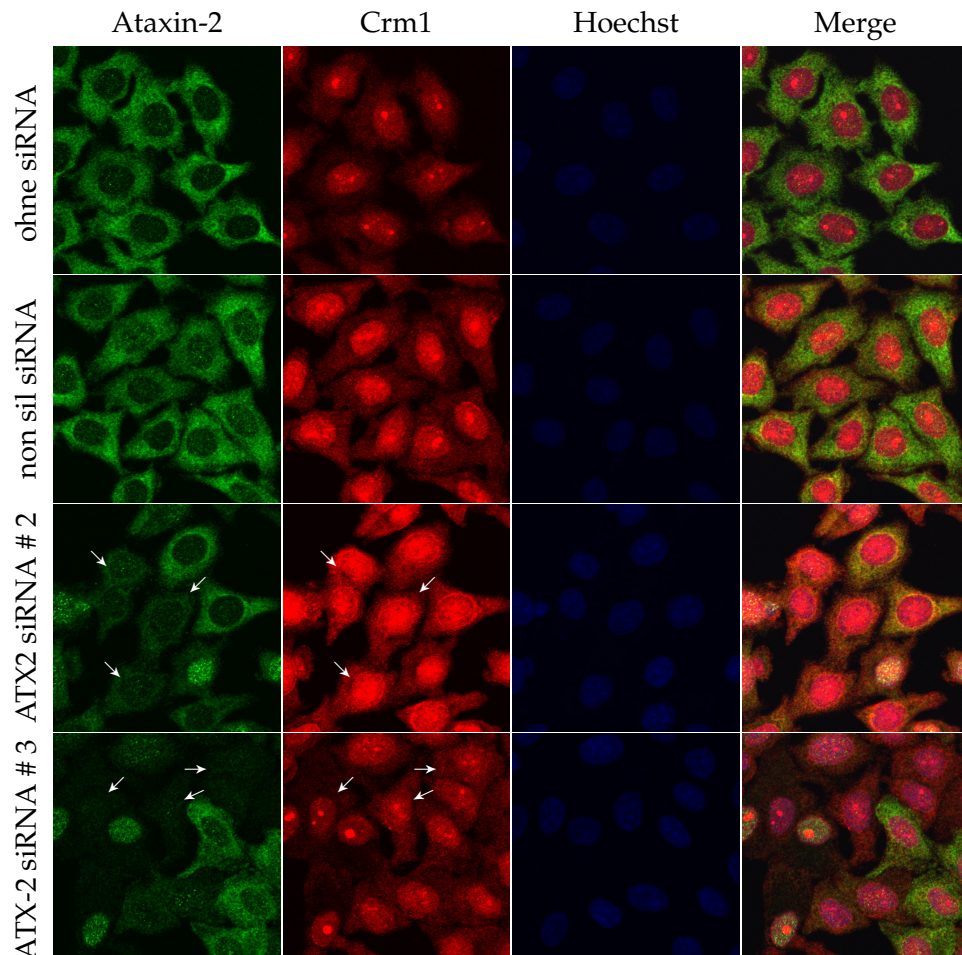


Abbildung 3.8: Ataxin-2-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Crm1 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit Ataxin-2-siRNA-Molekülen transfiziert und für 68 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Als Kontrolle diente eine Probe ohne siRNA und eine mit unspezifisch bindenden siRNA-Molekülen (non sil siRNA). Für die Färbung des Zellkerns wurde Hoechst verwendet. Die Pfeile zeigen Zellen mit erniedrigter Ataxin-2-Konzentration.

me der Fluoreszenzintensität, was gleichbedeutend mit einer Konzentrationsabnahme in den markierten Zellen ist. Die stärkste Intensitätsabnahme wurde mit der siRNA #3 erzielt. Diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen des Immunoblot gegen Ataxin-2 (Abbildung 3.7, Ataxin-2).

Die Färbung gegen das Crm1-Protein (Abbildung 3.8, Crm1) zeigt für alle vier Ansätze keine signifikanten Intensitätsunterschiede oder Lokalisationsänderungen. Der Vergleich pfeilmarkierter und unmarkierter Zellen in der Ataxin-2-Färbung bei Verwendung von siRNA #2 und #3 (Abbildung 3.8, siRNA #2) zeigt, dass die mit Pfeilen markierten Zellen Intensitätsunterschiede zu den nicht markierten zeigen und somit das Proteinlevel von Ataxin-2 verringert ist. Die Crm1-Färbung hingegen zeigt keine signifikanten Intensitätsunterschiede zwischen markierten und nicht markierten Zellen. Auch diese Ergebnisse sind konsistent mit den Ergebnissen des Immunoblots (Abbildung 3.7, Crm1). Die verringerte Konzentration von Ataxin-2 beeinflusst weder die Konzentration noch die Lokalisation von Crm1.

Unter oxidativem Stress akkumuliert Ataxin-2 in Stress Granules. Wie gezeigt werden konnte, führt eine Verringerung der endogenen Ataxin-2-Konzentration zu einer verringerten Anzahl an Stress Granules [NRW⁺07]. Ausgehend von den Ergebnissen des vorhergehenden RNAi-Experiments und der Studien zur zellulären Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2 unter oxidativem Stress (siehe 3.1.3) steht zu erwarten, dass die zelluläre Lokalisation des Crm1 durch eine verringerte Anzahl von Stress Granules nicht beeinflusst wird. Um die Vermutung zu überprüfen, wurde erneut eine Immunfluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Die Versuchsanordnung entspricht dem vorhergehenden RNAi-Experiment (HeLa-Zellen mit non sil siRNA, siRNA #2, siRNA #3 und ohne siRNA) mit einem zusätzlichen Zwischenschritt direkt nach der Inkubationszeit der HeLa-Zellen, in welchem die Zellen einer einstündigen Stressphase mit Arsenit (0,5 mM) ausgesetzt wurden. Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden ebenfalls bei gleichen Intensität vorgenommen, um die Vergleichbarkeit zu wahren.

Die Ataxin-2-Färbung (Abbildung 3.9, Ataxin-2) zeigt für die Kontrollen ohne siRNA und mit non sil siRNA keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl an Stress Granules, während bei Verwendung von siRNA #2 und siRNA #3 eine deutliche Verringerung, mit einem Minimum bei Verwendung der siRNA #3, zu erkennen ist. Die Zellen mit signifikant verringerter Anzahl an Stress Granules sind exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. Das Ergebnis bestätigt die Aussage, dass eine Verringerung des Ataxin-2-Niveaus eine verringerte Anzahl an Stress Granules nach sich zieht.

Die Crm1-Färbung (Abbildung 3.9, Crm1) zeigt für alle verwendeten Ansätze keine signifikanten Intensitätsunterschiede und keine Lokalisationsänderungen. Der Vergleich der Ataxin-2-Färbung mit der Crm1-Färbung bei Verwendung der siRNA #2 (Abbildung 3.9, siRNA #2) zeigt an den pfeilmarkierten Zellen in der Ataxin-2-Färbung eine deutliche Verringerung der Stress Granules. In der Crm1-Färbung sind bei diesen Zellen jedoch keine Intensitätsunterschiede zu den nicht markierten Zellen zu erkennen. Der Vergleich der zwei Färbungen bei Verwendung der siRNA #3 (Abbildung 3.9, siRNA #3) zeigt an den pfeilmarkierten Zellen eine stärkere Verringerung der Stress

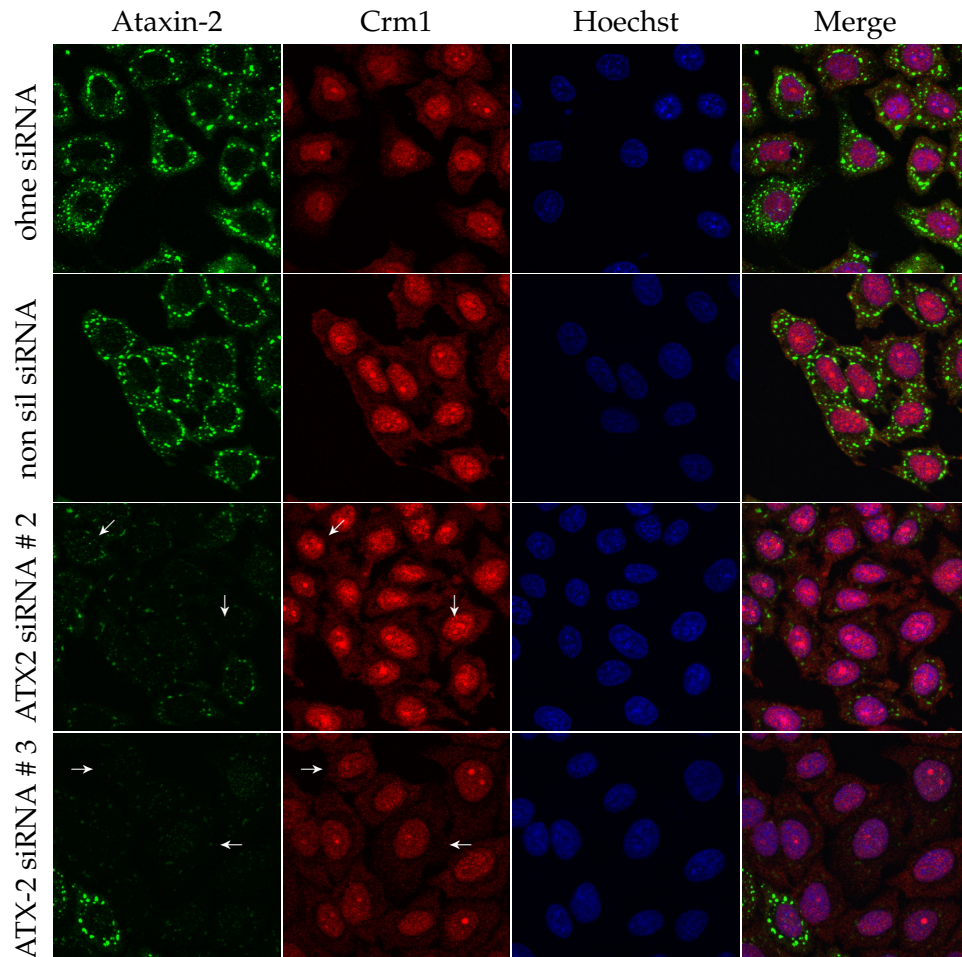


Abbildung 3.9: Ataxin-2-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Crm1 unter Arsenitstress in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, mit siRNA-Molekülen gegen Ataxin-2 transfiziert und für 68 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit gestresst und im Anschluss mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Als Kontrolle diente eine Probe ohne siRNA und eine Probe mit unspezifischer siRNA (non sil siRNA). Die Färbung des Zellkern wurde mit Hoechst durchgeführt. Die Pfeile geben Zellen an, die ein verringertes Level an Ataxin-2 besitzen.

Granules, als bei Verwendung der siRNA #2. Die Intensitäten in der Crm1-Färbung ändern sich jedoch nicht. Die Erwartung, dass eine verringerte Anzahl an Stress Granules keinen Einfluss auf die Lokalisation und Konzentration des Crm1 nimmt, sieht sich in den Ergebnissen bestätigt.

3.1.6 RNAi-Experimente mit Crm1

Bisher konnte die Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 gezeigt werden (siehe 3.1.1) und des Weiteren die Invariabilität von Crm1 bezüglich zellulärer Konzentration und Lokalisation bei Veränderung des endogenen Ataxin-2-Niveaus (siehe 3.1.5) beschrieben werden. Im Weiteren sollte im Gegenzug untersucht werden, ob eine Verringerung des Crm1-Niveaus einen Einfluss auf zelluläre Konzentration oder Lokalisation von Ataxin-2 ausübt.

Um die zelluläre Konzentration des Crm1 senken zu können, wurden spezifische siRNA-Moleküle gegen Crm1 eingesetzt. Sechs Ansätze von HeLa-Zellen wurden transfiziert. Vier der Ansätze enthielten Crm1-spezifische siRNA, nämlich XPO1 siRNA 1, XPO1 siRNA 2, XPO1 siRNA 5 und XPO1 siRNA 6. Ein Ansatz enthielt unspezifische siRNA (non sil siRNA) und ein Ansatz wurde zur Kontrolle der siRNA-Wirksamkeit ohne siRNA angesetzt. Nach 68 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert, 20 µg der Lysate auf einem SDS-Polyacrylamidgel getrennt und im Anschluss auf eine Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Membran wurde im ersten Schritt gegen Crm1 entwickelt, um die Wirksamkeit der siRNA bewerten zu können. Im zweiten Schritt wurde die Membran gewaschen und zur Ladekontrolle gegen TIAR entwickelt, damit sichergestellt werden konnte, dass überall gleiche Proteinmengen mit dem Lysat aufgetragen wurden. Für den abschließenden Schritt wurde die Membran erneut gewaschen und gegen Ataxin-2 entwickelt, um die Auswirkungen des veränderten Crm1-Niveaus auf die Ataxin-2-Konzentration sichtbar zu machen.

Der Immunoblot gegen Crm1 (Abbildung 3.10, Crm1) zeigt nur für die XPO1 siRNA 1 eine veränderte Bandenintensität, wohingegen die anderen fünf Banden gleiche Intensitäten zeigen. Folglich zeigt nur die XPO1 siRNA 1 eine signifikante Abnahme des Crm1-Niveaus.

Die Ladekontrollentwicklung gegen TIAR (Abbildung 3.10, TIAR) zeigt für alle Ansätze gleichbleibende Proteinbandenintensitäten, was die gewünschte Gleichheit der Menge an vorhandenem Protein im aufgetragenen Lysat bestätigt.

Die Entwicklung der Nitrozellulosemembran gegen Ataxin-2 (Abbildung 3.10, Ataxin-2) offenbart keine signifikanten Abweichungen in den Bandenintensitäten. Demzufolge verhält sich die zelluläre Ataxin-2-Konzentration invariant in Bezug auf die Verringerung des Crm1-Niveaus.

Nachdem das Verhalten der Ataxin-2-Konzentration bei Crm1-Konzentrationsverringering untersucht wurde, gilt es im Folgenden zu prüfen, ob sich die Ataxin-2-Lokalisation bei einer verringerten endogenen Crm1-Konzentration verändert. Um die zelluläre Lokalisation beobachten zu können wurde die Immunfluoreszenzmikroskopie

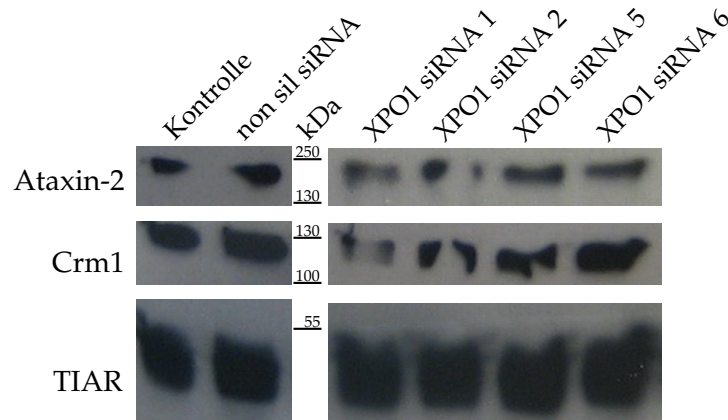


Abbildung 3.10: Analyse eines Crm1-Knock-Downs in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Molekülen gegen Crm1 (XPO1) transfiziert und 68 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert, 20 µg der Lysate auf einem SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Die Membran wurde mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2, TIAR und Crm1 entwickelt. Als Kontrolle diente eine Probe ohne siRNA und eine Probe mit einer unspezifischen siRNA (non sil siRNA).

verwendet, welche gleichzeitig die Möglichkeit bietet das vorherige Ergebnis bezüglich der Ataxin-2-Konzentration zu verifizieren.

Für die Untersuchung wurden nur vier anstelle von sechs HeLa-Zellen-Ansätzen vorbereitet, da im vorhergehenden Versuch keine signifikanten Konzentrationsunterschiede des Crm1 bei Verwendung von XPO1 siRNA2, XPO1 siRNA5 und XPO1 siRNA 6 (Abbildung 3.10, Crm1) festgestellt werden konnten. XPO1 siRNA2 wurde stellvertretend für diese drei siRNA-Moleküle als einer der vier Ansätze verwendet. Die drei anderen Ansätze von HeLa-Zellen enthielten unspezifische siRNA (non sil siRNA), keine siRNA und XPO1 siRNA 1. Nach 68 stündiger Inkubationszeit wurden die Ansätze fixiert und anschließend für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Für alle Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde die gleiche Lichtintensität verwendet, damit Unterschiede in der Farbtintensität der Aufnahmen den direkten Rückschluss auf die Konzentration des jeweiligen Proteins zulassen.

Die Crm1-Färbung (Abbildung 3.11, Crm1) zeigt bei Verwendung von XPO1 siRNA 1 und XPO1 siRNA 2 eine deutliche Intensitätsabnahme gegenüber der Kontrolle ohne siRNA und der Verwendung von non sil siRNA. Weiße Pfeile markieren exemplarisch Zellen mit deutlich erkennbarer Intensitätsabnahme, welche die verringerte Crm1-Konzentration anzeigen. Die Abnahme der Crm1-Konzentration bei Verwendung von XPO1 siRNA 2 ist in der Immunfluoreszenzmikroskopie signifikanter als im Crm1-Immunoblot (Abbildung 3.10, Crm1), wohingegen das Ergebnis bei Verwendung von XPO1 siRNA 1 bei beiden Versuchen eine konsistente Konzentrationsabnahme auf-

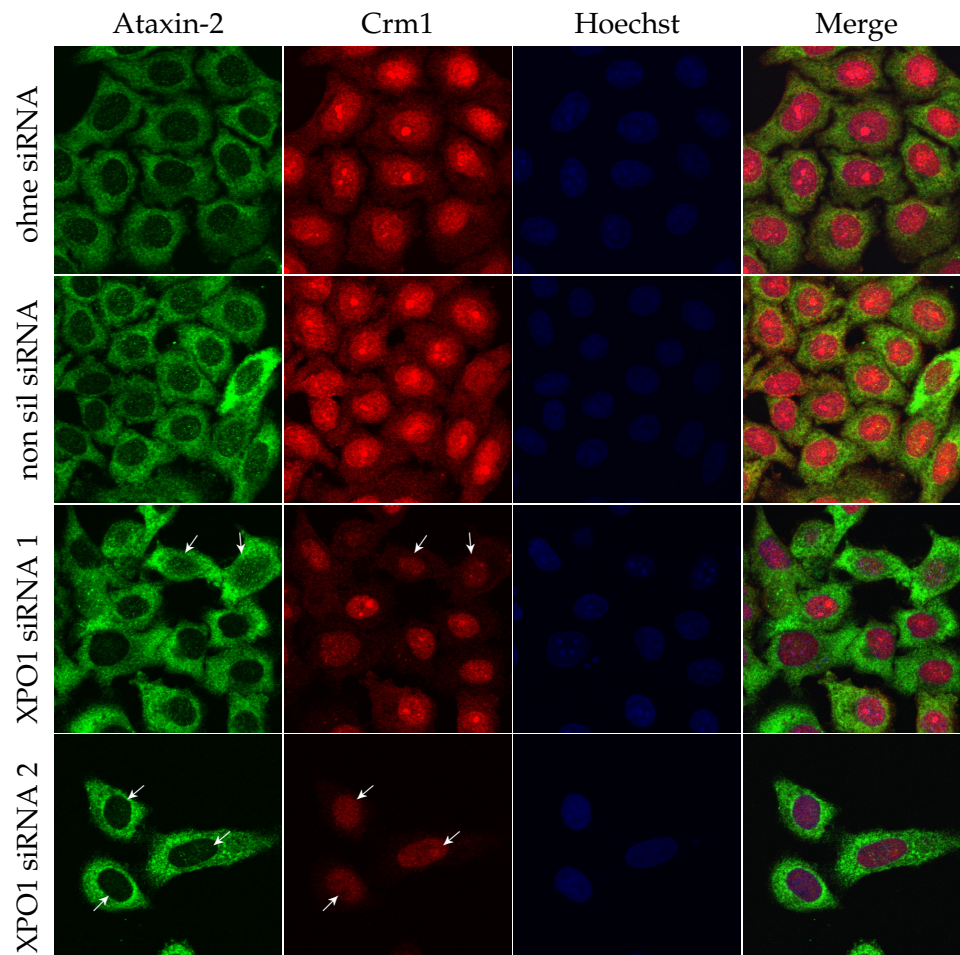


Abbildung 3.11: Crm1-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit siRNA-Molekülen gegen Crm1 transfiziert, für 68 Stunden inkubiert und anschließend für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Als Kontrolle dient ein Ansatz ohne siRNA und ein Ansatz mit unspezifischer siRNA (non sil siRNA). Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile geben Zellen an, in denen das Crm1-Level erniedrigt ist.

weist. Die zu erkennende Intensitätsabnahme von der Kontrollaufnahme ohne siRNA zu den Aufnahmen bei Verwendung von XPO1 siRNA 1 und XPO1 siRNA 2 beweist die Abnahme der Crm1-Konzentration und damit die Wirksamkeit der spezifischen siRNA-Moleküle.

Die Ataxin-2-Färbung (Abbildung 3.11, Ataxin-2) zeigt keine signifikanten Intensitätsunterschiede für alle vier Ansätze. Die mit weißen Pfeilen markierten Zellen sind diejenigen, welche ein verringertes Crm1-Niveau aufweisen. Der direkte Vergleich von pfeilmarkierten mit unmarkierten Zellen offenbart keine Intensitätsabweichungen oder Lokalisationsänderungen des Ataxin-2. Demzufolge ist die zelluläre Ataxin-2-Konzentration nicht beeinflusst durch das verringerte Crm1-Niveau, was die Ergebnisse des Ataxin-2-Immunoblots (Abbildung 3.10, Ataxin-2) bestätigt. Als neues Ergebnis wird die Lokalisationsinvarianz unter Verringerung des Crm1-Niveaus festgehalten.

Ausgehend von den Ergebnissen des vorherigen RNAi-Experimentes und dem Wissen über die Akkumulation von Ataxin-2 in Stress Granules unter oxidativem Stress führte es zur Fragestellung, ob das Verringern des Crm1-Niveaus einen Einfluss auf die Anzahl oder Lokalisation der Stress Granules nehmen könnte. Da die Ataxin-2-Konzentration und -Lokalisation durch die Crm1-Niveausenkung nicht beeinflusst wurde, steht zu überprüfen, ob Gleiches auch für die Stress Granules gilt.

Um die Fragestellung zu untersuchen wurden vier Ansätze von HeLa-Zellen im Schema des vorhergehenden RNAi-Experiments (ohne siRNA, non sil siRNA, XPO1 siRNA 1, XPO1 siRNA 2) transfiziert. Nach hinreichender Inkubationszeit wurden die Zellen vor dem Fixieren einer einstündigen Stressphase mit 0,5 mM Arsenit unterzogen, anschließend fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 für die Immunfluoreszenzmikroskopie behandelt. Für die Aufnahmen der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde eine konstante Lichtintensität eingehalten, um die Vergleichbarkeit der Aufnahmen zu gewährleisten und Rückschlüsse auf die Konzentrationsverhältnisse zu ermöglichen.

Die Crm1-Färbung (Abbildung 3.12, Crm1) zeigt bei Verwendung von XPO1 siRNA 1 und XPO1 siRNA 2 eine signifikante Intensitätsabnahme gegenüber der Kontrolle ohne siRNA. Exemplarisch sind Zellen mit deutlich erkennbarer Intensitätsabnahme mit weißen Pfeilen markiert. Die Verwendung von XPO1 siRNA 2 zeigt auch in diesem Versuch eine stärkere Wirkung als im Immunoblot (Abbildung 3.10, Crm1), während die Verwendung von XPO1 siRNA 1 vergleichbare Wirkung wie im Immunoblot aufweist. Bei Verwendung von non sil siRNA ist keine Intensitätsabnahme in der Aufnahme zu erkennen, was keine Konzentrationsverringerung des Crm1 bedeutet und konsistent mit den Ergebnissen des Immunoblots ist.

Die Ataxin-2-Färbungen (Abbildung 3.12, Ataxin-2) zeigten für alle Aufnahmen die gleiche Farbintensität und keine signifikanten Unterschiede in der Formation von Stress Granules. In den Aufnahmen der Ansätze mit XPO1 siRNA 1 und XPO1 siRNA 2 sind die Zellen mit weißen Pfeilen markiert, welche ein verringertes Crm1-Niveau besitzen. Der Vergleich markierter und unmarkierter Zellen weist keine verringerte Anzahl von Stress Granules auf.

Daraus lässt sich schließen, dass die Verringerung der zellulären Crm1-Konzentration

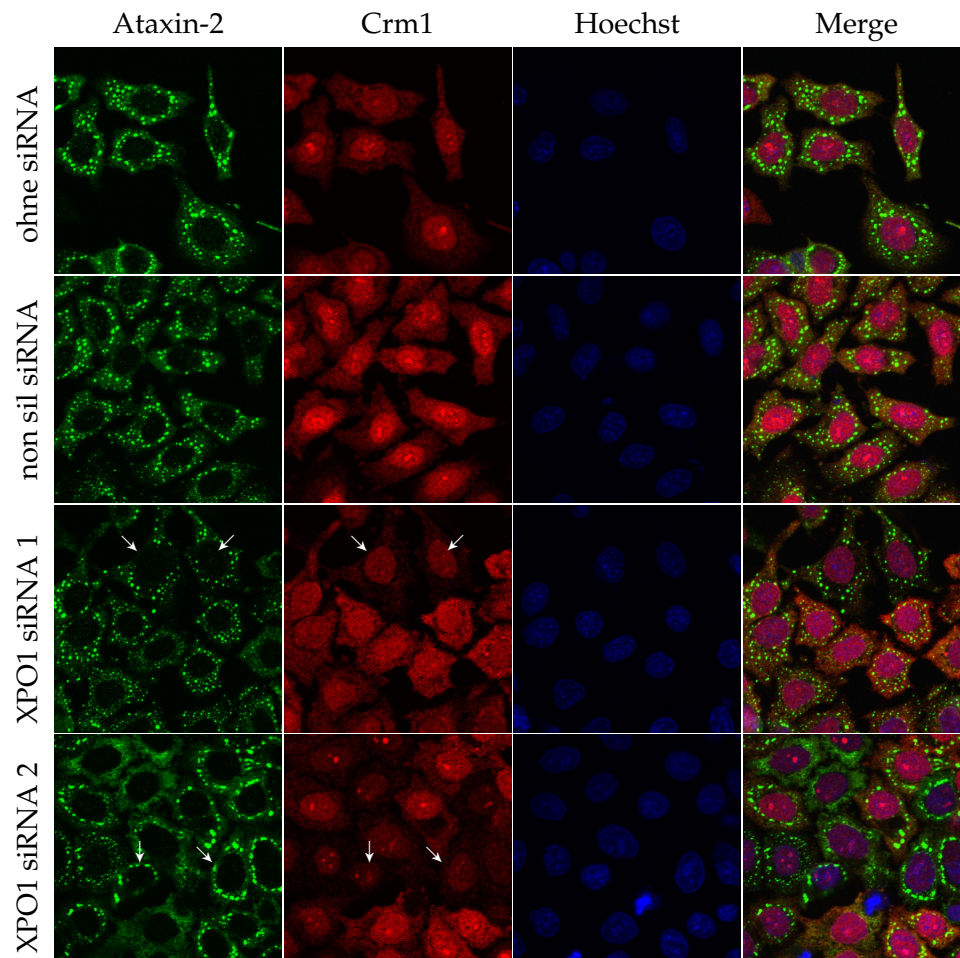


Abbildung 3.12: Crm1-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 unter Arsenitstress in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit XPO1 siRNA-Molekülen transfiziert, für 68 Stunden inkubiert und anschließend für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt. Im Anschluß wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und Crm1 gefärbt. Der Zellkern wurde mit Hoechst gefärbt. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne siRNA und ein Ansatz mit einer unspezifischen siRNA (non sil siRNA). Die Pfeile geben Zellen mit erniedrigtem Crm1-Niveau an.

on keinen Einfluss auf die Lokalisation oder Anzahl der Stress Granules nimmt.

Bis zu diesem Zeitpunkt konnte bei Überexpression von Ataxin-2 eine Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 durch Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden (siehe 3.1.1). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 und Crm1 weder unter Normalbedingungen (siehe 3.1.2) noch unter oxidativem Stress (siehe 3.1.3) erkennbar kolokalisieren und dass Ataxin-2 nicht Crm1-abhängig transportiert wird. Bei Hemmung des Crm1-abhängigen Transports durch LMB bildet Crm1 jedoch eine ringförmige Struktur um den Kern und kolokalisiert dort mit Ataxin-2 (siehe 3.1.4). Unter Normalbedingungen kann aus den Einzelfärbungen, welche sowohl für Ataxin-2 als auch Crm1 eine zytoplasmatische Verteilung aufzeigen, das Zytoplasma als Interaktionsraum angenommen werden (siehe 3.1.2). Durch RNAi-Experimente konnte gezeigt werden, dass Crm1 bei Verringerung des zellulären Ataxin-2-Niveaus weder Lokalisation noch Konzentration ändert (siehe 3.1.5) und das Ataxin-2 bei Verringerung des zellulären Crm1-Niveaus ebenfalls weder Lokalisation noch Konzentration ändert (siehe 3.1.6).

3.2 Die zelluläre Lokalisation von Ataxin-2

Im *D. melanogaster*-Modell konnte gezeigt werden, dass dAtaxin-2 von dAtaxin-1 in seiner Lokalisation beeinflusst wird [ARPL⁺07] und das dAtaxin-2 die Toxizität von dAtaxin-1 und dAtaxin-7 beeinflussen bzw. modulieren kann [LLM⁺07].

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob die vorangegangenen Ergebnisse in Säugerzellen ebenfalls nachgewiesen werden können. Hierfür wurde die Lokalisation des Ataxin-2 innerhalb der Säugerzelle mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht.

3.2.1 Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Ataxin-1-Proteins

Für *D. melanogaster* konnte im Rahmen der Untersuchungen gezeigt werden, dass die Überexpression von dAtaxin-1 zu einer Lokalisationsänderung von dAtaxin-2 führt. Das normalerweise zytoplasmatische dAtaxin-2 wird bei Überexpression von dAtaxin-1Q82 in den Zellkern rekrutiert und bildet dort mit Ataxin-1 Aggregate [ARPL⁺07]. Daher sollte im ersten Schritt geprüft werden, ob das Ataxin-1-Protein auch in Säugerzellen Ataxin-2 in den Zellkern rekrutiert und Ataxin-2 ebenfalls in Proteinaggregaten lokalisiert.

Dafür wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, mit pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und nach hinreichender Inkubationszeit für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag behandelt.

Die Ataxin-2-Färbungen (Abbildung 3.13) zeigt eine zytoplasmatische Verteilung des Ataxin-2-Proteins und eine Kolokalisation von Ataxin-1 und Ataxin-2 im Kern in Proteinaggregaten. Weiße Pfeile markieren exemplarisch diese Aggregate. Die Ataxin-1-Färbungen (gegen Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82) zeigen Aggregatbildung des Ataxin-

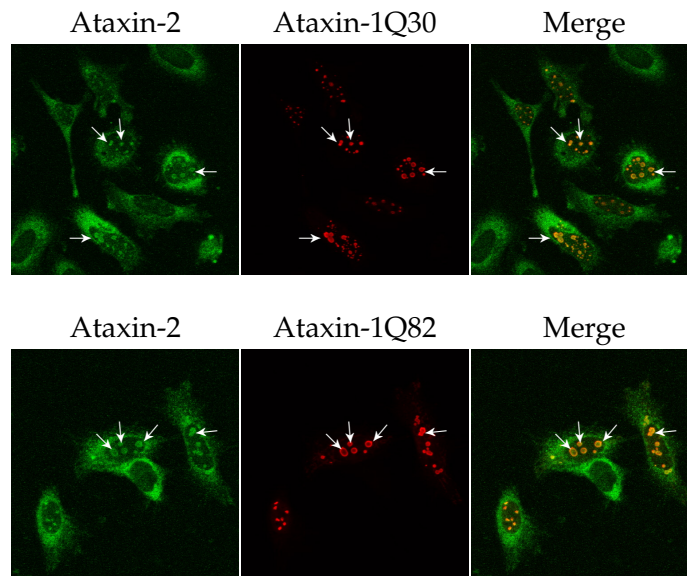


Abbildung 3.13: Überexpression von Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen. Die HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden auf Deckgläschen inkubiert, mit pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den jeweiligen Flag-Tag gefärbt. Die Pfeile zeigen Aggregate im Zellkern.

1 im Kern. Die Kolokalisation von Ataxin-1 und Ataxin-2 ist in der Merge-Aufnahmen deutlich zu erkennen (Abbildung 3.13, Merge) und in allen Bildern durch Pfeile markiert.

Bemerkenswert ist, dass sowohl bei Überexpression von Ataxin-1Q82 als auch Ataxin-1Q30 eine Rekrutierung des Ataxin-2 vom Zytoplasma in den Zellkern zu beobachten ist. Laut der Ergebnissen des *D. melanogaster*-Modells [ARPL⁺07] stand dies nur für die expandierte Form des Ataxin-1-Proteins mit 82 aufeinanderfolgenden Glutaminwiederholungen zu erwarten.

Um sicherzustellen, dass die gebildeten Aggregate des Ataxin-2-Proteins tatsächlich im Kern lokalisiert sind, wurden die Überexpressionsstudien mit zusätzlicher Kernfärbung wiederholt. Dabei wurden die Zellen wie bereits beschrieben ausgesät und transfiziert. Nach anschließender Fixierung wurde zuerst eine Einzelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag von Ataxin-1 vorgenommen, um die Effizienz der Transfektion zu kontrollieren. Des Weiteren wurde eine Doppelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag des Ataxin-1-Fusionsproteins vorgenommen und das Ergebnis mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie aufgenommen.

Die Einzelfärbung im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q82 (Abbildung 3.14, a) zeigt für das Ataxin-1Q82 eine nukleäre Verteilung und Aggregatbildung. Die Doppel-

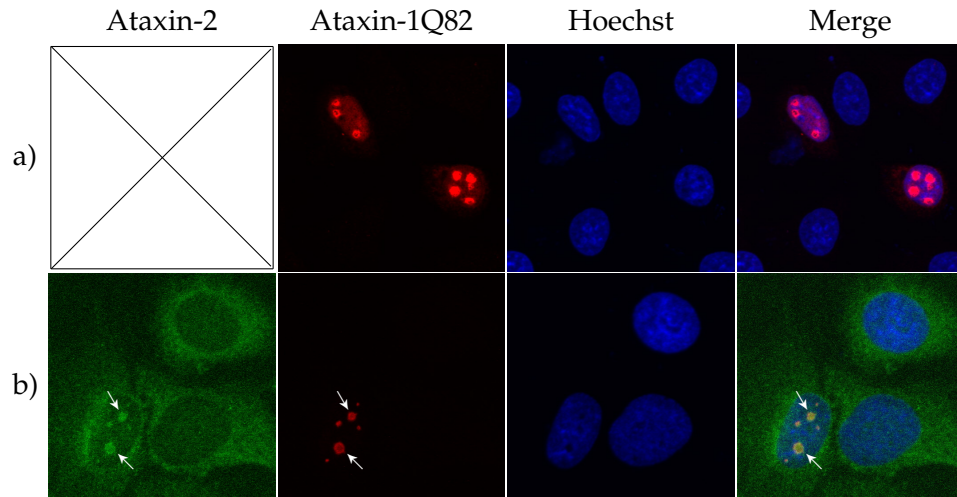


Abbildung 3.14: Überexpressionsstudien von Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden auf Deckgläschen inkubiert, mit pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen Aggregate im Zellkern. a) zeigt die Einzelfärbung von Ataxin-1 und b) die Doppelfärbung von Ataxin-1 und Ataxin-2.

färbung (Abbildung 3.14, b) von Ataxin-1 und Ataxin-2 zeigt für Ataxin-2 eine Verteilung im Zytoplasma und zusätzlich eine Färbung von Ataxin-2 im Kern. Die Überlagerung der Bilder der Immunfärbung von Ataxin-1 und Ataxin-2 deutet auf die Kollokalisierung der beiden Proteine hin. Dies ist durch weiße Pfeile hervorgehoben. Die Einzelfärbung zur Überexpression von Ataxin-1Q82 bestätigt das vorherige Ergebnis und bestätigt den Kern als den Ort der Aggregation von Ataxin-2 und Ataxin-1Q82.

Die Einzelfärbung im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q30 (Abbildung 3.15, a) zeigt eine nukleäre Verteilung des Ataxin-1Q30 mit Aggregatbildung. Die Doppelfärbung im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q30 (Abbildung 3.15, b) zeigt für das Ataxin-2 eine zytoplasmatische Verteilung mit Akkumulaten im Kern. Weiße Pfeile markieren exemplarisch Aggregate von Ataxin-2 im Kern. Diese Markierungen wurden in gleicher Lage in der Ataxin-1Q30-Färbung aufgetragen. Zu erkennen ist in der Ataxin-1Q30-Färbung, dass an den Positionen der Pfeile ebenfalls Aggregate des Ataxin-1Q30 zu finden sind. Diese Kollokalisierung lässt sich in der Merge-Aufnahme nochmals nachvollziehen. Die Einzelfärbung zur Überexpression von Ataxin-1Q30 validiert, dass in Säugerzellen auch die kürzere Form des Ataxin-1 mit 30 aufeinanderfolgenden Glutaminen das Ataxin-2 in den Kern rekrutiert und dort mit ihm aggregiert.

In einem früheren Abschnitt wurde die Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 gezeigt (siehe 3.1.1) und daraufhin die Lokalisation von Crm1 in Abhängigkeit vom Ataxin-2-Niveau untersucht (siehe 3.1.5). Das vorhergehende Experiment zeigte eine In-

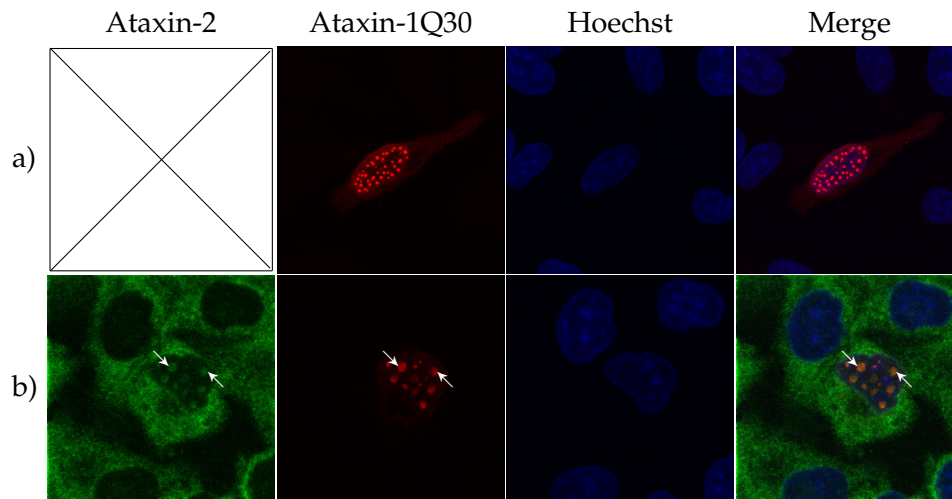


Abbildung 3.15: Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden auf Deckgläschen inkubiert, mit pcDNA1/SCA1Q30 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile geben Ataxin-1-Aggregate an. a) ist die Einzelfärbung von Ataxin-1 und b) die Doppelfärbung von Ataxin-1 und Ataxin-2.

teraktion zwischen Ataxin-2 und zwei Ataxin-1-Formen bei Überexpression. Da Ataxin-2 sowohl mit Ataxin-1 als auch Crm1 in Wechselwirkung steht, legt die Transitivität nahe, dass auch Crm1 und die zwei Ataxin-1-Formen in Wechselwirkung stehen könnten. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob die Überexpression dieser zwei Ataxin-1-Formen einen Einfluss auf die Lokalisation von Crm1 nimmt.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und nach 24 stündiger Inkubationszeit für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Crm1 und den Flag-Tag (Flag-Ataxin-1) gefärbt.

Die Ataxin-1-Färbungen (Abbildung 3.16, Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82) zeigen die bereits bekannten und erwarteten Aggregate von Ataxin-1 im Kern. Die Crm1-Färbung (Abbildung 3.16, Crm1) zeigt sowohl eine zytoplasmatische, als auch eine nukleäre Verteilung des Crm1 mit Strukturbildung im Kern. Dies entspricht der Verteilung unter Normalbedingungen, wie sie bereits in einer früheren Einzelfärbung des Crm1 gesehen wurde (Abbildung 3.2, Crm1). Die Merge-Bilder zeigen für Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 keine Kolo-kalisation, obwohl beide Proteine im Nukleus lokalisiert sind. Es zeigt sich, dass Crm1 seine Lokalisation bei Überexpression von Ataxin-1Q30 oder Ataxin-1Q82 nicht ändert.

In diesem Abschnitt konnte an Säugerzellen gezeigt werden, dass SCA1Q82 bei Überexpression Aggregate im Zellkern bilden, Ataxin-2 vom Zytoplasma in den Zellkern

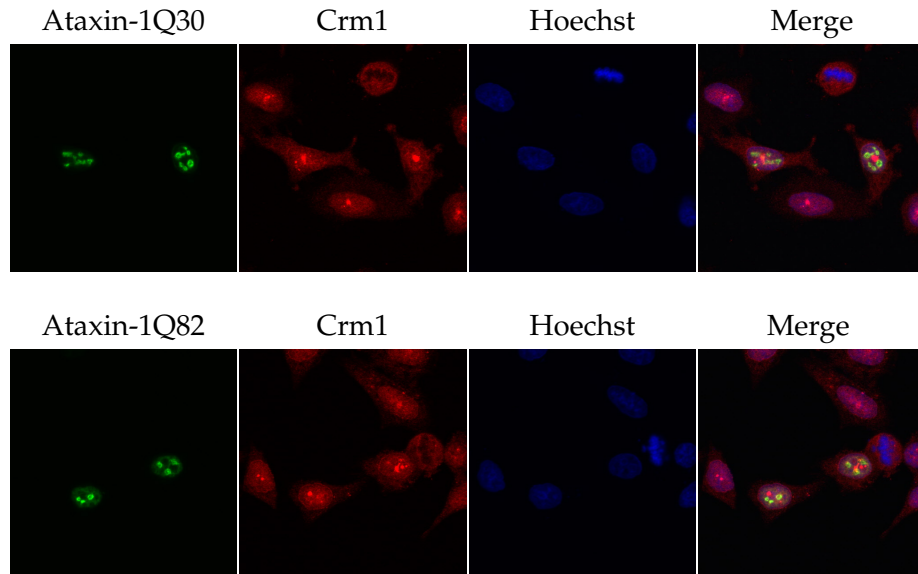


Abbildung 3.16: Lokalisation von Crm1 und Ataxin-1Q30 bzw. Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen: HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit pcDNASCA/Q130 und pcDNASCA/Q182 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit spezifischen Antikörpern gegen Crm1 und den Flag-Tag gefärbt.

rekrutiert und dort mit ihm aggregiert. Damit konnten die Ergebnisse aus dem *D. melanogaster*-Modell [ARPL⁺07] in Säugerzellen verifiziert werden. Zusätzlich konnte für Säugerzellen gezeigt werden, dass sich Ataxin-2 äquivalent verhält, wenn SCA1Q30 überexprimiert wird. Eine Beeinflussung der Lokalisation von Crm1 konnte bei Überexpression von SCA1Q30 oder SCA1Q82 nicht festgestellt werden.

3.2.2 Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Ataxin-7-Proteins

Für das Protein Ataxin-7 konnte gezeigt werden, dass es bei Überexpression ein vorrangig intranukleär lokalisiertes Protein ist und ebenso wie Ataxin-1 intranukleäre Akkumulate bilden kann [HDD⁺98, MMB03]. Aufgrund dieses ähnlichen Verhaltens bei Überexpression wäre es denkbar, dass Ataxin-7 ebenfalls zu einer Lokalisationsänderung des Ataxin-2 aus dem Zytoplasma in den Kern führt und dort mit ihm akkumuliert. Daher sollte nachfolgend untersucht werden, ob die Wirkung auf Ataxin-2 eine Spezifität der zwei Ataxin-1-Formen ist oder von Ataxin-7 ebenfalls gezeigt wird.

Hierfür wurden HeLa-Zellen ausgesät und nach 24 Stunden Inkubationszeit mit pcDNA3.1/SCA7Q10 und pcDNA3.1/SCA7Q60 transfiziert. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie in einer Einzelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag (Flag-Ataxin-7) und in einer Doppelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag (Flag-Ataxin-7) und Ataxin-2 gefärbt.

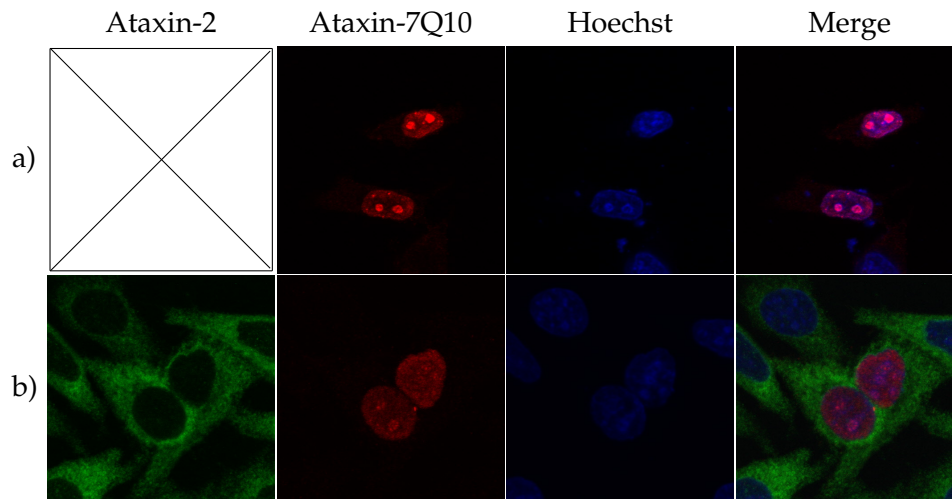


Abbildung 3.17: Studien zur Überexpression von Ataxin-7Q10 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden auf Deckgläschen inkubiert, mit pcDNA3.1/SCA7Q10 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. a) zeigt die Einzelfärbung von Ataxin-7 und b) die Doppelfärbung von Ataxin-7 und Ataxin-2.

In der Einzelfärbung im Falle der Überexpression von Ataxin-7Q10 (Abbildung 3.17, a) zeigt die Ataxin-7Q10-Färbung ausschließlich eine intranukleäre Verteilung des Ataxin-7-Proteins mit Akkumulaten. In der Doppelfärbung (Abbildung 3.17, b) ist in der Ataxin-2-Färbung eine ausschließlich zytoplasmatische Verteilung des Ataxin-2 zu erkennen. Die Ataxin-7Q10-Färbung zeigt, wie in der Einzelfärbung, eine intranukleäre Verteilung des Ataxin-7 mit Akkumulaten. Dieser Befund zeigt, dass die Proteine Ataxin-2 und Ataxin-7 unter diesen Bedingungen räumlich voneinander getrennt sind und somit kein Raum für Wechselwirkungen existiert. Eine Lokalisationsänderung des Ataxin-2 konnte nicht beobachtet werden, da Ataxin-2, wie bereits gezeigt wurde, unter Normalbedingungen ebenfalls ausschließlich eine zytoplasmatische Verteilung zeigt (Abbildung 3.2, Ataxin-2).

Die Einzelfärbung im Falle der Überexpression von Ataxin-7Q60 (Abbildung 3.18, a) zeigt für Ataxin-7Q60 eine nukleäre Verteilung ohne erkennbare Akkumulate. In der Doppelfärbung (Abbildung 3.18, b) zeigt die Ataxin-2-Färbung eine ausschließlich zytoplasmatische Verteilung, was den Verhältnissen der Einzelfärbung unter Normalbedingungen entspricht (Abbildung 3.2, Ataxin-2). Die Ataxin-7Q60-Färbung zeigt, wie in der Einzelfärbung (Abbildung 3.18, a), eine nukleäre Verteilung ohne Akkumulate. Es kann keine Lokalisationsänderung des Ataxin-2 festgestellt werden.

Die durchgeführten Studien bei Überexpression der Ataxin-7-Formen Ataxin-7Q10 und Ataxin-7Q60 zeigen keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation des Ataxin-2-Proteins.

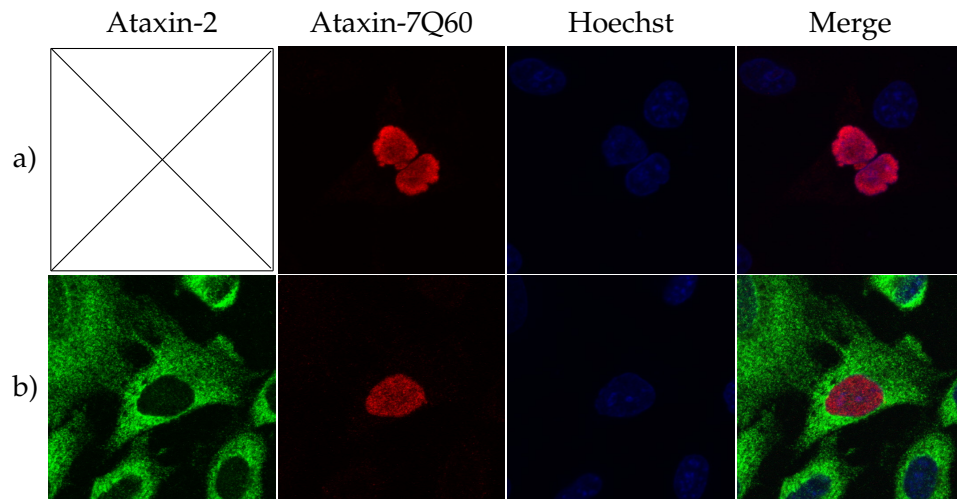


Abbildung 3.18: Studien zur Überexpression von Ataxin-7Q60 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden 24 Stunden auf Deckgläschen inkubiert, mit pcDNA3.1/SCA7Q60 transfiziert und weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. a) zeigt die Einzelfärbung von Ataxin-7 und b) die Doppel-färbung mit einer Färbung gegen Ataxin-7 und Ataxin-2.

Die Verhaltensähnlichkeit der Ataxin-7-Formen bei Überexpression zu den Ataxin-1-Formen Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 bei Überexpression bedeuten keine äquivalente Rekrutierung von Ataxin-2 in den Zellkern.

3.2.3 Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Huntingtin-Proteins

Für Ataxin-2 und Huntingtin, dass die Polyglutaminerkrankung Chorea Huntington auslöst, konnte in Säugerzellen jeweils eine Interaktion mit dem Endophilin-A3 gezeigt werden. Zusätzlich wurde eine Kolo-kalisation der beiden Proteine in mehreren Zelllinien demonstriert [RNA⁺05]. Untersuchungen in der Hefe *S. cerevisiae* ergaben, dass die Interaktion von Ataxin-2 und Endophilin-A3 bei einer zeitgleichen Expression von Huntingtin negativ beeinflusst wird und dass Ataxin-2 und Huntingtin um die Bindung an Endophilin-A3 konkurrieren. Eine mögliche Interaktion von Ataxin-2 und Crm1 wurde jedoch noch nicht untersucht. Chorea Huntington zeichnet sich auf zellulärer Ebene durch eine Akkumulatbildung im nukleären, perinukleären und zytoplasmatischen Bereich aus. In diesen Akkumulaten sind viele weitere Proteine enthalten. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass verschiedene glutaminreiche Regionen verschiedener Proteine miteinander interagieren können [WWG⁺06]. Daher sollte in den folgenden Versuchen eine mögliche Protein-Protein-Wechselwirkung der beiden Polyglutaminproteine Ataxin-2 und Huntingtin untersucht werden.

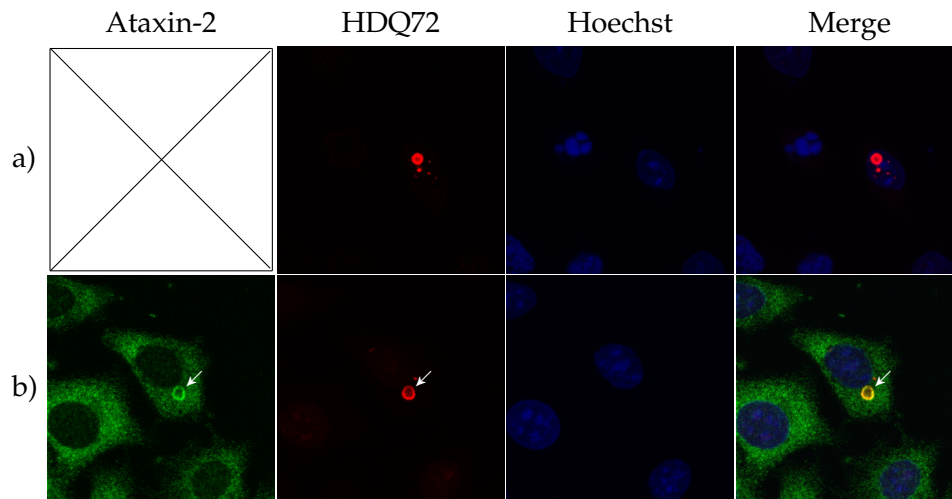


Abbildung 3.19: Studien zur Überexpression von HDQ72 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. a) zeigt die Einzelfärbung von HDQ72 und b) die Doppelfärbung mit einer Färbung gegen HDQ72 und Ataxin-2.

Zu diesem Zweck wurden HeLa-Zellen mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert, nach 24 Stunden Inkubationszeit fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie in einer Einzelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag von Huntingtin gefärbt. Weiterhin wurde eine Doppelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag (Flag-HD) durchgeführt.

Die Einzelfärbung (Abbildung 3.19, a) zeigt intranukleäre HDQ72-Akkumulate. Die Doppelfärbung (Abbildung 3.19, b) zeigt in der HDQ72-Färbung ein deutliches Akkumulat in der Peripherie des Nukleus, welches mit einem weißen Pfeil markiert wurde. Die Ataxin-2-Färbung zeigt eine zytoplasmatische Verteilung des Ataxin-2. Zusätzlich findet sich eine Akkumulation an der pfeilmarkierten Stelle des Huntingtin-Akkumulates. Die Merge-Aufnahme verdeutlicht die Kolokalisation durch die gelbliche Färbung. Dieses Ergebnis zeigt, dass Ataxin-2 und HDQ72 in Wechselwirkung miteinander stehen und Ataxin-2 in das Huntingtin-Akkumulat rekrutiert wird.

Wie bereits gezeigt wurde interagieren die zwei Ataxin-1-Formen mit Ataxin-2 und Ataxin-2 mit Crm1, mit Hilfe des Transitivitätsprinzips, wurde eine Interaktion zwischen den zwei Ataxin-1-Formen und Crm1 postuliert. Die gleiche Annahme ließ sich, aus der im vorangegangenen Versuch gezeigten Interaktion von HDQ72 und Ataxin-2, für eine putative Interaktion von HDQ72 und Crm1 aufstellen. Daher wurde im Folgenden der Einfluss einer Überexpression von HDQ72 auf die Lokalisation von Crm1 untersucht.

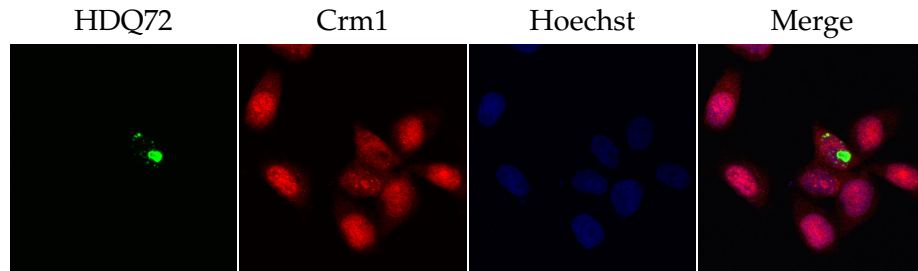


Abbildung 3.20: Intrazelluläre Lokalisation von Crm1 und HDQ72 in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, anschließend mit HDQ72 transfiziert und für weitere 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie fixiert und mit speziellen Antikörpern gegen Crm1 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst.

Dafür wurden erneut HeLa-Zellen mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert, nach 24 stündiger Inkubationszeit fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Crm1 und den Flag-Tag (Flag-HD) gefärbt.

Die Anfärbung des HDQ72 (Abbildung 3.20, HDQ72) zeigt nukleäre Akkumulate. Die Anfärbung des Crm1 (Abbildung 3.20, Crm1) zeigt eine starke intranukleäre, schwach zytoplasmatische Verteilung, was der Einzelfärbung unter Normalbedingungen entspricht (Abbildung 3.2, Crm1). Die Merge-Aufnahme zeigt jedoch keine Kolo-kalisation von Crm1 und HDQ72 in den Huntingtin-Akkumulaten. Die Lokalisation von Crm1 wird durch die Überexpression von HDQ72 demnach nicht beeinflusst.

Am Anfang dieses Abschnitts konnte die Kolo-kalisation von Ataxin-2 und HDQ72 beobachtet werden und somit nachgewiesen werden, dass die Proteine in Wechselwirkung miteinander stehen. Der Charakter dieser Wechselwirkung konnte daraus jedoch nicht genauer beschrieben werden. Die Yeast-Two-Hybrid-Analyse bietet die Möglichkeit den Charakter der Interaktion näher zu ergründen und eine direkte Interaktion nachzuweisen.

Hierfür wurden Hefezellen (siehe 2.2.14) mit dem Vektor pBTM117c (LexA) und dem Vektor pACT4-1b (AD) transformiert. Im Vektor pBTM117c wurde jeweils eine der kodierenden Sequenzen von HDQ25, HDQ42, HDQ72 oder Ataxin-2 F4 als Insert eingesetzt. Im Vektor pACT4-1b wurde jeweils eine der kodierenden Sequenzen der Ataxin-2-Fragmente 22NT, LSM, F5 oder F4 als Insert verwendet. Für die Positivkontrolle wurde der Vektor pBTM117c mit der kodierenden Sequenz des Ataxin-2-Fragments F4 als Insert und der Vektor pACT4-1b mit der kodierenden Sequenz des Proteins PABC als Insert transformiert. Für die Negativkontrolle wurden die Vektoren pBTM117c und pACT4-1b ohne Inserts verwendet. Nach der Transformation wurden die Ansätze auf SD II-Platten ausplattiert und für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Klone in einem geordneten Schema jeweils auf eine SD II-Platte, eine SD IV-Platte und eine Membran gestempelt. Dieser Ansatz wurde weitere 72 Stunden inkubiert. Die Membran wurde im Anschluss für einen β -Gal-Test verwendet und zusam-

men mit den SD-Platten dokumentiert.

Die Aufnahme der SD II-Platte (Abbildung 3.21, SD II) zeigt für alle Positionen gewachsene Klone. Daran ist zu erkennen, dass alle Positionen der Platte mit Hefezellen belegt wurden und diese beide Plasmide beinhalten. Die Aufnahme der SD IV-Platte (Abbildung 3.21, SD IV) zeigt in der Spalte der Positivkontrolle vier Kolonien und an allen anderen Positionen keine Kolonien. Die Membran des β -Gal-Tests (Abbildung 3.21, β -Gal) zeigt in der Spalte der Positivkontrolle vier Kolonien blauer Farbe und für alle anderen Position zeigt es nicht gefärbte Kolonien. Daran kann erkannt werden, dass sowohl die Positivkontrolle als auch die Negativkontrolle erfolgreich waren. Darüber hinaus kann an keiner Stelle Interaktionen nachgewiesen werden. Da in dem Versuchsaufbau alle Fragmente des Ataxin-2 berücksichtigt wurden, kann eine direkte Interaktion zwischen Ataxin-2 und den Proteinen HDQ25, HDQ46 und HDQ72 ausgeschlossen werden.

Die Studien zur Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Huntingtin-Proteins haben gezeigt, dass überexprimiertes HDQ72 im Kern bzw. im Umfeld des Kerns akkumuliert und Ataxin-2 in diese Akkumulate rekrutiert. Dieser Befund zeigt eine Interaktion zwischen Ataxin-2 und HDQ72. Die durchgeführte Yeast-Two-Hybrid-Analyse zeigte jedoch, dass die Interaktion zwischen Ataxin-2 und HDQ72 (oder auch HDQ25 bzw. HDQ46) nur indirekter Natur sein kann, da eine direkte Interaktion mit dieser Methode ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von HDQ72 keinen Einfluss auf die Lokalisation von Crm1 nimmt. Außerdem konnte keine Kolo-kalisation dieser Proteine festgestellt werden.

3.2.4 Blockieren des Crm1-abhängigen Kernexports mit Leptomycin B

Im Rahmen der Untersuchung des Einflusses von Leptomycin B auf die zelluläre Lokalisation von Crm1 und Ataxin-2 konnte gezeigt werden, dass Ataxin-2 nicht Crm1-abhängig transportiert wird (siehe 3.1.4). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl Ataxin-1Q30 als auch Ataxin-1Q82 bei Überexpression Aggregate im Kern bilden und Ataxin-2 in diese Aggregate rekrutieren (siehe 3.2.1). Für das Ataxin-1-Protein konnte in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass es ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) besitzt, so dass es von Transportfaktoren, die an das NLS binden, in den Zellkern transportiert wird [ARPL⁺07]. Die Interaktion der Ataxin-1-Formen mit dem Ataxin-2 wurde bereits gezeigt, ebenso wie die Interaktion von Ataxin-2 und Crm1. Im nächsten Experiment soll nun auch die Beziehung zwischen Ataxin-1 und Crm1 untersucht werden.

Für diesen Versuch wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert. Nach 24 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag (Flag-Ataxin-1) und Ataxin-2 gefärbt.

Die Doppelfärbung im Falle der Überexpression (Abbildung 3.22) zeigt für das Ataxin-2 eine zytoplasmatische Verteilung. Zusätzlich kann eine Anlagerung des Ataxin-2

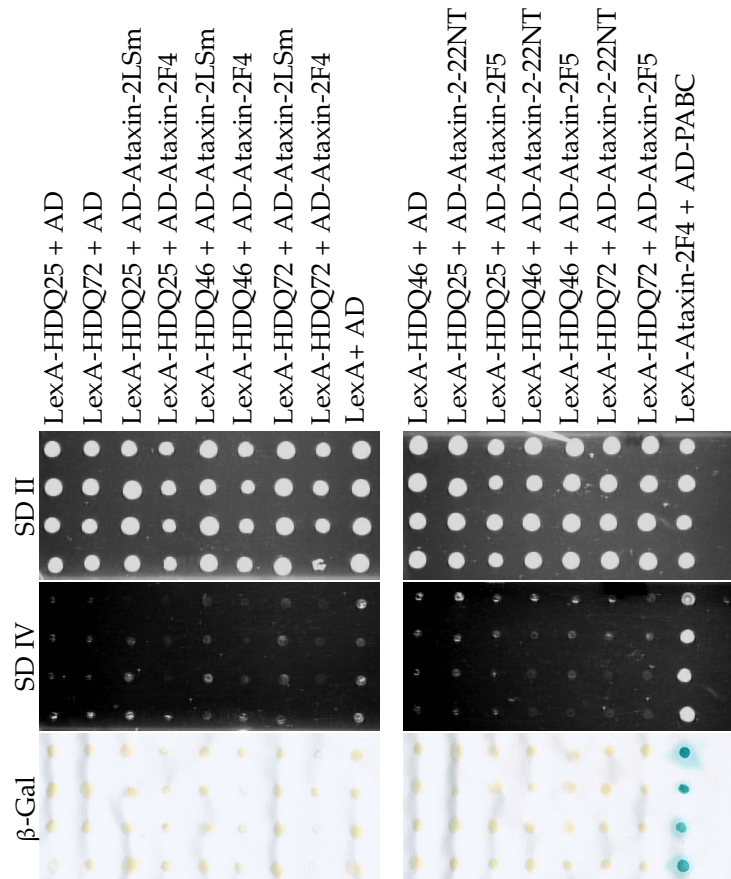


Abbildung 3.21: Yeast-Two-Hybrid-Analyse von Ataxin-2 und HD. Im Yeast-Two-Hybrid-System wurden Hefezellen mit dem pBTM117c-Plasmid, dass jeweils eine der kodierenden Sequenzen für Huntingtin mit 25, 46 oder 72 aufeinanderfolgenden CAG-Wiederholungen beinhaltetete, sowie dem pACT4-1b-Plasmid, dass jeweils eine der kodierenden Sequenzen der Ataxin-2-Fragmente LSm, 22NT, F5 oder F4 beinhaltetete, transformiert. Zusätzlich wurde ein Ansatz als Positivkontrolle mit dem pBTM117c-Plasmid mit der Ataxin-2-F4-Sequenz und dem pACT4-1b-Plasmid mit der PABC-Sequenz und ein Ansatz als Negativkontrolle mit den Plasmiden pBTM117c und pACT4-1b ohne Inserts hergestellt. Die Ansätze wurden auf SD II-Platten ausplattiert und hinreichend inkubiert. Anschließend wurden je 4 Kolonien auf eine Membran, eine SD II- und eine SD IV-Platte gestempelt und weitere 72 Stunden inkubiert. Die Membran wurde für den β -Gal-Test verwendet.

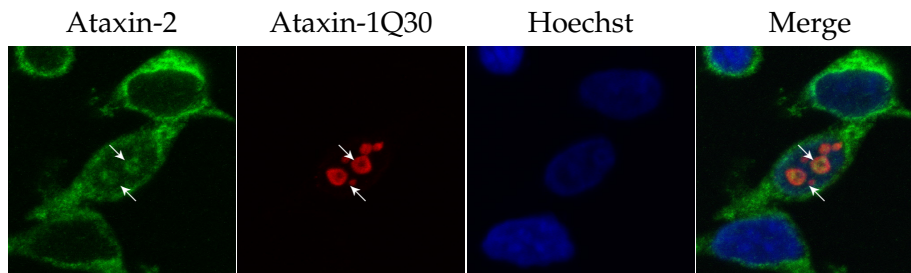


Abbildung 3.22: Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA1/SCA1Q30 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB behandelt und im Anschluss für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkernes erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen die Aggregate von Ataxin-1 und Ataxin-2.

an die Aggregate des Ataxin-30Q beobachtet werden (weiße Pfeile). Diese Koloration lässt sich in der Merge-Aufnahme anhand der gelben Färbung nochmals nachvollziehen. Die Aufnahmen zeigen die gleichen Lokalisation für die Proteine wie die Einzelfärbung von überexprimiertem Ataxin-1Q30 (Abbildung 3.15).

Die Doppelfärbung (Abbildung 3.23) zeigt für Ataxin-2 eine Verteilung im Zytoplasma und nukleäre Akkumulate. Exemplarisch sind Ataxin-2-Akkumulate im Kern mit weißen Pfeilen markiert. Markierungen in gleicher Lage sind in der Ataxin-1Q82-Färbung zu sehen. Daraus wird deutlich, dass die nukleären Akkumulate von Ataxin-2 an den gleichen Stellen vorliegen, wie die nukleären Ataxin-1Q82 Aggregaten. Die Pfeile zeigen eine Koloration von Ataxin-1 mit Ataxin-2. Dieser Sachverhalt kann in der Merge-Aufnahme an den pfeilmarkierten Stellen ebenfalls erkannt werden. Die Aufnahmen zeigen die gleichen Lokalisationen für die Proteine wie die Einzelfärbung von überexprimiertem Ataxin-1Q82 (Abbildung 3.14) ohne LMB.

Bei Überexpression der Ataxin-1-Formen Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 hat die Blockade des Crm1-abhängigen Kernexports durch LMB keinen Einfluss auf die Lokalisation des Ataxin-2 oder der Ataxin-1-Formen. Zum Einen bestätigt dies erneut die Crm1-unabhängigkeit des Ataxin-2 und zum Anderen zeigt es, dass die Ataxin-1-Formen lokalisationsinvariant auf die Blockade des Crm1-abhängigen Kernexports reagieren.

In vorangegangenen Arbeiten konnte für das Huntingtin-Protein gezeigt werden, dass es ein nukleäres Exportsignal (NES) besitzt und trotz Abwesenheit eines nukleären Lokalisationssignals (NLS) in der Lage ist in den Zellkern überzutreten [XLT⁺03]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass HDQ72 bei Überexpression Akkumulate sowohl im Zellkern als auch in der Peripherie des Zellkerns bildet und Ataxin-2 in diese Akkumulate rekrutiert (siehe 3.2.3). Auf Grund des Vorhandenseins eines nukleären Exportsignals im Huntingtin-Protein wäre es denkbar, dass die Blockade des Crm1-abhängigen Kernexports dazu führt, dass das Huntingtin-Protein nur noch im Zellkern, aber nicht mehr

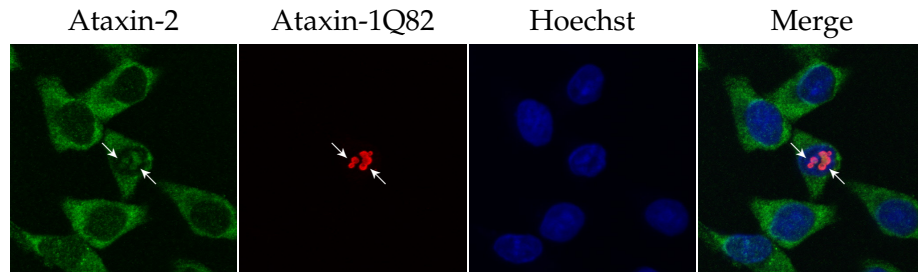


Abbildung 3.23: Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q82 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB behandelt und im Anschluß für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Pfeile markieren Aggregate von Ataxin-1 und Ataxin-2.

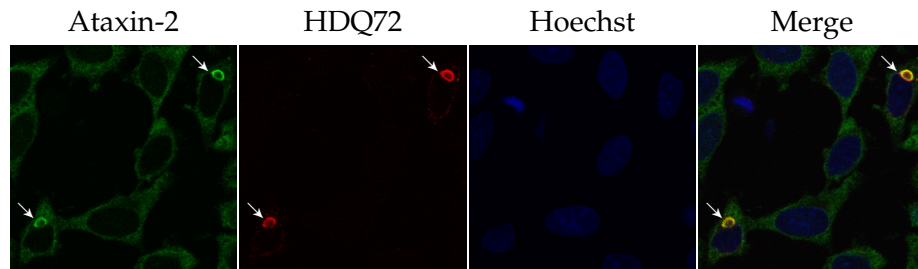


Abbildung 3.24: Studien zur Überexpression von HDQ72 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB behandelt und im Anschluß für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen Akkumulate von HDQ72 und Ataxin-2.

in der Peripherie des Zellkern lokalisieren kann. Diese Hypothese sollte im Nachfolgenden untersucht werden.

Dazu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen für 18 Stunden mit 5 ng/ml LMB inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzmikroskopie in einer Einzelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen den Flag-Tag (Flag-HD) und in einer Doppelfärbung mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag (Flag-HD) gefärbt.

Die Doppelfärbung (Abbildung 3.24, b) zeigt in der HDQ72-Färbung zwei HDQ72-Akkumulate in der Peripherie des Nukleus, welche mit weißen Pfeilen markiert wurden. Die Merge-Aufnahme zeigt an den pfeilmarkierten Stellen, durch die gelbliche Färbung, die Ko-lokalisation von Ataxin-2 und HDQ72 nochmals deutlich. Dieser Be-

fund spiegelt die Verhältnisse in der Einzelfärbung zur Überexpression von HDQ72 ohne LMB ohne signifikante Unterschiede wieder (Abbildung 3.19).

Bei Überexpression des HDQ72-Proteins hat die Blockade des Crm1-abhängigen Kern-exports durch LMB keinen Einfluss auf die Lokalisation von Ataxin-2 oder HDQ72. Obwohl das Huntingtin-Protein ein nukleäres Exportsignal besitzt und somit auf dem Crm1-abhängigen Weg aus dem Kern transportiert werden kann, zeigt die Lokalisation des HDQ72-Akkumulats in der Peripherie des Kerns bei Verwendung von LMB, dass das HDQ72-Protein auch auf anderen Wegen als dem Crm1-abhängigen aus dem Kern transportiert werden kann. Dabei ist jedoch zu bedenken, dass die Huntingtin-Proteinakkumulate wahrscheinlich schon vor der LMB-Behandlung gebildet wurden und somit die LMB-Behandlung keinen Einfluss auf diese Struktur nehmen kann.

3.2.5 Die Bildung von Stress Granules unter oxidativem Stress

Ataxin-2 verändert unter Stressbedingungen seine Lokalisation und akkumuliert in Stress Granules [NRW⁺07]. Des Weiteren wurden in den Studien zur Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Ataxin-1-Proteins Aggregate des Ataxin-1 im Zellkern nachgewiesen, welche Ataxin-2 in den Zellkern rekrutieren (siehe 3.2.1). Diese beiden Einzelfakten führten zur Fragestellung, ob die Akkumulation des Ataxin-2 in Stress Granules einen Einfluss auf die Rekrutierung des Ataxin-2 durch die Ataxin-1-Aggregate hat bzw. die Bildung von Aggregaten im Zellkern bei Überexpression von Ataxin-1 einen Einfluss auf die Bildung von Stress Granules nimmt.

Hierfür wurden HeLa-Zellen mit pcDNA1/SCA1Q30 und pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert. Nach hinreichender Inkubationszeit wurden die Zellen einer einstündigen Stressphase mit Arsenit ausgesetzt und im Anschluss fixiert. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag (Flag-Ataxin-1) angefärbt. Um die Auswirkung von Ataxin-1 auf die Bildung von Stress Granules noch weitergehend zu untersuchen, wurden zwei weitere Ansätze von HeLa-Zellen mit den gleichen Plasmiden vorbereitet, von denen nur einer der beiden Ansätze mit Arsenit behandelt wurde. Diese Ansätze wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR und den Flag-Tag (Flag-Ataxin-1) angefärbt.

Die Ataxin-2-Färbung im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q30 (Abbildung 3.25) weist für Ataxin-2 eine Lokalisation in Stress Granules auf. Zusätzlich sind im Zellkern Akkumulationen von Ataxin-2 zu erkennen. Diese Akkumulationen wurden exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. Die Ataxin-1Q30-Färbung zeigt eine nukleäre Verteilung des Ataxin-1Q30 mit Aggregatbildung. Die pfeilmarkierten Stellen sind lagegleich mit den in der Ataxin-2-Färbung markierten Akkumulaten und zeigen an diesen Stellen Aggregate von Ataxin-1Q30. Dies wird auch in der Merge-Aufnahme noch einmal deutlich. Die TIAR-Färbung ohne Arsenitbehandlung zeigt für TIAR sowohl eine nukleäre, als auch eine zytoplasmatische Verteilung. Die TIAR-Färbung unter Arsenitbehandlung zeigt, zusätzlich zur nukleären und zytoplasmatischen Verteilung des TIAR, Akkumulationen in Stress Granules. Die Färbung des Ataxin-1Q30 zeigt sowohl unter normalen als auch unter Stressbedingungen nukleäre Akkumulationen des Proteins.

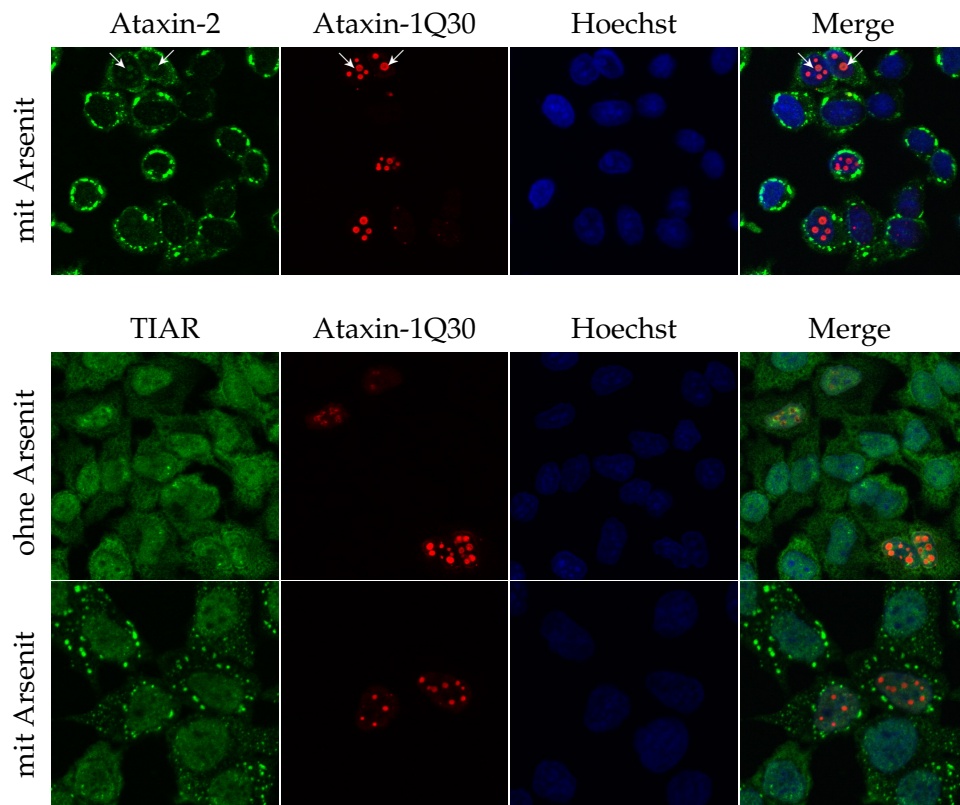


Abbildung 3.25: Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA1/SCA1Q30 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und im Anschluss für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Zwei weitere Ansätze von HeLa-Zellen wurden unter Verwendung des gleichen Plasmids vorbereitet, von denen nur einer der beiden Ansätze für eine Stunde mit Arsenit behandelt wurde. Beide Ansätze wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen die Ataxin-1-Aggregate.

An den TIAR-Färbungen und der Ataxin-2-Färbung bei Überexpression von Ataxin-1Q30 (Abbildung 3.25) kann erkannt werden, dass die Behandlung mit Arsenit zur Bildung von Stress Granules führt. Es können aus dem Vergleich der TIAR-Färbung mit der Ataxin-1Q30-Färbung keine Kolo-kalisationen erkannt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung von Stress Granules durch die Überexpression von Ataxin-1Q30 nicht beeinträchtigt wird. Die nukleär lokalisierten Akkumulationen in der Ataxin-2-Färbung, welche exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert wurden, zeigen Kolo-kalisationen mit Ataxin-1Q30-Aggregaten. Dies zeigt, dass weder die Bildung von Stress Granules noch die Aggregation von Ataxin-1Q30 und Ataxin-2 beeinflusst wird, wenn Ataxin-2 durch Ataxin-1 in den Zellkern rekrutiert wird.

Die Ataxin-2-Färbung im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q82 (Abbildung 3.26) weist für Ataxin-2 eine Akkumulation in Stress Granules auf. Zusätzlich sind im Zellkern Akkumulate von Ataxin-2 zu erkennen. Diese Akkumulate wurden exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. Des Weiteren zeigt die Ataxin-1Q82-Färbung eine nukleäre Verteilung des Ataxin-1Q82 mit Aggregatbildung. Die pfeilmarkierten Stellen sind lagegleich mit den in der Ataxin-2-Färbung und zeigen an diesen Stellen Aggregate von Ataxin-1Q82 und Ataxin-2. Die TIAR-Färbung ohne Arsenitbehandlung zeigt für das TIAR sowohl eine nukleäre, als auch eine zytoplasmatische Verteilung. Die TIAR-Färbung mit Arsenitbehandlung zeigt, zusätzlich zur nukleären und zytoplasmatischen Verteilung des TIAR, eine Akkumulation des TIAR in Stress Granules. Die Ataxin-1Q30-Färbungen, zeigen für das Ataxin-1Q30 unabhängig davon, ob die Zellen mit Arsenit behandelt wurden oder nicht, eine nukleäre Verteilung mit Aggregaten.

An den TIAR-Färbungen im Falle der Überexpression von Ataxin-1Q82 (Abbildung 3.26) kann erkannt werden, dass die Behandlung mit Arsenit zur Bildung von Stress Granules führt. Aus dem Vergleich der Färbung mit TIAR und Ataxin-1Q82 können keine Kolo-kalisationen der zytoplasmatisch lokalisierten Stress Granules mit den nukleär lokalisierten Ataxin-1Q82-Aggregaten ermittelt werden. Daraus lässt sich beobachten, dass die Bildung von Stress Granules durch die Überexpression von Ataxin-1Q82 nicht beeinträchtigt wird. Die nukleär lokalisierten Akkumulationen in der Ataxin-2-Färbung, welche exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert wurden, zeigen Kolo-kalisationen mit Ataxin-1Q82-Aggregaten. Das zeigt, dass die Bildung von Stress Granules die Aggregation von Ataxin-1Q82 im Kern und die Rekrutierung von Ataxin-2 in den Kern nicht beeinflusst.

Die Überexpression der Ataxin-1-Formen Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 in gestressten Zellen nimmt demzufolge keinen Einfluss auf die Bildung von Stress Granules. Des Weiteren nimmt die Bildung von Stress Granules in Zellen mit überexprimiertem Ataxin-1 keinen Einfluss auf die Bildung von nukleären Ataxin-1-Aggregaten oder die Rekrutierung von Ataxin-2 in den Kern.

In den Studien zur Lokalisation von Ataxin-2 bei Überexpression des Huntingtin-Proteins wurde eine Akkumulatbildung des HDQ72 im Zellkern und in der Peripherie des Zellkern beschrieben, welche Ataxin-2 in die Akkumulate rekrutiert (siehe 3.2.3). In analoger Weise zum Ataxin-1 stellte sich die Frage, ob die Überexpression des HDQ72 einen Einfluss auf die Bildung von Stress Granules hat bzw. die Bildung von Stress

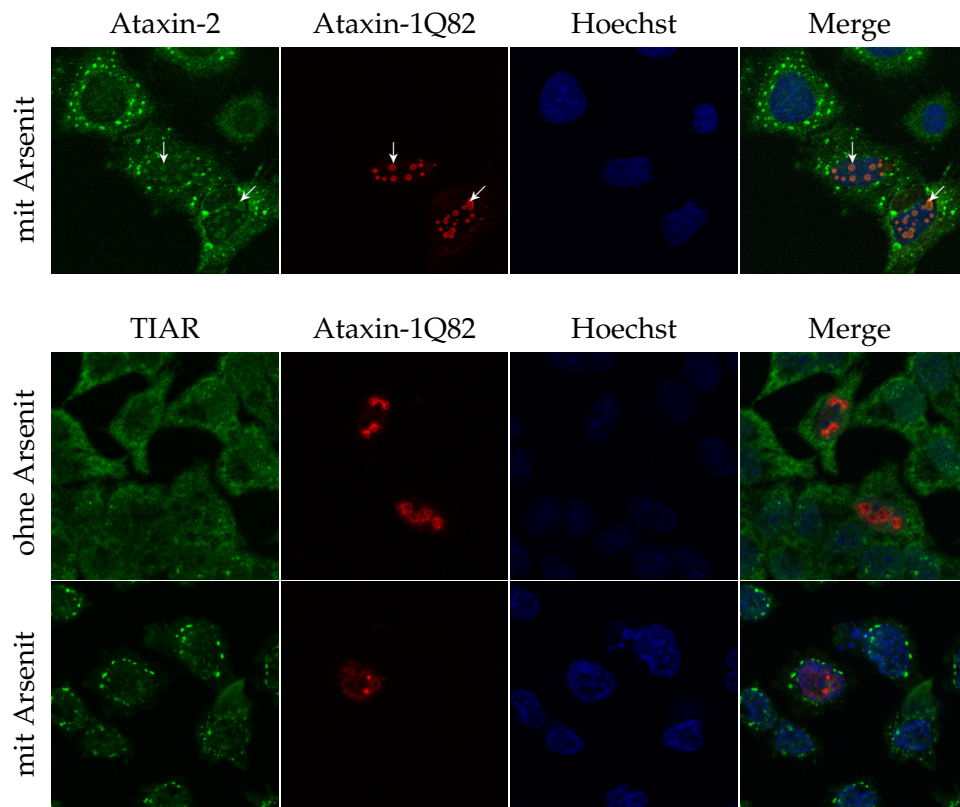


Abbildung 3.26: Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q82 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pcDNA1/SCA1Q82 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und im Anschluss für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Zwei weitere Ansätze von HeLa-Zellen wurden unter Verwendung des gleichen Plasmids vorbereitet, von denen nur einer der beiden Ansätze für eine Stunde mit Arsenit behandelt wurde. Beide Ansätze wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen die Ataxin-1-Aggregate.

Granules einen Einfluss auf die Rekrutierung des Ataxin-2 durch die HDQ72-Akkumulate nimmt.

Dazu wurden HeLa-Zellen mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert. Nach 24 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen einer einstündigen Stressphase mit Arsenit ausgesetzt und im Anschluss fixiert. Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen anschließend mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag angefärbt. Um die Bildung von Stress Granules noch mit einem weiteren Markerprotein für Stress Granules zu verifizieren, wurden zwei weitere Ansätze von HeLa-Zellen mit den gleichen Plasmiden vorbereitet, von denen nur einer der beiden Ansätze mit Arsenit behandelt wurde. Diese Ansätze wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR und den Flag-Tag (Flag-HD) angefärbt.

Die Ataxin-2-Färbung im Falle der Überexpression von HDQ72 (Abbildung 3.27) zeigt für das Ataxin-2 eine zytoplasmatische Verteilung mit Akkulaten. Diese Akkulate wurden exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert. Die HDQ72-Färbung zeigt Akkulate des HDQ72. Die pfeilmarkierten Stellen sind lagegleich mit den in der Ataxin-2-Färbung markierten Ataxin-2-Akkulaten und zeigen an diesen Stellen Akkulate von HDQ72. Die TIAR-Färbung ohne Arsenitbehandlung zeigt für das TIAR sowohl eine nukleäre, als auch eine zytoplasmatische Verteilung. Die TIAR-Färbung mit Arsenitbehandlung zeigt, zusätzlich zur nukleären und zytoplasmatischen Verteilung des TIAR, Akkulate des TIAR im Zytoplasma. Die HDQ72-Färbungen, zu sehen neben den TIAR-Färbungen, zeigen für das HDQ72 unabhängig davon, ob die Zellen mit Arsenit behandelt wurden oder nicht, Akkulate von HDQ72.

Aus dem Vergleich der TIAR-Färbung mit der HDQ72-Färbung können keine Kolokalisationen der zytoplasmatisch lokalisierten Stress Granules mit den HDQ72-Akkulaten ermittelt werden. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung von Stress Granules durch die Überexpression von HDQ72 nicht beeinträchtigt wird. Die Ataxin-2-Akkumulate in der Ataxin-2-Färbung, welche exemplarisch mit weißen Pfeilen markiert wurden, zeigen Kolokalisationen mit HDQ72-Akkulaten. Das zeigt, dass die Bildung von Stress Granules die Akkumulation von HDQ72 im Kern und dessen Peripherie und die Kolokalisation von Ataxin-2 in diesen Akkulaten nicht beeinflusst.

Die Überexpression des Huntingtin-Proteins HDQ72 in gestressten Zellen nimmt demzufolge keinen Einfluss auf die Bildung von Stress Granules. Des Weiteren nimmt die Bildung von Stress Granules in Zellen mit überexprimiertem HDQ72 keinen Einfluss auf die Bildung von HDQ72-Akkulaten oder die Kolokalisation von Ataxin-2 in diesen Akkulaten.

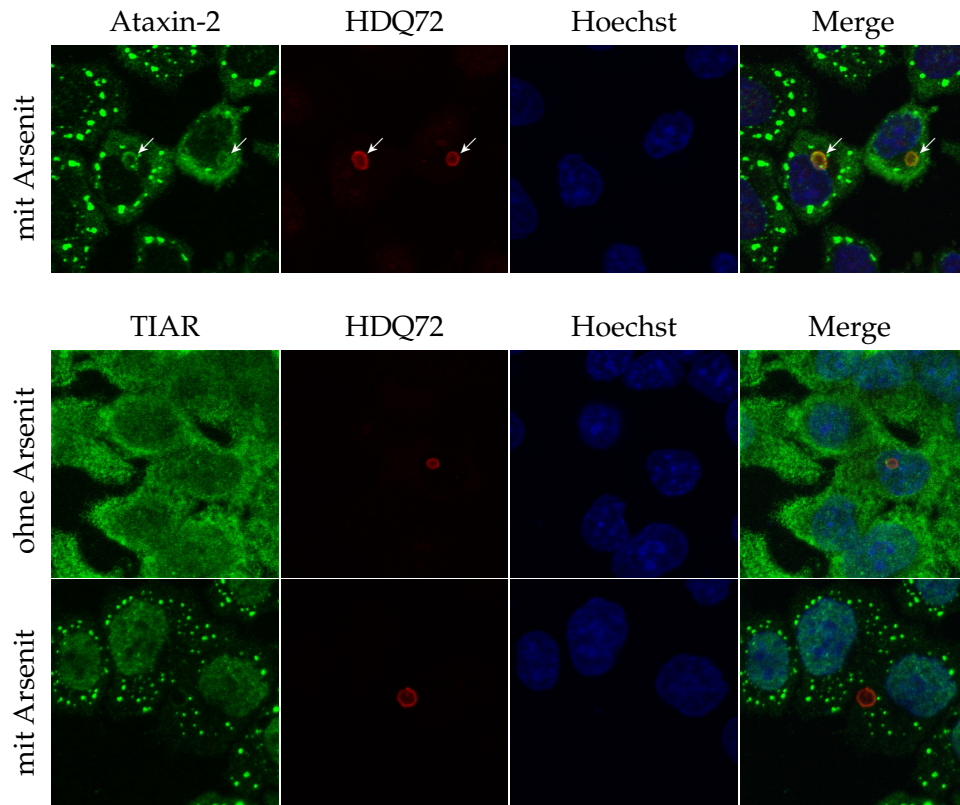


Abbildung 3.27: Studien zur Überexpression von HDQ72 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden mit pTL-FlagC/HDQ72 transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für eine Stunde mit 0,5 mM Arsenit behandelt und im Anschluss für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen Ataxin-2 und den Flag-Tag gefärbt. Zwei weitere Ansätze von HeLa-Zellen wurden unter Verwendung des gleichen Plasmids vorbereitet, von denen nur einer der beiden Ansätze für eine Stunde mit Arsenit behandelt wurde. Beide Ansätze wurden für die Immunfluoreszenzmikroskopie mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR und den Flag-Tag gefärbt. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst. Die Pfeile zeigen Huntingtin-Akkumulate.

4 Diskussion

Mittels datenbankanalytischer Methoden konnte in *S. cerevisiae* ein Interaktionsnetzwerk des Pab1-Bindeproteins Pbp1 dargestellt werden, welches unter anderem eine Interaktion zwischen Pbp1 und Crm1 zeigt. Interessanter Weise zeigt das Pbp1 eine strukturelle und funktionelle Verwandtschaft mit humanem Ataxin-2. Zudem konnten bereits Interaktionen des Hefeinteraktionsnetzwerkes auf das humane System übertragen werden [RAN⁺05]. In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von Crm1 und Ataxin-2 mittels Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden.

Das Crm1-Protein (chromosome maintenance 1 oder auch exportin1 bzw. XPO1 genannt) gehört zur Importin β -Superfamilie und interagiert mit dem vorherrschenden nukleären Exportsignal (NES), dem sogenannten leucinreichen NES, welches in einer breiten Auswahl zwischen Nukleus und Zytoplasma pendelnder Proteine zu finden ist [CGR⁺03, MAY⁺06]. Des Weiteren fungiert Crm1 als ein wichtiger Exportfaktor für diverse RNA-Moleküle, wie zum Beispiel virale mRNA (messenger) [Cul03], rRNA (ribosomale) [HCW⁺06], U-sn-RNA (spliceosomale U) [OSB⁺00, BVJ⁺04], SRP RNA (signal recognition particle) [CB00, GDHS01, APL⁺04] und mRNA für spezielle zelluläre Prozesse [SCS⁺06, CTS⁺06].

Das Be- und Entladen des Crm1 mit Proteinen wird durch die kleine GTPase Ran kontrolliert, welche vornehmlich im Nukleus lokalisiert ist und mit Karyopherinen wie Crm1 in ihrer GTP-gebundenen Form interagiert. Für den nukleären Export stellt RanGTP einen integralen Bestandteil des Transportkomplexes dar, welcher Ladung und Rezeptor des Karyopherins vom Nukleus ins Zytoplasma begleitet. Im Gegensatz dazu fungiert RanGTP beim nukleären Import als Dissoziationsfaktor, da Importine Ladung und RanGTP nicht gleichzeitig binden können. Ein Gradient des RanGTP entlang der Kernmembran, welcher aus der Aktivität des nukleären RCC1 (chromatin-associated nucleotide exchange factor regulator of chromosome condensation 1) und des zytoplasmatischen GTPase-aktivierenden Proteins RanGAP resultiert, wird als treibende Kraft für den nukleären Transport in beide Richtungen betrachtet [FK03, Mac01].

Der Crm1-abhängige Kernexport kann mit Hilfe von Leptomycin B (LMB) blockiert werden. LMB ist eine ungesättigte, verzweigte Fettsäure [KSCT06], dessen ungesättigtes γ -Lacton mit der Sulfhydrylgruppe des Cys₅₂₉ des Crm1 eine Michaelreaktion vollzieht und somit die Bindung des Crm1 an Proteine mit einem leucinreichen NES verhindert [KMT⁺99].

In der Arbeit konnte eine zytoplasmatische Verteilung von Ataxin-2 und Crm1 beobachtet werden. Bei Blockade des Crm1-abhängigen Kernexports durch LMB konnte eine deutliche Kolokalisation in der Peripherie der Kernmembran beobachtet werden. Das Ataxin-2 seine Lokalisation bei Unterdrückung der Kernexportfunktion des Crm1 nicht ändert, zeigt die Unabhängigkeit des Ataxin-2 vom Crm1-abhängigen Kernex-

port. Somit ist der Interaktionsmechanismus zu diesem Zeitpunkt noch nicht geklärt. In der Arbeit von Albrecht und Lengauer [AL04] konnte jedoch eine Assoziation von LSm16 mit Crm1 und eine Interaktion von LSm16 mit Pbp1 gezeigt werden. Die LSm-Domäne des Pbp1 kann ebenfalls mit LSm12 interagieren [FWM⁺06]. Die Interaktion der LSm-Domäne mit LSm12 konnte auch für das humane Homolog Ataxin-2 gezeigt werden (unveröffentlichte Daten von Ralser und Schnaars). Aufgrund der Homologie von Ataxin-2 und Pbp1 liegt es Nahe anzunehmen, dass Ataxin-2 ebenfalls mit LSm16 interagieren kann und somit das LSm16 das Bindeglied in der Interaktion von Ataxin-2 und Crm1 darstellt. Der Ort der Wechselwirkung beider Proteine ist wahrscheinlich zytoplasmatisch lokalisiert, da beide Proteine dort nachgewiesen werden konnten.

Im Rahmen der Arbeit wurde zusätzlich gezeigt, dass die Überexpression von Ataxin-1 und Huntingtin die Lokalisation von Crm1 nicht beeinflussen. Der ENTREZ GENE-Datenbank zufolge besitzen sowohl Ataxin-1 [Ent08a] als auch Huntingtin [Ent08c] im Gegensatz zu Ataxin-2 [Ent08b] keine LSm-Domäne, was ein weiterer Hinweis auf die mögliche Interaktion von Crm1 und Ataxin-2 über die LSm-Domäne sein könnte.

Ein Einfluss auf die zelluläre Lokalisation bzw. Konzentration des Crm1 durch Ataxin-2 wurde in der Arbeit durch Stressinduktions- und RNAi-Experimente untersucht, konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Es wurde bereits veröffentlicht, dass Ataxin-2 mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Einfluss auf die Translation besitzt [CDP04]. Im Zusammenhang mit Crm1 könnte es einen Einfluss auf den Protein- und RNA-Kernexport besitzen. Der Transport von mRNA-Molekülen aus dem Kern ist meist Crm1-unabhängig und daher nicht durch Ataxin-2 zu beeinflussen [NLL⁺07]. Andere RNA-Moleküle, wie zum Beispiel die RNA der ribosomalen Untereinheiten (rRNA) werden jedoch Crm1-abhängig aus dem Zellkern exportiert. Vielleicht kann Ataxin-2 diesen Transport beeinflussen, was eine Auswirkung auf die Zusammenlagerung der Ribosomen oder den Transport der RNA der ribosomalen Untereinheiten hätte und somit auch einen Einfluss auf die Translation bedeuten würde.

Schon in der Einleitung wurde dargelegt, dass Ataxin-2 modulierende Eigenschaften bezüglich der Pathogenität anderer Polyglutaminerkrankungen zugeschrieben werden. Im *D. melanogaster*-Modell konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte zelluläre Konzentration von Ataxin-2 zur verstärkten Pathogenität des Ataxin-1 führt und im umgekehrten Falle eine Verringerung der zellulären Ataxin-2-Konzentration zu einer verringerten Pathogenität des Ataxin-1 führt. Des Weiteren wurde in der Untersuchung beobachtet, dass die Überexpression einer expandierten Form des Ataxin-1 zu einer Rekrutierung des normalerweise zytoplasmatisch lokalisierten Ataxin-2 in den Nukleus führt und dort zu Kolo-kalisation mit Ataxin-1. Die Rekrutierung in den Nukleus wurde als ursächlich für die Modulation der Pathogenität vermutet [ARPL⁺07]. In dieser Arbeit konnte die Rekrutierung von Ataxin-2 in den Nukleus sowohl bei Überexpression einer expandierten Form des Ataxin-1, als auch bei der nicht expandierten Form, im humanen System beobachtet werden.

Die Funktion des Ataxin-1-Protein ist bisher weitestgehend ungeklärt. In frühen Ar-

beiten wurde entdeckt, dass Ataxin-1 mit sich selbst assoziieren kann, wobei eine hochgradig konservierte Domäne in den Aminosäuren 495-605 des Ataxin-1-Proteins beteiligt ist, welche nicht den poly(Q)-Strang enthält [BDD⁺97]. Diese Selbstassoziation wurde als Grundlage für die in Nuklei gefundenen Aggregate des Ataxin-1 postuliert. Ataxin-1 besitzt ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ist daher vorwiegend im Nukleus lokalisiert. Durch Versuche mit transgenem Ataxin-1 ohne NLS, konnte die Lokalisation des Ataxin-1 im Nukleus als pathologischer Faktor der SCA1-Erkrankung erkannt werden. Des Weiteren kann Ataxin-1 RNA-Moleküle binden, wobei die RNA-Bindeaktivität in umgekehrtem Zusammenhang zur Länge des poly(Q)-Strangs steht [YSZO01]. Neben der Fähigkeit an RNA-Moleküle zu binden wurde festgestellt, dass Ataxin-1 an Chromosomen binden kann und Transkriptionsrepression vermitteln kann, wenn es an DNA gebunden ist, was zur Hypothese führte, dass Ataxin-1 ein Chromatinbindefaktor ist [TKM⁺04]. Interessanter Weise wurde entdeckt, dass Ataxin-1 Kernexport von RNA-Molekülen betreiben kann, während das expandierte Ataxin-1 diese Fähigkeit nicht besitzt. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Kernexport nicht über Crm1 funktioniert und nicht durch Leptomycin B blockiert werden kann. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Bildung von Aggregaten im Zellkern durch Ataxin-1 vom Vorhandensein von RNA abhängt, wobei vermutet wurde, dass die Aggregation gezielt um RNA-Moleküle geschieht, die durch Ataxin-1 exportiert werden können. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Aggregate mit der Regulation der Proteinfaltung und Interaktion mit molekularen Chaperonen verbunden sind. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass die pathogenen Effekte des expandierten Ataxin-1 darauf beruhen, dass der Kernexport nicht mehr funktioniert [IVP⁺05]. Bezüglich Ataxin-1 wurde gezeigt, dass Ataxin-2 eine starke physikalische Interaktion vollzieht [LHS⁺06].

Wie bereits erwähnt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Überexpression von Ataxin-1Q30 bzw. Ataxin-1Q82 zur Aggregatbildung im Nukleus und der Rekrutierung von Ataxin-2 in diese Aggregate führt. Grundlage für diese Rekrutierung könnte die starke physikalische Interaktion zwischen Ataxin-1 und Ataxin-2 sein. Im *D. melanogaster*-Modell wurde die Rekrutierung des Ataxin-2 als der pathogenitätsmodulierende Faktor in Bezug auf die SCA1-Erkrankung vermutet. Nimmt man diese Vermutung als Grundlage, so hätte es für das humane Modell weitreichende Folgen. In Zellen die Ataxin-2 enthalten müsste sowohl eine Überexpression der expandierten Ataxin-1-Form Ataxin-1Q82 als auch der nicht expandierten Form Ataxin-1Q30 zu verstärkter Pathogenität der SCA1-Erkrankung führen.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Gehirnregionen	3
1.2	Ataxin-2 Domänen	4
1.3	Ataxin-2 Interaktionen	5
2.1	Schematische Darstellung des Genexpressionsvektors pCMV-Myc	16
2.2	Schematische Darstellung der Yeast-Two-Hybrid-Vektoren pBTM117c und pACT4-1b	17
2.3	Schematische Darstellung der Ataxin-2-Fragmente	18
3.1	Nachweis der Interaktion zwischen Crm1 und Ataxin-2 in HeLa-Zellen	26
3.2	Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 bzw. Crm1 in HeLa-Zellen	28
3.3	Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 in HeLa-Zellen	28
3.4	Intrazelluläre Lokalisation von Crm1 unter Stressbedingungen in HeLa-Zellen	30
3.5	Intrazelluläre Lokalisation von NF κ B in HeLa-Zellen	31
3.6	Intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 und Crm1 nach LMB-Behandlung in HeLa-Zellen	31
3.7	Analyse eines Ataxin-2-Knock-Downs in HeLa-Zellen	33
3.8	Ataxin-2-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Crm1 in HeLa-Zellen	34
3.9	Ataxin-2-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Crm1 unter Arsenitstress in HeLa-Zellen	36
3.10	Analyse eines Crm1-Knock-Downs in HeLa-Zellen	38
3.11	Crm1-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 in HeLa-Zellen	39
3.12	Crm1-Knock-Down und die intrazelluläre Lokalisation von Ataxin-2 unter Arsenitstress in HeLa-Zellen	41
3.13	Überexpression von Ataxin-1Q30 und Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen	43
3.14	Überexpressionsstudien von Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen	44
3.15	Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 in HeLa-Zellen	45
3.16	Intrazelluläre Lokalisation von Crm1 und Ataxin-1Q30 bzw. Ataxin-1Q82 in HeLa-Zellen	46
3.17	Studien zur Überexpression von Ataxin-7Q10 in HeLa-Zellen	47
3.18	Studien zur Überexpression von Ataxin-7Q60 in HeLa-Zellen	48
3.19	Studien zur Überexpression von HDQ72 in HeLa-Zellen	49
3.20	Intrazelluläre Lokalisation von Crm1 und HDQ72 in HeLa-Zellen	50
3.21	Yeast-Two-Hybrid-Analyse von Ataxin-2 und HD	51

3.22 Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen	53
3.23 Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q82 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen	54
3.24 Studien zur Überexpression von HDQ72 mit LMB-Behandlung in HeLa-Zellen	54
3.25 Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q30 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen	56
3.26 Studien zur Überexpression von Ataxin-1Q82 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen	58
3.27 Studien zur Überexpression von HDQ72 nach Arsenitstress in HeLa-Zellen	60

Tabellenverzeichnis

1.1	Übersicht über die Familie der Polyglutaminerkrankungen	1
2.1	Chemikalien	9
2.2	Lösungen	11
2.3	Bakterienstamm	13
2.4	Bakterien-Medien	13
2.5	Hefestämme	13
2.6	Hefemedien	14
2.7	Zelllinie	14
2.8	Zellkulturmedien	15
2.9	Antikörper	15

Literaturverzeichnis

- [AGWL04] ALBRECHT, Mario ; GOLATTA, Michael ; WÜLLNER, Ullrich ; LENGAUER, Thomas: Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. In: *European Journal of Biochemistry* 271 (2004), 3155-3170. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04245.x>. – DOI 10.1111/j.1432-1033.2004.04245.x
- [AL04] ALBRECHT, Mario ; LENGAUER, Thomas: Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases. In: *FEBS Letters* 569 (2004), Juli, 18-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2004.03.126>. – DOI 10.1016/j.febslet.2004.03.126
- [AMK⁺93] ARAKI, K. ; MEGURO, H. ; KUSHIYA, E. ; TAKAYAMA, C. ; INOUE, Y. ; MISHINA, M.: Selective Expression of the Glutamate Receptor Channel [δ]2 Subunit in Cerebellar Purkinje Cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197 (1993), Dezember, 1267-1276. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1993.2614>. – DOI 10.1006/bbrc.1993.2614
- [APL⁺04] ALAVIAN, Christina N. ; POLITZ, Joan C. R. ; LEWANDOWSKI, Laura B. ; POWERS, Christine M. ; PEDERSON, Thoru: Nuclear export of signal recognition particle RNA in mammalian cells. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (2004), 351-355. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.126>. – DOI 10.1016/j.bbrc.2003.11.126
- [ARPL⁺07] AL-RAMAH, Ismael ; PÉREZ, Alma M. ; LIM, Janghoo ; ZHANG, Minghang ; SORENSEN, Rie ; HARO, Maria de ; BRANCO, Joana ; PULST, Stefan M. ; ZOGHBI, Huda Y. ; BOTAS, Juan: dAtaxin-2 Mediates Expanded Ataxin-1-Induced Neurodegeneration in a Drosophila Model of SCA1. In: *PLoS Genetics* 3 (2007), Dezember, e234. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.0030234>. – DOI 10.1371/journal.pgen.0030234
- [BB06] BUTLER, Rachel ; BATES, Gillian P.: Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. In: *Nat Rev Neurosci* 7 (2006), Oktober, 784-796. <http://dx.doi.org/10.1038/nrn1989>. – DOI 10.1038/nrn1989. – ISSN 1471-003X
- [BDD⁺97] BURRIGHT, EN ; DAVIDSON, JD ; DUVICK, LA ; KOSHY, B ; ZOGHBI, HY ; ORR, HT: Identification of a self-association region within the SCA1 gene product, ataxin-1. In: *Hum. Mol. Genet.* 6 (1997), April, 513-518. <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/6/4/513>

- [BMF⁺05] BRUNE, Christiane ; MUNCHEL, Sarah E. ; FISCHER, Nicole ; PODTELEJNIKOV, Alexandre V. ; WEIS, Karsten: Yeast poly(A)-binding protein Pab1 shuttles between the nucleus and the cytoplasm and functions in mRNA export. In: *RNA* 11 (2005), April, 517-531. <http://dx.doi.org/10.1261/rna.7291205>. – DOI 10.1261/rna.7291205
- [BP08] BECKHAM, Carla J. ; PARKER, Roy: P Bodies, Stress Granules, and Viral Life Cycles. In: *Cell Host & Microbe* 3 (2008), April, 206-212. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2008.03.004>. – DOI 10.1016/j.chom.2008.03.004
- [BVJ⁺04] BOULON, Séverine ; VERHEGGEN, Céline ; JADY, Beata E. ; GIRARD, Cyrille ; PESCIA, Christina ; PAUL, Conception ; OSPINA, Jason K. ; KISS, Tamas ; MATERA, A. G. ; BORDONNÉ, Rémy ; BERTRAND, Edouard: PHAX and CRM1 Are Required Sequentially to Transport U3 snoRNA to Nucleoli. In: *Molecular Cell* 16 (2004), Dezember, 777-787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.013>. – DOI 10.1016/j.molcel.2004.11.013
- [CB00] CIUFO, Leonora F. ; BROWN, Jeremy D.: Nuclear export of yeast signal recognition particle lacking Srp54p by the Xpo1p/Crm1p NES-dependent pathway. In: *Current Biology* 10 (2000), Oktober, 1256-1264. [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00743-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00743-0). – DOI 10.1016/S0960-9822(00)00743-0
- [CDP04] CIOSK, Rafal ; DEPALMA, Michael ; PRIESS, James R.: ATX-2, the *C. elegans* ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline. In: *Development* 131 (2004), Oktober, 4831-4841. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.01352>. – DOI 10.1242/dev.01352
- [CGR⁺03] COUR, Tanja la ; GUPTA, Ramneek ; RAPACKI, Kristoffer ; SKRIVER, Karen ; POULSEN, Flemming M. ; BRUNAK, Soren: NESbase version 1.0: a database of nuclear export signals. In: *Nucl. Acids Res.* 31 (2003), 393-396. <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/31/1/393>
- [CTS⁺06] CULJKOVIC, Biljana ; TOPISIROVIC, Ivan ; SKRABANEK, Lucy ; RUIZ-GUTIERREZ, Melisa ; BORDEN, Katherine L.: eIF4E is a central node of an RNA regulon that governs cellular proliferation. In: *J. Cell Biol.* 175 (2006), November, 415-426. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200607020>. – DOI 10.1083/jcb.200607020
- [Cul03] CULLEN, Bryan R.: Nuclear mRNA export: insights from virology. In: *Trends in Biochemical Sciences* 28 (2003), August, 419-424. [http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00142-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00142-7). – DOI 10.1016/S0968-0004(03)00142-7

- [Ent08a] ENTREZ GENE: *ATXN1 ataxin 1 [Homo sapiens]*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&list_uids=6310. Version: Aug 2008. – GeneID: 6310
- [Ent08b] ENTREZ GENE: *ATXN2 ataxin 2 [Homo sapiens]*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&list_uids=6311. Version: Jul 2008. – GeneID: 6311
- [Ent08c] ENTREZ GENE: *HTT huntingtin [Homo sapiens]*. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=gene&Cmd=retrieve&list_uids=3064. Version: Aug 2008. – GeneID: 3064
- [FK03] FRIED, H. ; KUTAY, U.: Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory. In: *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 60 (2003), 1659-1688. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-003-3070-3>. – DOI 10.1007/s00018-003-3070-3
- [FWM⁺06] FLEISCHER, Tracey C. ; WEAVER, Connie M. ; MCAFEE, K. J. ; JENNINGS, Jennifer L. ; LINK, Andrew J.: Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. In: *Genes Dev.* 20 (2006), Mai, 1294-1307. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1422006>. – DOI 10.1101/gad.1422006. – ISSN 0890-9369
- [GDHS01] GROSSHANS, Helge ; DEINERT, Karina ; HURT, Ed ; SIMOS, George: Biogenesis of the Signal Recognition Particle (SRP) Involves Import of SRP Proteins into the Nucleolus, Assembly with the SRP-RNA, and Xpo1p-mediated Export. In: *J. Cell Biol.* 153 (2001), Mai, 745-762. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.153.4.745>. – DOI 10.1083/jcb.153.4.745
- [GLS⁺04] GOEHLER, Heike ; LALOWSKI, Maciej ; STELZL, Ulrich ; WAELTER, Stephanie ; STROEDICKE, Martin ; WORM, Uwe ; DROEGE, Anja ; LINDENBERG, Katrin S. ; KNOBLICH, Maria ; HAENIG, Christian ; HERBST, Martin ; SUOPANKI, Jaana ; SCHERZINGER, Eberhard ; ABRAHAM, Claudia ; BAUER, Bianca ; HASENBANK, Renate ; FRITZSCHE, Anja ; LUDEWIG, Andreas H. ; BUSSOW, Konrad ; COLEMAN, Sarah H. ; GUTEKUNST, Claire-Anne ; LANDWEHRMEYER, Bernhard G. ; LEHRACH, Hans ; WANKER, Erich E.: A Protein Interaction Network Links GIT1, an Enhancer of Huntingtin Aggregation, to Huntington's Disease. In: *Molecular Cell* 15 (2004), September, 853-865. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2004.09.016>. – DOI 10.1016/j.molcel.2004.09.016
- [Gol06] GOLATTA, Michael: Struktur- und Funktionsanalyse von Ataxin-2 mittels bioinformatischer Methoden. (2006)
- [Har82] HARDING, A. E.: The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including

- descendants of the 'the Drew family of Walworth'. In: *Brain* 105 (1982), März, 1-28. <http://brain.oxfordjournals.org>
- [HCW⁺06] HEDGES, John ; CHEN, Yen-I ; WEST, Matthew ; BUSSIÈRE, Cyril ; JOHNSON, Arlen W.: Mapping the Functional Domains of Yeast NMD3, the Nuclear Export Adapter for the 60 S Ribosomal Subunit. In: *J. Biol. Chem.* 281 (2006), Dezember, 36579-36587. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M606798200>. – DOI 10.1074/jbc.M606798200
- [HDD⁺98] HOLMBERG, M ; DUYSKAERTS, C ; DURR, A ; CANCEL, G ; GOURFINKEL-AN, I ; DAMIER, P ; FAUCHEUX, B ; TROTTIER, Y ; HIRSCH, EC ; AGID, Y ; BRICE, A: Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions. In: *Hum. Mol. Genet.* 7 (1998), Mai, 913-918. <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/7/5/913>
- [Hir06] HIRANO, Tomoo: Cerebellar regulation mechanisms learned from studies on GluR $\hat{1}$ 2. In: *Molecular Neurobiology* 33 (2006), Februar, 1-15. <http://dx.doi.org/10.1385/MN:33:1:001>. – DOI 10.1385/MN:33:1:001
- [ISY⁺96] IMBERT, Georges ; SAUDOU, Frederic ; YVERT, Gael ; DEVYS, Didier ; TROTTIER, Yvon ; GARNIER, Jean-Marie ; WEBER, Chantal ; MANDEL, Jean-Louis ; CANCEL, Geraldine ; ABBAS, Nacer ; DURR, Alexandra ; DIDIERJEAN, Olivier ; STEVANIN, Giovanni ; AGID, Yves ; BRICE, Alexis: Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats. In: *Nat Genet* 14 (1996), November, 285-291. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1196-285>. – DOI 10.1038/ng1196-285
- [IVP⁺05] IRWIN, Stuart ; VANDELFT, Mark ; PINCHEV, Deborah ; HOWELL, Jenny L. ; GRACZYK, Joanna ; ORR, Harry T. ; TRUANT, Ray: RNA association and nucleocytoplasmic shuttling by ataxin-1. In: *J Cell Sci* 118 (2005), 233-242. <http://dx.doi.org/10.1242/10.1242/jcs.01611>. – DOI 10.1242/10.1242/jcs.01611
- [KCL⁺00] KEDERSHA, Nancy ; CHO, Michael R. ; LI, Wei ; YACONO, Patrick W. ; CHEN, Samantha ; GILKS, Natalie ; GOLAN, David E. ; ANDERSON, Paul: Dynamic Shuttling of TIA-1 Accompanies the Recruitment of mRNA to Mammalian Stress Granules. In: *J. Cell Biol.* 151 (2000), Dezember, 1257-1268. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.151.6.1257>. – DOI 10.1083/jcb.151.6.1257
- [KGK⁺07] KWON, Yong-Jun ; GENOVESIO, Auguste ; KIM, Nam Y. ; KIM, Hi C. ; JUNG, Sungyong ; DAVID-WATINE, Brigitte ; NEHRBASS, Ulf ; EMANS, Neil: High-Content Classification of Nucleocytoplasmic Import or Export Inhibitors. In: *J Biomol Screen* 12 (2007), August, 621-627. <http://dx.doi.org/10.1177/1087057107301319>. – DOI 10.1177/1087057107301319

- [KIA⁺95] KASHIWABUCHI, Nobuko ; IKEDA, Kazutaka ; ARAKI, Kazuaki ; HIRANO, Tomoo ; SHIBUKI, Katsuei ; TAKAYAMA, Chitoshi ; INOUE, Yoshiro ; KUTSUWADA, Tatsuya ; YAGI, Takeshi ; KANG, Younghan ; AIZAWA, Shinichi ; MISHINA, Masayoshi: Impairment of motor coordination, Purkinje cell synapse formation, and cerebellar long-term depression in GluR[delta]2 mutant mice. In: *Cell* 81 (1995), April, 245-252. [http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90334-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(95)90334-8). – DOI 10.1016/0092-8674(95)90334-8
- [KMT⁺99] KUDO, Nobuaki ; MATSUMORI, Nobuaki ; TAOKA, Hiroshi ; FUJIWARA, Daisuke ; SCHREINER, Erwin P. ; WOLFF, Barbara ; YOSHIDA, Minoru ; HORINOUCI, Sueharu: Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (1999), 9112-9117. <http://www.pnas.org/content/96/16/9112.abstract>
- [KSCT06] KUMAR, Sanjay ; SARADHI, Mallampati ; CHATURVEDI, Nagendra K. ; TYAGI, Rakesh K.: Intracellular localization and nucleocytoplasmic trafficking of steroid receptors: An overview. In: *Molecular and Cellular Endocrinology* 246 (2006), Februar, 147-156. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2005.11.028>. – DOI 10.1016/j.mce.2005.11.028
- [LBBL⁺08] LASTRES-BECKER, Isabel ; BRODESSER, Susanne ; LUTJOHANN, Dieter ; AZIZOV, Mekhman ; BUCHMANN, Jana ; HINTERMANN, Edith ; SANDHOFF, Konrad ; SCHURMANN, Annette ; NOWOCK, Joachim ; AUBURGER, Georg: Insulin receptor and lipid metabolism pathology in ataxin-2 knock-out mice. In: *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008), Mai, 1465-1481. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddn035>. – DOI 10.1093/hmg/ddn035
- [LBRA08] LASTRES-BECKER, Isabel ; RÜB, Udo ; AUBURGER, Georg: Spinocerebellar ataxia 2 (SCA2). In: *The Cerebellum* (2008). <http://dx.doi.org/10.1007/s12311-008-0019-y>. – DOI 10.1007/s12311-008-0019-y
- [LHS⁺06] LIM, Janghoo ; HAO, Tong ; SHAW, Chad ; PATEL, Akash J. ; SZABÓ, Gábor ; RUAL, Jean-François ; FISK, C. J. ; LI, Ning ; SMOLYAR, Alex ; HILL, David E. ; BARABÁSI, Albert-László ; VIDAL, Marc ; ZOGHBI, Huda Y.: A Protein-Protein Interaction Network for Human Inherited Ataxias and Disorders of Purkinje Cell Degeneration. In: *Cell* 125 (2006), Mai, 801-814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.03.032>. – DOI 10.1016/j.cell.2006.03.032
- [LLM⁺07] LATOUCHE, Morwena ; LASBLEIZ, Christelle ; MARTIN, Elodie ; MONNIER, Veronique ; DEBEIR, Thomas ; MOUATT-PRIGENT, Annick ; MURIEL, Marie-Paule ; MOREL, Lydie ; RUBERG, Merle ; BRICE, Alexis ; STEVANIN,

- Giovanni ; TRICOIRE, Herve: A Conditional Pan-Neuronal Drosophila Model of Spinocerebellar Ataxia 7 with a Reversible Adult Phenotype Suitable for Identifying Modifier Genes. In: *J. Neurosci.* 27 (2007), März, 2483-2492. <http://dx.doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5453-06.2007>. – DOI 10.1523/JNEUROSCI.5453-06.2007
- [Mac01] MACARA, Ian G.: Transport into and out of the Nucleus. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001), Dezember, 570-594. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.65.4.570-594.2001>. – DOI 10.1128/MMBR.65.4.570-594.2001
- [MAJ98] MANGUS, David A. ; AMRANI, Nadia ; JACOBSON, Allan: Pbp1p, a Factor Interacting with *Saccharomyces cerevisiae* Poly(A)-Binding Protein, Regulates Polyadenylation. In: *Mol. Cell. Biol.* 18 (1998), Dezember, 7383-7396. <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/18/12/7383>
- [MAY⁺06] MATSUYAMA, Akihisa ; ARAI, Ritsuko ; YASHIRODA, Yoko ; SHIRAI, Atsuko ; KAMATA, Ayako ; SEKIDO, Shigeko ; KOBAYASHI, Yumiko ; HASHIMOTO, Atsushi ; HAMAMOTO, Makiko ; HIRAOKA, Yasushi ; HORINOUCI, Sueharu ; YOSHIDA, Minoru: ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In: *Nat Biotech* 24 (2006), Juli, 841-847. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt1222>. – DOI 10.1038/nbt1222. – ISSN 1087-0156
- [MM03] MORI, Hisashi ; MISHINA, Masayoshi: Roles of diverse glutamate receptors in brain functions elucidated by subunit-specific and region-specific gene targeting. In: *Life Sciences* 74 (2003), Dezember, 329-336. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2003.09.020>. – DOI 10.1016/j.lfs.2003.09.020
- [MMB03] MICHALIK, A ; MARTIN, J-J ; BROECKHOVEN, C V.: Spinocerebellar ataxia type 7 associated with pigmentary retinal dystrophy. In: *Eur J Hum Genet* 12 (2003), Oktober, 2-15. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201108>. – DOI 10.1038/sj.ejhg.5201108. – ISSN 1018-4813
- [NLL⁺07] NEYTON, Sophie ; LESPINASSE, Françoise ; LAHAYE, François ; STACCINI, Pascal ; PAQUIS-FLUCKLINGER, Véronique ; SANTUCCIDARMANIN, Sabine: CRM1-dependent nuclear export and dimerization with hMSH5 contribute to the regulation of hMSH4 subcellular localization. In: *Experimental Cell Research* 313 (2007), Oktober, 3680-3693. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.08.010>. – DOI 10.1016/j.yexcr.2007.08.010
- [NRW⁺07] NONHOFF, Ute ; RALSER, Markus ; WELZEL, Franziska ; PICCINI, Ilaria ; BALZEREIT, Daniela ; YASPO, Marie-Laure ; LEHRACH, Hans ; KROBITSCH, Sylvia: Ataxin-2 Interacts with the DEAD/H-Box RNA Helicase DDX6 and Interferes with P-Bodies and Stress Granules. In: *Mol. Biol. Cell* 18 (2007),

- April, 1385-1396. <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E06-12-1120>. – DOI 10.1091/mbc.E06-12-1120
- [NSL⁺08] NONIS, David ; SCHMIDT, Mirko H. ; LOO, Simone van d. ; EICH, Florian ; DIKIC, Ivan ; NOWOCK, Joachim ; AUBURGER, Georg: Ataxin-2 associates with the endocytosis complex and affects EGF receptor trafficking. In: *Cellular Signalling* In Press, Corrected Proof (2008). <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.05.018>. – DOI 10.1016/j.cellsig.2008.05.018
- [OSB⁺00] OHNO, Mutsuhito ; SEGREF, Alexandra ; BACHI, Angela ; WILM, Matthias ; MATTAJ, Iain W.: PHAX, a Mediator of U snRNA Nuclear Export Whose Activity Is Regulated by Phosphorylation. In: *Cell* 101 (2000), April, 187-198. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80829-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80829-6). – DOI 10.1016/S0092-8674(00)80829-6
- [PNN⁺96] PULST, Stefan-M. ; NECHIPORUK, Alex ; NECHIPORUK, Tamilla ; GISPERT, Suzana ; CHEN, Xiao-Ning ; LOPES-CENDES, Iscia ; PEARLMAN, Susan ; STARKMAN, Sidney ; OROZCO-DIAZ, Guillermo ; LUNKES, Astrid ; DE-JONG, Pieter ; ROULEAU, Guy A. ; AUBURGER, Georg ; KORENBERG, Julie R. ; FIGUEROA, Carla ; SAHBA, Soodabeh: Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2. In: *Nat Genet* 14 (1996), November, 269-276. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1196-269>. – DOI 10.1038/ng1196-269
- [RAN⁺05] RALSER, Markus ; ALBRECHT, Mario ; NONHOFF, Ute ; LENGAUER, Thomas ; LEHRACH, Hans ; KROBITSCH, Sylvia: An Integrative Approach to Gain Insights into the Cellular Function of Human Ataxin-2. In: *Journal of Molecular Biology* 346 (2005), Februar, 203-214. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.024>. – DOI 10.1016/j.jmb.2004.11.024
- [RH97] REDDY, P S. ; HOUSMAN, David E.: The complex pathology of trinucleotide repeats. In: *Current Opinion in Cell Biology* 9 (1997), Juni, 364-372. [http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674\(97\)80009-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0955-0674(97)80009-9). – DOI 10.1016/S0955-0674(97)80009-9
- [RNA⁺05] RALSER, Markus ; NONHOFF, Ute ; ALBRECHT, Mario ; LENGAUER, Thomas ; WANKER, Erich E. ; LEHRACH, Hans ; KROBITSCH, Sylvia: Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways. In: *Hum. Mol. Genet.* 14 (2005), Oktober, 2893-2909. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddi321>. – DOI 10.1093/hmg/ddi321
- [SBS⁺04] SCHÖLS, Ludger ; BAUER, Peter ; SCHMIDT, Thorsten ; SCHULTE, Thorsten ; RIESS, Olaf: Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. In: *The Lancet Neurology* 3 (2004), Mai,

- 291-304. [http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00737-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00737-9). – DOI 10.1016/S1474-4422(04)00737-9
- [SCS⁺06] SCHÜTZ, Sylvia ; CHEMNITZ, Jan ; SPILLNER, Christiane ; FROHME, Marcus ; HAUBER, Joachim ; KEHLENBACH, Ralph H.: Stimulated Expression of mRNAs in Activated T Cells Depends on a Functional CRM1 Nuclear Export Pathway. In: *Journal of Molecular Biology* 358 (2006), Mai, 997-1009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2006.02.041>. – DOI 10.1016/j.jmb.2006.02.041
- [SHP00] SHIBATA, Hiroki ; HUYNH, Duong P. ; PULST, Stefan-M.: A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2. In: *Hum. Mol. Genet.* 9 (2000), Mai, 1303-1313. <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/9/9/1303>
- [SJP02] SATTERFIELD, Terrence F. ; JACKSON, Stephen M. ; PALLANCK, Leo J.: A Drosophila Homolog of the Polyglutamine Disease Gene SCA2 Is a Dosage-Sensitive Regulator of Actin Filament Formation. In: *Genetics* 162 (2002), Dezember, 1687-1702. <http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/162/4/1687>
- [SP06] SATTERFIELD, Terrence F. ; PALLANCK, Leo J.: Ataxin-2 and its Drosophila homolog, ATX2, physically assemble with polyribosomes. In: *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006), August, 2523-2532. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddl173>. – DOI 10.1093/hmg/ddl173
- [STI⁺96] SANPEI, K. ; TAKANO, H. ; IGARASHI, S. ; SATO, T. ; OYAKE, M. ; SASAKI, H. ; WAKISAKA, A. ; TASHIRO, K. ; ISHIDA, Y. ; IKEUCHI, T. ; KOIDE, R. ; SAITO, M. ; SATO, A. ; TANAKA, T. ; HANYU, S. ; TAKIYAMA, Y. ; NISHIZAWA, M. ; SHIMIZU, N. ; NOMURA, Y. ; SEGAWA, M. ; IWABUCHI, K. ; EGUCHI, I. ; TANAKA, H. ; TAKAHASHI, H. ; TSUJI, S.: Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT. In: *Nat Genet* 14 (1996), November, 277-284. <http://dx.doi.org/10.1038/ng1196-277>. – DOI 10.1038/ng1196-277
- [TKM⁺04] TSAI, Chih-Cheng ; KAO, Hung-Ying ; MITZUTANI, Akifumi ; BANAYO, Ester ; RAJAN, Harini ; MCKEOWN, Michael ; EVANS, Ronald M.: Ataxin 1, a SCA1 neurodegenerative disorder protein, is functionally linked to the silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), März, 4047-4052. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400615101>. – DOI 10.1073/pnas.0400615101
- [TRX⁺06] TRUANT, R. ; RAYMOND, L. A. ; XIA, J. ; PICHEV, D. ; BURTNIK, A. ; ATWAL, R. S.: Canadian association of neurosciences review: polyglutamine expan-

- sion neurodegenerative diseases. In: *Can J Neurol Sci* 33 (2006), 278-291. <http://cjns.metapress.com/link.asp?id=eqftbnq2p0rvakcw>
- [WS71] WADIA, N. H. ; SWAMI, R. K.: A new form of heredo-familial spinocerebellar degeneration with slow eye movements (nine families). In: *Brain* 94 (1971), 359-374. <http://brain.oxfordjournals.org>
- [WWG⁺06] WANCE, J. J. F. ; WYTTEBACH, Andreas ; GIULIANO, Paola ; KRETZ-REMY, Carole ; CURRIE, R. W. ; ARRIGO, André-Patrick: Huntingtin inclusion bodies are iron-dependent centers of oxidative events. In: *FEBS Journal* 273 (2006), 5428-5441. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05537.x> – DOI 10.1111/j.1742-4658.2006.05537.x
- [XLT⁺03] XIA, Jianrun ; LEE, Denise H. ; TAYLOR, Jillian ; VANDELFT, Mark ; TRUANT, Ray: Huntingtin contains a highly conserved nuclear export signal. In: *Hum. Mol. Genet.* 12 (2003), Juni, 1393-1403. <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddg156> – DOI 10.1093/hmg/ddg156
- [YGP⁺07] YOUNG, Jessica E. ; GOUW, Launce ; PROPP, Stephanie ; SOPHER, Bryce L. ; TAYLOR, Jillian ; LIN, Amy ; HERMEL, Evan ; LOGVINOVA, Anna ; CHEN, Sylvia F. ; CHEN, Shiming ; BREDESEN, Dale E. ; TRUANT, Ray ; PTACEK, Louis J. ; SPADA, Albert R. L. ; ELLERBY, Lisa M.: Proteolytic Cleavage of Ataxin-7 by Caspase-7 Modulates Cellular Toxicity and Transcriptional Dysregulation. In: *J. Biol. Chem.* 282 (2007), Oktober, 30150-30160. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M705265200> – DOI 10.1074/jbc.M705265200
- [YSZO01] YUE, Shinji ; SERRA, Heliane G. ; ZOGHBI, Huda Y. ; ORR, Harry T.: The spinocerebellar ataxia type 1 protein, ataxin-1, has RNA-binding activity that is inversely affected by the length of its polyglutamine tract. In: *Hum. Mol. Genet.* 10 (2001), 25-30. <http://hmg.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/10/1/25>