

**Pathogenese der spinozerebellären Ataxie Typ 3:
Einfluss der CK2-abhängigen Phosphorylierung auf die
zelluläre Lokalisation und Funktion von Ataxin-3**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Thorsten Müller

aus Berlin

Bonn 2008

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. U. Wüllner
 2. Gutachter: Prof. Dr. J. Höfeld
 3. Gutachter: Prof. Dr. K. H. Scheidtmann
 4. Gutachter: Prof. Dr. J. Piel
- Tag der Promotion: 26.05.08

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Wüllner, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem interessanten Thema zu forschen. In vielen Diskussionen hat er wertvolle Hinweise und Erfahrungen in die Gestaltung der vorliegenden Arbeit einfließen lassen.

Ohne meinen Betreuer Herrn PD Dr. Bernd Evert hätten die Ergebnisse dieser Arbeit nicht erzielt werden können und ich bin ihm zu tiefst dankbar, dass er mir mit seiner fachlichen Kompetenz in zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen und bei der Zusammenstellung der Dissertation stets die erforderliche Guidance gegeben hat. Viele dieser Diskussionen hat Herr Dr. Peter Breuer durch seinen Input bereichert, wofür ich mich recht herzlich bedanke.

Unserem Kooperationspartner in Paris Herrn Prof. Dr. Hervé Tricoire und Christelle Lasbleiz danke ich für das Erstellen der transgenen Fliegen und den dazu gehörigen Untersuchungen, die die Ergebnisse meiner Arbeit wesentlich ergänzt haben.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Höhfeld und den Gutachtern Prof. Dr. Scheidtmann und Prof. Dr. Piel danke ich für die Bereitschaft zur Erstellung der Gutachten zu meiner Dissertation.

Mein Dank geht an unsere Arbeitsgruppe Dr. Ina Schmitt, Hassan Khazneh, Sabine Schmitz, Ana Säcker, Julieta Araujo und Andreas Przewodnik, die mich in vielfacher weise jahrelang bei meiner Forschung unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Walter danke ich für die wertvollen Hinweise, die meine Phosphorylierungs-Versuche wesentlich erleichtert haben und seinem Team Dr. Irfan Tamboli, Sathish Kumar, Martin Siepmann, Esther Barth, Heike Hampel, Patrick Wunderlich und Jessica Hommes für die positiven Gespräche, die oft über die wissenschaftliche Arbeit hinaus gingen.

Vor allem möchte ich meinen Eltern danken, die stets zu mir halten und der wichtigste Rückhalt in meinem Leben sind.

Inhaltsverzeichnis

I. ZUSAMMENFASSUNG.....	1
II. EINLEITUNG	2
2.1 SPINOZEREPELLÄRE ATAXIE TYP 3.....	2
2.2 POLYGLUTAMIN-KRANKHEITEN	3
2.3 FEHLFALTUNG UND AGGREGATION VON POLYGLUTAMIN-HALTIGEN PROTEINEN	4
2.4 ATAXIN-3.....	5
2.5 PHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN.....	8
2.6 PHOSPHORYLIERUNG VON POLYQ-PROTEINEN UND BEDEUTUNG BEI DER POLYQ-INDUZIERTEN PATHOGENESE.....	10
2.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	11
III. MATERIAL UND METHODEN.....	12
3.1 CHEMIKALIEN	12
3.2 PUFFER UND LÖSUNGEN.....	12
3.3 RADIOAKTIVE MATERIALIEN	13
3.4 GERÄTE.....	13
3.5 ZELLEN	14
3.5.1 Bakterienstämme.....	14
3.5.2 Eukaryontische Zelllinien	14
3.6 NÄHRMEDIEN.....	14
3.6.1 Medien für die Zellkultur	14
3.6.2 Medien für Bakterienkulturen	15
3.7 ANTIKÖRPER.....	15
3.7.1 Primäre Antikörper.....	15
3.7.2 Sekundäre Antikörper	16
3.8 VEKTOREN UND DNA-KONSTRUKTE.....	16
3.9 OLIGONUKLEOTIDE	17
3.9.1 Oligonukleotide für die Klonierungen	17
3.9.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung.....	18
3.9.3 Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese.....	18
3.10 LÄNGENSTANDARDS	20
3.11 ENZYME UND KITS.....	20
3.12 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	21
3.12.1 Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien	21
3.12.2 Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	21
3.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22

3.12.4	<i>Restriktionsspaltung von DNA</i>	22
3.12.5	<i>Agarose-Gelelektrophorese</i>	23
3.12.6	<i>Gelelution von DNA-Fragmenten</i>	23
3.12.7	<i>Dephosphorylierung von DNA</i>	23
3.12.8	<i>DNA-Ligation</i>	24
3.12.9	<i>Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA</i>	24
3.12.10	<i>Identifizierung rekombinanter Klone</i>	24
3.12.11	<i>DNA-Sequenzierung</i>	25
3.12.12	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren</i>	25
3.12.13	<i>Zielgerichtete Doppelstrang-Mutagenese</i>	25
3.13	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	26
3.13.1	<i>Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen (Zelllysate)</i>	26
3.13.2	<i>Nukleäre Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen</i>	26
3.13.3	<i>Präzipitationen und Aufreinigung von His-Proteinen</i>	27
3.13.4	<i>Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli</i>	27
3.13.5	<i>Aufreinigung von GST-Fusionsprotein</i>	28
3.13.6	<i>Bestimmung der Proteinkonzentration</i>	28
3.13.7	<i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	28
3.13.8	<i>Coomassie Blau-Färbung</i>	29
3.13.9	<i>Western Blot</i>	29
3.13.10	<i>Ponceau-Rot-Färbung von Western Blot</i>	29
3.13.11	<i>Immunchemische Detektion von Western Blot</i>	30
3.13.12	<i>Autoradiogramm von Western Blot</i>	30
3.13.13	<i>In vitro Phosphorylierung mit CK2 / PKA</i>	31
3.13.14	<i>In vivo Phosphorylierung</i>	31
3.13.15	<i>Phosphoaminosäureanalyse</i>	31
3.13.16	<i>Reportergen-Analysen</i>	32
3.14	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	32
3.14.1	<i>Kultivierung von eukaryontischen Zellen</i>	32
3.14.2	<i>Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen</i>	32
3.14.3	<i>Passagieren der Zellen</i>	33
3.14.4	<i>Bestimmung der Zellzahl</i>	33
3.14.5	<i>Transfektion eukaryontischer Zellen</i>	33
3.14.6	<i>Immunzytochemie</i>	33

IV. ERGEBNISSE	35
4.1 POTENZIELLE PHOSPHORYLIERUNGSMOTIVE DER CASEIN-KINASE II IN ATXN3	35
4.2 CK2 PHOSPHORYLIERT DEN C-TERMINALEN BEREICH VON ATXN3 <i>IN VITRO</i>	36
4.3 CK2 PHOSPHORYLIERT ATXN3 <i>IN VITRO</i> AN SERIN 340	38
4.4 <i>IN VIVO</i> PHOSPHORYLIERUNG VON ATXN3 IN HEK293-ZELLEN	39
4.5 <i>IN VIVO</i> PHOSPHORYLIERUNG DES C-TERMINUS VON ATXN3	42
4.6 WEITERE POTENZIELLE PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN VON ATXN3	43
4.8 MASSENSPEKTROMETRISCHE ANALYSE VON ATXN3	45
4.9 CHARAKTERISIERUNG ALLER PHOSPHORYLIERTEN SERINE IN ATXN3	47
4.10 LOKALISIERUNG VON ATXN3 IN HEK293-ZELLEN	50
4.11 PHOSPHORYLIERUNG VON SERIN 340 UND 352 IN ATXN3 BEEINFLUSST DIE ZELLULÄRE LOKALISIERUNG	51
4.12 PHOSPHORYLIERUNG VON ATXN3 BEEINFLUSST LOKALISIERUNG UND BILDUNG INTRAZELLULÄRER INKLUSIONEN	54
4.13 NUKLEÄRE LOKALISIERUNG VON PHOSPHORYLIERTEN ATXN3 IST UNABHÄNGIG VON DER NLS IN ATXN3	56
4.14 DIE HEMMUNG DER ATXN3-PHOSPHORYLIERUNG MIT EINEM CK2 INHIBITOR VERHINDERT DIE KERNTRANSLOKATION VON ATXN3	57
4.15 CASEIN-KINASE II INTERAGIERT MIT ATXN3	59
4.16 PHOSPHORYLIERUNG VON S236 VERSTÄRKT DIE NUKLEÄRE LOKALISIERUNG VON ATXN3	59
4.17 PHOSPHORYLIERUNG DER CK2-MOTIVE IN DER DRITTEN UIM HAT KEINEN EINFLUSS AUF UBIQUITIN-BINDUNGS-EIGENSCHAFTEN VON ATXN3	61
4.18 DIE PHOSPHORYLIERUNG VON ATXN3 BEEINFLUSST NICHT DIE INTERAKTION VON ATXN3 MIT RAD23B, VCP ODER HDAC3	62
4.19 PHOSPHORYLIERUNG VON ATXN3 STEIGERT DIE TRANSKRIPTIONELLE REPRESSION DES MMP-2 GENS	64
V. DISKUSSION	67
5.1 IDENTIFIZIERUNG RELEVANTER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN IN ATXN3	67
5.2 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG AUF SUBZELLULÄRE LOKALISIERUNG	68
5.3 EINFLUSS DER PHOSPHORYLIERUNG AUF AGGREGATION UND TOXIZITÄT	69
5.4 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG DER ATXN3-PHOSPHORYLIERUNG	71
VI. LITERATURVERZEICHNIS	76
VII. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	86
VIII. LEBENS LAUF	88

I. Zusammenfassung

Bei den autosomal-dominant vererbten spinozerebellären Ataxien handelt es sich um neurodegenerative Erkrankungen, die durch einen selektiven Verlust von Nervenzellen im zentralen Nervensystem gekennzeichnet sind. Die spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist die weltweit häufigste Form einer vererbten Ataxie-Erkrankung. Sie wird durch eine CAG-Repeat-Expansion im translatierten Bereich eines Gens verursacht, das für Ataxin-3, ein 42 kDa großes Protein mit bisher unvollständig geklärter physiologischer Funktion, kodiert. Normales Ataxin-3 wird ubiquitär exprimiert und findet sich überwiegend im Zytoplasma von Zellen. Die CAG-Trinukleotid-Expansion bewirkt, dass Ataxin-3 mit einem verlängerten Polyglutamin-Abschnitt exprimiert wird und im Zellkern als unlösliches Proteinaggregat auftritt. Die Kerntranslokation und Aggregation von Ataxin-3 stellt einen entscheidenden pathogenetischen Prozess dar, der mit Neurodegeneration und Zelltod verbunden ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals durch systematische *in silico* Analysen und Mutagenese-Studien ein Kerntranslokations-Mechanismus von Ataxin-3 identifiziert werden. Dieser beruht auf der Phosphorylierung von drei Serinen durch Casein-Kinase II (CK2), im ersten und dritten Ubiquitin-interagierenden Motiv von Ataxin-3. Während die CK2-Phosphorylierung von normalen Ataxin-3 zu einer Steigerung der transkriptionellen Repressoraktivität im Kern führt, kommt es bei expandierten Ataxin-3 zu einer verstärkten nukleären Aggregation des mutierten Proteins und einem Verlust der transkriptionellen Ataxin-3-Repressoraktivität. Durch pharmakologische Inhibition der CK2-Aktivität konnte ferner gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation und nukleäre Aggregation von Ataxin-3 verhindert werden kann. Aus den Ergebnissen läßt sich schliessen, dass die CK2-abhängige Phosphorylierung von Ataxin-3 einen entscheidenden Einfluss auf die Lokalisierung und Funktion des Proteins hat und an der SCA3-Pathogenese beteiligt ist.

II. Einleitung

2.1 Spinozerebelläre Ataxie Typ 3

Die spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist die weltweit häufigste, autosomal dominant vererbte Ataxie, die ursprünglich bei Patienten portugiesischer Herkunft von den Azoren beschrieben wurde (Nakano et al. 1972; Woods et al. 1972). Die SCA3 beginnt im frühen bis mittleren Erwachsenenalter (30-40 Jahren) und ist durch eine progressive Ataxie (Störung der Bewegungskoordination) gekennzeichnet. Zusätzlich können Störungen der Okulomotorik (Augenbewegung), Pyramidenbahnzeichen (pathologisch krankhafte Reflexe), bulbäre Symptome (Schluck- und Sprachstörungen), Polyneuropathie (Erkrankung des peripheren Nervensystems), Basalgangliensymptomatik (motorische Störungen) und kognitive Störungen auftreten. Die der SCA3 zugrundeliegende Neurodegeneration betrifft in erster Linie die pontinen Kerne (Hirnnervenkerne) im Hirnstamm, den Nucleus dentatus (Kleinhirn), die Basalganglien (Substantia nigra, Pallidum, Nucleus subthalamicus) und das Rückenmark (Vorderhorn, Clarke'sche Säule) (Dürr et al., 1996).

Die kausale Mutation ist eine verlängerte CAG-Trinukleotid-Wiederholung (*Repeat*) in Exon 10 des SCA3-Gens (Kawaguchi et al., 1994) und kodiert einen Polyglutamin-(PolyQ)-Abschnitt im Genprodukt Ataxin-3 (ATXN3) (Paulson et al., 1997). Der Erkrankungsbeginn und der Schweregrad der Erkrankung korreliert invers mit der Länge des CAG-Trinukleotid-Abschnitts im SCA3-Gen. Während gesunde Menschen zwischen 12 und 37 CAG-Repeats aufweisen, finden sich bei SCA3-Patienten 55 bis 84 CAG-Repeats. So erkranken Menschen mit 60 CAG-Repeats etwa im Alter von 62 Jahren und Menschen mit 82 CAG-Repeats bereits im Alter von 14 Jahren (Dürr et al., 1996; Maruyama et al., 2002). Die Ursache der CAG-Trinukleotid-Verlängerung ist bislang nicht eindeutig geklärt, könnte aber bei der DNA-Replikation durch ein sog. „gene slippage“ der DNA-Polymerase verursacht werden (Sinden, 1999).

2.2 Polyglutamin-Krankheiten

Neben der SCA3 werden weitere dominant vererbte, neurodegenerative Erkrankungen durch CAG-Trinukleotid-Repeats verursacht und als Polyglutamin-(PolyQ)-Krankheiten bezeichnet (s. Tabelle 2.1). Bei all diesen Erkrankungen, zu denen neben der SCA3 die Huntington'sche Krankheit (HD), die spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), weitere spinocerebelläre Ataxien (SCA1, 2, 6, 7, 17) und die dentatorubropallidoluyische Atrophie (DRPLA) gehören, kommt den expandierten Polyglutaminhaltigen Genprodukten eine wichtige pathogenetische Rolle zu. Die Erkrankungsproteine weisen abgesehen von der PolyQ-Domäne keine Ähnlichkeiten untereinander auf. Darüber hinaus sind bei jeder PolyQ-Krankheit nur bestimmte Nervenzellen in bestimmten Gehirnregionen betroffen, obwohl die Proteine ubiquitär exprimiert werden.

Tabelle 2.1 PolyQ-Krankheiten: Name, verantwortliches Protein, Molekulargewicht (kDa) des Wildtyp-Proteins, Glutaminanzahl bei gesunden und kranken Menschen.

PolyQ-Krankheit	Protein	Protein (kDa)	Q _n (Wildtyp)	Q _n (Pathogen)
SCA 3 = MJD	Ataxin-3	42	12-42	61-86
HD	Huntingtin (Htt)	350	3-36	36-80
DRPLA	Atrophin 1	124	9-36	49-88
SBMA	Androgen-Rezeptor (AR)	99	93-36	38-62
SCA1	Ataxin-1	87	6-44	39-88
SCA2	Ataxin-2	140	14-34	32-77
SCA6	CACNA1A (Kalziumkanal α 1A)	160-250	4-18	21-33
SCA7	Ataxin-7	95	4-35	37-300
SCA17	TATA binding protein (TBP)	37	25-42	47-63

2.3 Fehlfaltung und Aggregation von Polyglutamin-haltigen Proteinen

Bereits kurz nach Entdeckung der CAG-Repeat-Mutationen wies Perutz auf die erhöhte Neigung von Polyglutamin-haltigen Proteinen zur Aggregation hin (Perutz et al., 1994). Angeregt durch diese Vorstellung wurden *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass trunkiertes expandiertes Huntingtin tatsächlich aggregiert und Amyloid-ähnliche Fibrillen bildet (Scherzinger et al., 1997). Der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Aggregation ist nach heutiger Auffassung eine Änderung der Proteinkonformation von einer random coil- zu einer β -Faltblatt-Struktur gefolgt von Oligomerisierung. Die intramolekulare Konformationsänderung tritt in Polyglutamin-haltigen Proteinen mit einer Repeatlänge oberhalb des kritischen Bereichs von 35 bis 40 Einheiten auf. Oligomere könnten den Ausgangspunkt für eine Polymerisation zu Amyloid-ähnlichen Fibrillen, wie sie auch bei der Alzheimer Erkrankung gefunden werden, darstellen. Als mögliches *in vivo*-Korrelat dieser Vorgänge wurden bei allen Polyglutamin-Krankheiten im Zellkern und in geringerem Umfang im Zytoplasma von Neuronen lichtmikroskopisch sichtbare Aggregate, sog. neuronale Inklusionen (NI), gefunden (s. Abb. 2.1), deren Hauptbestandteil das expandierte und immobilisierte Krankheitsprotein ist (Chai et al., 2002).

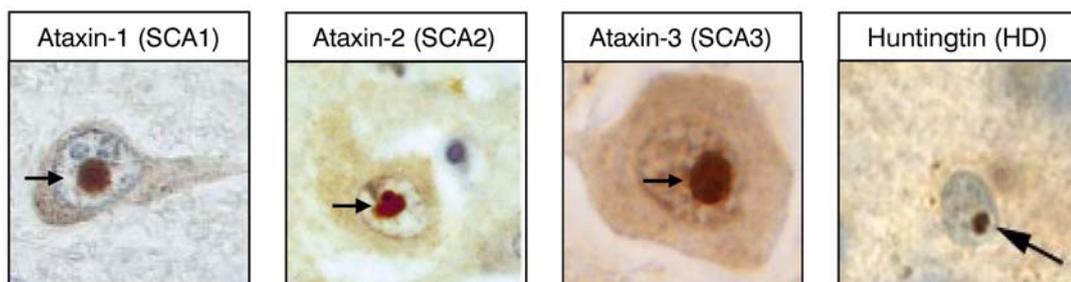


Abb 2.1 Neuronale intranukleäre Inklusionen (Pfeile) bei den Polyglutamin-Krankheiten SCA1, SCA2, SCA3 und HD.

Die Bedeutung der NI für die Pathogenese dieser neurodegenerativen Erkrankungen ist nicht endgültig geklärt. Eine Denkrichtung argumentiert, die NI und die mit ihnen verbundene nukleäre Pathologie seien die eigentliche Ursache der neurologischen Störungen, da durch die Inklusionen essenzielle Kernfunktionen beeinträchtigt würden. Auf der anderen Seite könnte die Ablagerung der Krankheitsproteine in Form von Inklusionen auch einen Mechanismus darstellen, durch den abnorme Proteine

unschädlich gemacht werden. Für diese Vorstellung sprechen Untersuchungen an transgenen SCA1-Mäusen, bei denen eine Deletion in der Selbstassoziationsregion des Gens die Bildung der NI, jedoch nicht die Entwicklung des neurologischen Phänotyp, verhindert (Klement et al., 1998).

Die Hypothese, dass die Fehlfaltung bei der Aggregation von den Krankheitsproteinen oder ihrer Spaltprodukte von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese der Polyglutamin-Erkrankungen ist, leitet sich vor allem aus Befunden her, dass aggregations hemmende Peptide und Chaperone des Hsp70/Hsp40-Systems den Krankheitsphänotyp in Zellkultur- und Tiermodellen von Polyglutamin-Erkrankungen verhindern (Warrick et al., 1999; Kazantsev et al., 2002). Das Hsp70/Hsp40-System fördert in einem ATP-abhängigen Prozess die korrekte Faltung von Proteinen und wirkt der Bildung von β -Faltblattstrukturen und der Proteinaggregation entgegen. Die in mehreren Modellen beobachtete Dissoziation zwischen Auftreten des Krankheitsphänotyps und Bildung von NI spricht dagegen, dass NI diejenigen Aggregate darstellen, die für Krankheitsentstehung entscheidend sind (Klement et al., 1998; Warrick et al., 1999). Überlebensstudien mit transfizierten Zellen zeigten, dass die Mortalität mit der Menge von diffus verteiltem Huntingtin (Htt) korreliert, aber nicht mit der Menge von Htt-Aggregaten (Arrasate et al., 2004). Dennoch scheinen auch NI zur Pathogenese beizutragen. In NI werden zahlreiche zelluläre Proteine, wie z.B. Transkriptionsfaktoren sequestriert (Chai et al., 2002; Donaldson et al., 2003). Dies könnte zu einem zunehmenden Mangel an essenziellen Proteinen führen. Zudem scheint auch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) betroffen zu sein, so dass ein geregelter Abbau dieser sequestrierten Proteine oder der Krankheitsproteine möglicherweise nicht erfolgt und dadurch, wenn nicht zur Krankheitsentstehung, doch zur Krankheitsprogression beitragen.

2.4 Ataxin-3

Das Genprodukt des SCA3-Gens, Ataxin-3 (ATXN3), ist ein ubiquitär exprimiertes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 42 kDa, das bis zur Entdeckung der SCA3-Mutation unbekannt war. ATXN3 ist ein sehr mobiles Protein, das sowohl im Zytoplasma als auch im Kern zu finden ist (Tait et al., 1998; Chai et al., 2002). Im

Kern assoziiert ATXN3 mit der nukleären Matrix, während über die subzelluläre Lokalisierung des zytoplasmatischen Anteils von ATXN3 wenig bekannt ist.

ATXN3 ist Mitglied einer neuen Familie deubiquitinierender Enzyme (DUB), die als Josephin-Familie bezeichnet wird und verschiedene Ubiquitin-spezifische Cystein-Proteasen mit einem strukturell konserviertem katalytischem Zentrum enthält (s. Abb. 2.2) (Albrecht et al., 2004; Burnett et al., 2003; Scheel et al., 2003; Tzvetkov u Breuer, 2007). Die zellulären Funktionen von Josephin-Proteinen sind, wie die der meisten DUBs (Kim et al., 2003; Kuhlbrodt et al., 2005), noch weitgehend ungeklärt. Für ATXN3 konnte jedoch gezeigt werden, dass es polyubiquitinierte Proteine über konservierte Ubiquitin-Interaktions-Motive (UIM) in der C-terminalen Domäne bindet und eine spezifische Deubiquitinierung interagierender Substrate über das katalytische Zentrum im N-terminalen Bereich vermittelt (Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004). ATXN3 ist ferner an der Erkennung proteolytischer Substrate beteiligt und verhindert die proteasomale Degradation polyubiquitinerter Proteine (Doss-Pepe et al., 2003; Berke et al., 2005). Interessanterweise findet man normales ATXN3 nicht nur in Aggregaten bei der SCA3 selbst, sondern auch in Einschlusskörpern bei anderen Polyglutamin-Krankheiten, wie der SCA1, SCA2 und der dentatorubropallidoluyischen Atrophie (Uchihara et al, 2001), und möglicherweise auch bei der amyotrophen Lateralsklerose (Seilhean, 2004). Diese Befunde deuten darauf hin, dass physiologische Funktionen von ATXN3, die durch Akkumulation fehlgefalteter Proteine und einer Störung des UPS gekennzeichnet sind, bei neurodegenerativen Erkrankungen von Bedeutung sein könnten.

Darüber hinaus regulieren die DUB-Aktivität und die UIMs von ATXN3 die Aggresomen-Bildung, in dem sie fehlgefaltete Proteine zu dem an der Kernmembran lokalisierten Mikrotubulus-organisierenden Zentrum transportieren (Burnett u Pittman, 2005). Die Ubiquitin-assoziierten Aktivitäten von ATXN3 wirken neuroprotektiv und können eine Polyglutamin-induzierte Toxizität *in vivo* signifikant unterdrücken (Warrick et al., 2005). Eine weitere wichtige Rolle besitzt ATXN3 beim Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau fehlgefalteter Proteine des endoplasmatischen Retikulums (ER), in dem es mit dem *valosin-containing protein* (VCP/p97) interagiert und die Retrotranslokation fehlgefalteter ER-Proteine reguliert (Boeddrich et al., 2006; Wang et al., 2006; Wójcik et al., 2006; Zhong & Pittman, 2006). Die genaue Rolle von

ATXN3 ist dabei noch unklar. Während die Überexpression von ATXN3 die Gleichgewichtsmenge der ER-Modell-Substrate CD3 δ und TCR α erhöht und die RNAi-vermittelte Verminderung der Expression des endogenen ATXN3 destabilisierend zu wirken scheint (Zhong & Pittman, 2006), beschreiben Wang et al. einen generell verstärkenden Einfluss von ATXN3 auf den Abbau von ERAD (ER-assoziierte Degradation)-Substraten (Wang et al., 2006).

Untersuchungen zur Identifizierung funktioneller Krankheitsmediatoren bei der SCA3 belegen eine zentrale Rolle von ATXN3 in der Protein-Qualitätskontrolle durch das UPS und die Autophagozytose (Bilen & Bonini, 2007). ATXN3-interagierende Proteine, wie die DNA-Reparaturproteine HHR23A und HHR23B, die den Ubiquitin-abhängigen proteasomalem Abbau von Proteinen im Zellkern regulieren und Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER)-Prozesse beeinflussen, weisen darüber hinaus auf eine vermutlich weitere Funktion von ATXN3 bei der DNA-Reparatur hin (Wang et al., 2000; Lim et al., 2006). HHR23A und HHR23B besitzen beide Ubiquitin-ähnliche (Ubl) Domänen, die eine Bindung mit der S5a Untereinheit des 26S Proteasom eingehen und vermutlich für die NER-Aktivität notwendig sind (Hiyama et al., 1999; Lommel et al., 2000).

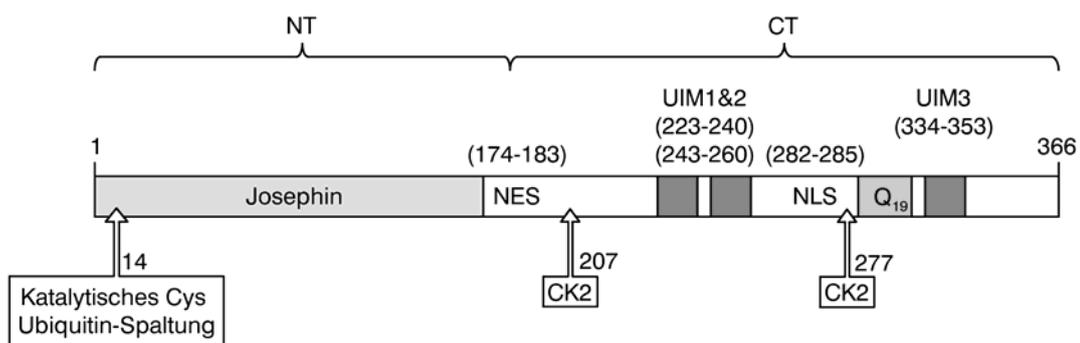


Abb 2.2 Aminosäurepositionen konservierter Domänen von ATXN3. Dargestellt sind die Josephin-Domäne, die drei UIM (Ubiquitin-Interagierende-Motive), das putative Kernlokalisierung (NLS) - und Kernexport-Signal (NES), die Polyglutaminregion mit 19 Glutaminen (Q19), sowie die putativen CK2-Motive und das katalytische Cystein in Position 14.

Neben seiner Beteiligung am UPS oder ERAD fungiert ATXN3 als transkriptioneller Ko-Repressor. ATXN3 bindet den Ko-Aktivator CBP (*cAMP response element binding protein-binding protein*), inhibiert dessen Histon-Azetyltransferase-(HAT)-Aktivität

und reprimiert die durch CBP-vermittelte Transkription (Li et al., 2002). Diese Repressoraktivität beruht auf einer direkten CBP-Bindung an den C-terminalen Anteil und einer vom N-terminalen Anteil vermittelten Interaktion mit den Histonproteinen H3 und H4 (Li et al., 2002).

Desweiteren konnten Evert et al. zeigen, dass ATXN3 an spezifische DNA-Motive in distinkten Chromatinbereichen zellulärer Gene bindet, Histon-deazetylierende Komplexe mit den Ko-Repressoren NCoR und HDAC3 auf Genpromotoren bildet und die Transkription physiologischer Zielgene reprimiert. Dadurch beeinflusst ATXN3 unmittelbar die Chromatinkonformation und kontrolliert epigenetisch die Transkription bestimmter Zielgene (Evert et al., 2006). Die modulierenden Eigenschaften von ATXN3 auf den Histon-Azetylierungsgrad sind ferner für die CAG-Repeat-Stabilität des SCA3-Gens in nachfolgenden Generationen verantwortlich (Jung & Bonini, 2007). ATXN3 stellt somit ein Protein mit mehreren unterschiedlichen Eigenschaften dar, die sowohl transkriptionelle Regulationsmechanismen als auch Mechanismen der Proteinstabilität und des Proteinabbaus beeinflussen.

2.5 Phosphorylierung von Proteinen

Die Phosphorylierung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus der Zelle, um z.B. die katalytische Aktivität, subzelluläre Lokalisierung oder die Bindungseigenschaften von Proteinen zu verändern. Die Phosphorylierung von Proteinen wird durch verschiedene Kinasen vermittelt, die γ -Phosphatgruppen von ATP auf Zielproteine übertragen. Die Phosphorylierung erfolgt dabei an den Hydroxyl-(OH)-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin. Die Proteinkinasen werden in zwei Hauptgruppen unterteilt: (1) Serin/Threonin-Kinasen phosphorylieren Proteine an den Aminosäuren Serin und/oder Threonin und (2) Tyrosin-Kinasen phosphorylieren Proteine an der Aminosäure Tyrosin (Krebs & Beavo, 1979). Daneben gibt es auch Proteinkinasen, die sowohl Serin und Threonin als auch Tyrosin phosphorylieren können (Lindberg et al., 1992). Die Entfernung der Phosphatgruppen erfolgt dagegen durch Proteinphosphatasen (s. Abb. 2.3).

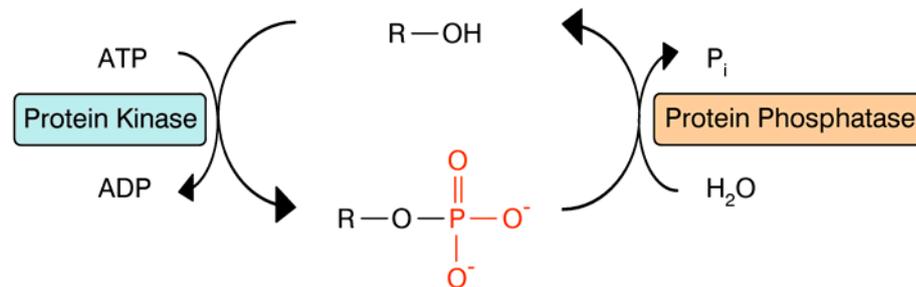


Abb. 2.3 Schematische Darstellung der Phosphorylierung durch Proteinkinasen und Dephosphorylierung durch Proteinphosphatasen.

Die Proteinkinasen repräsentieren die zweitgrösste Proteinfamilie in eukaryotischen Zellen nach den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) (Bockaert & Pin, 1999). Im humanen Genom kodieren etwa 500 bis 600 Gene für verschiedene Proteinkinasen (Manning et al., 2002), die hinsichtlich ihrer Spezifität und Funktion bestimmten Untergruppen zugeordnet werden. Bei den Serin-/Threonin-Kinasen werden z.B. Kinasen aus den Familien der Proteinkinase A, Proteinkinase B, Proteinkinase C, Calcium/Calmodulin-abhängige Kinasen und Casein-Kinase II unterschieden. Die Proteinkinasen A (PKA), auch sog. cAMP-abhängige Kinasen, sind die am besten charakterisierten Proteinkinasen bezüglich ihrer biochemischen und strukturellen Eigenschaften (Taylor et al., 1993). PKAs werden durch den Botenstoff zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) reguliert (Walsh et al., 1968) und spielen eine entscheidene Rolle bei der Regulation des Energiestoffwechsels, der Signaltransduktion, der Differenzierung und dem Zellwachstum. Die Proteinkinase C (PKC) erkennt ähnliche Phosphorylierungsmotive wie die PKA und besitzt ebenfalls regulierende Funktionen bei der Signaltransduktion und Zellproliferation. Desweiteren haben PKCs regulatorische Auswirkungen auf die Gedächtnisbildung (Grünbaum & Müller, 1998). Die Proteinkinase B (PKB) oder Akt-Kinase ist Bestandteil des PI3K/Akt-Signalwegs, der für die Regulation von Zellproliferation, Stoffwechsel und zellulärer Homöostase wichtig ist.

Die Casein-Kinase II (CK2) ist eine hochkonservierte, weitverbreitete tetramere Ser/Thr-Phosphotransferase, die aus zwei katalytischen und zwei regulatorischen Untereinheiten besteht. Die große Anzahl von physiologischen CK2-Substraten weist

auf eine Beteiligung bei einer großen Zahl zellulärer Funktionen hin. Neben dem Einfluss der CK2 auf das Zellwachstum und bei der Unterdrückung von Apoptose beeinflusst die CK2 spezifische neuronale Funktionen (Blanquet, 2000; Di Maira et al., 2005). Der CK2-Anteil im Gehirn ist höher als in anderen Geweben. Im Hippocampus wird die Aktivität der CK2 durch Neurotrophine stimuliert und die CK2 ist in dieser Gehirnregion an der Neuritogenese (Entwicklung der Neuriten), Langzeit-Potenzierung, synaptischen Transmission und Plastizität beteiligt (Ulloa et al., 1994; Liebman & Mody, 1999; Lin et al., 2001; Ulery & Nestler, 2007).

2.6 Phosphorylierung von PolyQ-Proteinen und Bedeutung bei der PolyQ-induzierten Pathogenese

Bei mehreren Polyglutamin-Krankheiten konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der jeweiligen Erkrankungsproteine eine wichtige Rolle bei der Pathogenese spielt. Bei der HD verringert die Phosphorylierung des Insulin-Wachstumsfaktors IGF-1 über den Akt/PKB-Signalweg den durch das Krankheitsprotein Huntingtin-induzierten neuronalen Zelltod. Hierbei führt die Phosphorylierung von IGF-1 zur Aktivierung der Akt-Kinase, welche dann Huntingtin am Serinrest 421 phosphoryliert und einen neuroprotektiven Effekt bewirkt, der auch die Bildung von NIs hemmt (Humbert et al., 2002).

Das Erkrankungsprotein der DRPLA, Atrophin-1, wird *in vitro* am Serinrest 734 durch die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) phosphoryliert. Kinetische Studien haben gezeigt, dass mutiertes Atrophin-1 eine verringerte Affinität zu JNK aufweist als der Wildtyp. Die daraus resultierende verlangsamte Phosphorylierung von mutantem Atrophin-1 verzögert zelluläre Prozesse, die für das neuronale Überleben entscheidend sind (Okamura-Oho et al., 2003).

Untersuchungen am Androgen-Rezeptor, dem Erkrankungsprotein der SBMA, haben gezeigt, dass die Phosphorylierung am Serinrest 514 durch den MEK1/2 MAP-Kinase-Signalweg die proteolytische Spaltung durch Caspase-3 und die Erzeugung toxischer Fragmente erhöht (LaFevre-Bernt & Ellerby, 2003).

Die Pathogenese der SCA1 korreliert mit einer spezifischen Phosphorylierung durch die Akt-Kinase am Serinrest 776 in Ataxin-1. Transgene SCA1-Mäuse, die eine nicht-phosphorylierbare Form des expandierten Ataxin-1 exprimieren, zeigen deutlich

verringerte Krankheitssymptome (Emamian et al., 2003). Es konnte ferner gezeigt werden, dass das regulatorische Multifunktionsprotein 14-3-3 die Neurotoxizität von Ataxin-1 vermittelt, indem es phosphoryliertes Ataxin-1 bindet und dessen proteolytischen Abbau verlangsamt (Chen et al., 2003). Die Interaktion zwischen Akt-phosphoryliertem Ataxin-1 und 14-3-3 verstärkt sich mit zunehmender Polyglutamin-Länge (Chen et al., 2003). Im SCA1-Fliegenmodell führt die Überexpression der Akt-Kinase zu einer Verstärkung des pathologischen Phänotyps, während die Unterdrückung der Akt-Kinase-Aktivität den Phänotyp deutlich verbessert (Chen et al., 2003). Der Akt-Signalweg und 14-3-3 haben somit einen entscheidenden Einfluss auf die Neurotoxizität von Ataxin-1 bei der SCA1-Pathogenese.

2.7 Zielsetzung der Arbeit

PolyQ-Krankheiten sind durch neuronalen Zellverlust und Bildung intranukleärer Inklusionen gekennzeichnet, die als Hauptkomponente das jeweilige mutierte Protein enthalten. Die Kerntranslokation und Aggregation PolyQ-expandierter Proteine stellt einen entscheidenden pathogenetischen Prozess dar, der letztlich zum neuronalen Zelltod führt. Die bisherigen Befunde zur Bedeutung der Phosphorylierung PolyQ-expandierter Proteine haben gezeigt, dass posttranslationale Modifikationen der Proteine einen entscheidenden Einfluss auf die Neurotoxizität und/oder subzelluläre Lokalisierung haben. In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob ATXN3 spezifisch phosphoryliert wird und welchen Effekt eine solche Phosphorylierung auf die durch expandiertes ATXN3-induzierte Neurotoxizität und zelluläre Lokalisierung hat.

Dazu werden im einzelnen potenzielle Phosphorylierungsmotive verschiedener Proteinkinasen zunächst durch *in silico* Analysen in ATXN3 identifiziert und mit Hilfe Phosphorylierungs-defizienter und -imitierender ATXN3-Konstrukte überprüft. Darüber hinaus soll geklärt werden, ob die Phosphorylierung von ATXN3 einen Einfluss auf die Inklusionsbildung, Protein-Protein-Interaktionen und bekannte Funktionen von ATXN3 besitzt.

III. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Deisenhofen) und Roth (Karlsruhe) bezogen.

3.2 Puffer und Lösungen

Laemml-Laufpuffer (2x):	500 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50% (w/v) Glycerin, 16% (w/v) SDS, 20 mM EDTA, 0.2% (w/v) Bromphenolblau, 8 mM DTT
Lyse-Puffer: (Eukaryonten)	150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.2, 1% Natrium-desoxycholat, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1mM DTT
PBS:	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7.4
SDS-Sammelgelpuffer:	125 mM Tris-HCl, 0.1% SDS, pH 6.8
SDS-Trenngelpuffer:	370 mM Tris-HCL, 0.1% SDS, pH 8.8
Western Blot-Laufpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 1 % (w/v) SDS
Western Blot-Transferpuffer:	25 mM Tris, 192 mM Glyzin, 20 % (v/v) Methanol
DNA-Ladepuffer (10x):	60% Saccharose, 0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 0.25 M EDTA
TAE-Puffer:	1 mM EDTA, 40 mM Tris-HCl, Essigsäure, pH 8

Weitere Lösungen sind in den entsprechenden Abschnitten aufgeführt.

3.3 Radioaktive Materialien

[$\gamma^{32}\text{P}$] ATP, 370 MBq/ml, 10 mCi/ml, >5000 Ci/mMol Amersham Biosciences

3.4 Geräte

Tabelle 3.1 Verwendete Geräte

Gerät	Bezugsquelle
-20 °C Gefrierschrank	BOSCH
-80 °C Gefrierschrank	Haeraus
37 °C CO ₂ -Inkubator, IR Autoflow	Nuaire
Sterilwerkbank, Hera Safe	Heraeus
Vakuumpzentrifuge	Savant
Wasserbad, Y22	Grant
Zellkultur-Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus
Tischkühlzentrifuge, Primo R	Heraeus
Ultrazentrifuge, J2-21	Beckman
Sequenzierer, ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
PCR-Maschine, Tpersonal&professional	Biometra
Schüttelinkubator	HAT Infors AG
37 °C Inkubator	Memmert
Gel-Elektrophoresekammern	Amersham Bioscience
SDS-PAGE Elektrophoresekammern	Biorad
Transferkammern	Biorad
Filmentwicklungsgerät	Agfa
UV-Lampe + Gel-Dokumentation (Kamera)	INTAS
Photometer, Smartspec 3000	Biorad
pH-Meter, Toledo	METTLER
Vortex, MSI Minishaker	IKA
Heizblock (Shaker), Thermomixer comfort	Eppendorf
Überkopfschüttler, Roto Shake Genie	Scientific Industries Inc.
Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M	Zeiss
Zellkultur-Mikroskop, Axiovert 25	Zeiss
Waage, BP2000&BP2110D	Sartorius

3.5 Zellen

3.5.1 Bakterienstämme

Tabelle 3.2 Verwendete Bakterienstämme von E.coli.

<i>E.coli</i> Stamm	Bezugsquelle
DH5 α	Invitrogen
XL1 Blue	Invitrogen
TOP10	Invitrogen

3.5.2 Eukaryontische Zelllinien

HEK293: Humane embryonale Nierenzellen (human embrionic kidney)

MEF: Murine embrionale Fibroblasten

CSM14.1: Mesenzephal Rattenzellen

3.6 Nährmedien

3.6.1 Medien für die Zellkultur

Für die Zellkultur wurde das Medium DMEM + Glutamin (Dulbecco's modified Eagle's Medium) der Firma PAA bezogen. Vor der Verwendung wurden dem Medium folgende Zusätze zugegeben:

10 % Hitze-inaktiviertes fötales Kälberserum (PAA)

50 U/ml Penizillin und 50 μ g/ml Streptomycin (PAA)

Für die Markierung mit radioaktiven Orthophosphat wurden die Zellen in phosphatfreiem DMEM Medium + Glutamin kultiviert.

3.6.2 Medien für Bakterienkulturen

LB-Medium: 10 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Bacto-Trypton, pH 7.5

LB-Medium wurde bei 120 °C und 1,2 bar für 20 Min autoklaviert und nach Abkühlen mit 100 µg/ml Ampizillin (Roth) als Selektionsantibiotika versetzt.

Für die Herstellung von LB-Agarplatten mit Ampicillin wurde zu LB-Medium 20 g/l Agar (Invitrogen) hinzugefügt und bei 120 °C und 1,2 bar für 20 Min autoklaviert. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde 100 µg/ml Ampizillin zugesetzt und das Gemisch in die Platten gegossen.

3.7 Antikörper

3.7.1 Primäre Antikörper

Tabelle 3.3 Verwendete primäre Antikörper.

Bezeichnung	Verwendung	Bezugsquelle
Anit-GST	WB, IP	Sigma-Aldrich
Anti-HIS	WB, IP, IF	Qiagen
Anti-Myc	IF	Sigma-Aldrich
Anti-Aktin	WB	Sigma-Aldrich
Anti-Presenilin-2	WB	Walter AG, UKB
Anti-Histon H3	WB	Walter AG, UKB
Anti-RAD23B	WB	Wanker AG, MPI, Berlin
Anti-HDAC3	WP, IF	Sigma-Aldrich
Anti-CK2	WP	Santa Cruz
Anti-VCP	WP, IF	Santa Cruz

Abkürzungen: Immunpräzipitation (IP), Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

3.7.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 3.4 verwendete sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Antigen	Verwendung	Bezugsquelle
Anit-rabbit-HRP	Kaninchen IgG	WB	Sigma-Aldrich
Anti-mouse-HRP	Maus IgG	WB	Sigma-Aldrich
Anti-sheep-HRP	Schaf IgG	WB	Sigma-Aldrich
Alexa Fluor 488	Maus IgG	IF	Molecular Probes
Alexa Fluor 594	Maus IgG	IF	Molecular Probes

Abkürzungen: Immunpräzipitation (IP), Western Blot (WB) und Immunfluoreszenz (IF)

3.8 Vektoren und DNA-Konstrukte

Für die Klonierung von DNA-Fragmenten wurden folgende Vektoren benutzt:

Tabelle 3.5 Übersicht der verwendeten Vektoren

Bezeichnung	Funktion	Bezugsquelle
pGEX-5X-1	Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	Amersham
pcDNA3-His	Expression von His-Fusionsproteinen in eukaryontischen Zellen	Invitrogen

In Tabelle 3.6 sind die ATXN3-Konstrukte aufgeführt, die für die vorliegende Arbeit kloniert und verwendet wurden. Angegeben sind die jeweiligen Aminosäurepositionen von ATXN3 der klonierten DNA-Fragmente, sowie die Oligonukleotide, die zur Klonierung verwendet wurden und die entsprechenden Restriktionsschnittstellen.

Tabelle 3.6 Klonierte DNA-Konstrukte

Vektor	DNA-Konstrukt	Fragment (AS)	Restriktions-schnittstellen (5', 3')	Oligonukleotide (5', 3')
pGEX5X-1	Ataxin-3 Q23	AT3-WT 1-361	BamHI, BamHI	AT3-B-F, AT3-B-R
		AT3-NT 1-191	BamHI, BamHI	AT3-B-F, AT3-NT-B-R
		AT3-CT 191-361	BamHI, BamHI	AT3-CT-B-F, AT3-B-R
pcDNA3-His	Ataxin-3 Q23	AT3-WT 1-361	BamHI, AgeI	AT3-B-F, AT3-A-R
		AT3-NT 1-191	BamHI, AgeI	AT3-B-F, AT3-NT-A-R
		AT3-CT 191-361	BamHI, AgeI	AT3-CT-B-F, AT3-A-R
pcDNA3-His	Ataxin-3 Q70	AT3 Q70-WT 1-431	BamHI, AgeI	AT3-B-F, AT3-A-R
		AT3 257Q70 257-431	BamHI, BamHI	257Q70-F, AT3-Myc-R

3.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem H₂O als 100 µM Stammlösungen angesetzt und bei -20 °C gelagert.

3.9.1 Oligonukleotide für die Klonierungen

Die Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Klonierungen verwendet wurden, sind in Tabelle 3.7 angegeben. Die Restriktionsschnittstellen sind jeweils fett dargestellt.

Tabelle 3.7 Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung

Bezeichnung	Oligonukleotiden-Sequenz (5'-3')	Schnittstelle
AT3-B-F	GT GGATCC AGTCGACGATGGAG	BamHI
AT3-B-R	CAG GGATCC AAAGTGGACCCTATGCTG	BamHI
AT3-NT-B-R	GAG GGATCC AATAAGTTTTGGTCGATGC	BamHI
AT3-CT-B-F	CAG GGATCC AGTGGTTAACTTGAATTCTC	BamHI
AT3-NT-A-R	ACCGGT AATAAGTTTTGGTCGATGC	AgeI
AT3-A-R	ACCGGT TTTCAAATCATTCTGACAG	AgeI
257Q70-F	GGATCC ATGCAAGGTAGTTCCAGAAACATATCTCAAG	BamHI
AT3-Myc-R	GGATCC CAAGTCTTCTTCAGAAATGAGCTTTGTTCACAACCGGTTTTCAAATCATTCTGACAGTT	BamHI

3.9.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Klonierte und mutagenisierte Konstrukte wurden mit den Oligonukleotiden aus Tabelle 3.8 sequenziert, um die Richtigkeit der Sequenz zu überprüfen.

Tabelle 3.8 Verwendete Oligonukleotide für die Sequenzierung

Bezeichnung	Oligonukleotiden-Sequenz (5'-3')
polyQ-R	GTGAACTCTGTCCTGATAGGTCCCCCTG
polyQ-F	GAGCTTCGGAAGAGACGAGAAGC
AT3-VHS-R	GTGGATCCTCTGATACTCTGGACTGTTGAAC
AT3-GAT-F	CGGGATCCCAGAGTATCAGAGGCTCAGG

3.9.3 Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Die Oligonukleotide, die für die zielgerichtete Mutagenese verwendet wurden, sind in Tabelle 3.9 angegeben. Die Basensubstitutionen sind fett dargestellt, die Oligonukleotid-Paare sind zueinander komplementär.

Tabelle 3.9 Verwendete Oligonukleotide für die zielgerichtete Mutagenese

Bezeichnung	Oligonukleotiden-Sequenz (5'-3')
AT3-T207A-F AT3-T207A-R	AGCAAAGAGTCCATAAA GCAG ACCTGGAACGAGTG CACTCGTTCCAGGTCT TGCT TTATGGACTCTTTGCT
AT3-S236A-F AT3-S236A-R	GAGGGCTCTGGCACTA GC CGCCAAGAAATTGACATG CATGTCAATTTCTTGGCG CGCT AGTGCCAGAGCCCTC
AT3-S256A-F AT3-S256A-R	GGGCTATTCAGCTA GCT ATGCAAGGGCTGCC GGCAGCCCTTGCAT AGCT AGCTGAATAGCCC
AT3-S260A, S261A-F AT3-S260A, S261A-R	GCTATTCAGCTAAGTATGCAAGGT GCTGCC CAGAAACAT ATGTTTCT GGCAGC ACCTTGCACTTAGCTGAATAGC
AT3-S265A-F AT3-S265A-R	AAGGTAGTTCCAGAAACATAGCCCAAGATATGACACAGACATC GATGTCTGTGCATATCTTGGGCTATGTTTCTGGAACCTACCTT
AT3-S272A-F AT3-S272A-R	TCAAGATATGACACAGACAGCAGGTACAAATCTTACTTCAG CTGAAGTAAGATTTGTACCTGCTGTCTGTGCATATCTTGA
AT3-T277A-F AT3-T277A-R	CATCAGGTACAAATCTT GCT TCAGAAGAGCTTCGG CCGAAGCTCTTCTGA AGC AAGATTTGTACCTGATG
AT3-S278A-F AT3-S278A-R	ACACAGACATCAGGTACAAATCTTACT GC AGAAGAGCTTC GAAGCTCTTCT GC AGTAAGATTTGTACCTGATGTCTGTGT
AT3-S314A-F AT3-S314A-R	GCAGGGGGACCTA GC AGGACAGGCTGCACATC GATGTGCAGCCTGTCT TGCT AGGTCCCCTGC
AT3-S317A, S318A-F AT3-S317A, S318A-R	AGGGGGACCTAGCAGGACAG GGCTGC CATCCATGTGAAAG CTTTCACATGGATGT GCAGC CTGTCTGCTAGGTCCCCT
AT3-S325A, S328A-F AT3-S325A, S328A-R	GAAAGGCCAGCCACC GCTGC AGGAGCACTTGGGTGTG CACACCCAAGTGCTCT GCAGC GGTGGCTGGCCTTTC
AT3-S333A-F AT3-S333A-R	GCTGCAGTGACCAT GGCT TTAGAAACTGTCAG CTGACAGTTTCTAA AGC CATGGTCACTGCAGC
AT3-S340A-F AT3-S340A-R	GATCTAGGTGATGCTAT GGCC GAAGAAGACATGCTTCAG CTGAAGCATGTCTTCTT CGG CCATAGCATCACCTAGATC
AT3-S352A-F AT3-S352A-R	GCAGCTGTGACCAT GGCT TTAGAAACTGTCAG CTGACAGTTTCTAA AGC CATGGTCACAGCTGC
AT3-S236D-F AT3-S236D-R	GAGGGCTCTGGCACTA GACC GCCAAGAAATTGACATG CATGTCAATTTCTTGGCG ACT AGTGCCAGAGCCCTC
AT3-S256D-F AT3-S256D-R	GGGCTATTCAGCTA GAC ATGCAAGGGCTGCC GGCAGCCCTTGCAT ATCT AGCTGAATAGCCC
AT3-S260D, S261D-F AT3-S260D, S261D-R	GCTATTCAGCTAAGTATGCAAGGT GACGAC CAGAAACAT ATGTTTCT GTCGTC ACCTTGCACTTAGCTGAATAGC
AT3-S340D-F AT3-S340D-R	GATCTAGGTGATGCTAT GAC GAAGAAGACATGCTTCAG CTGAAGCATGTCTTCTT GTC CCATAGCATCACCTAGATC
AT3-S352D-F AT3-S352D-R	GCAGCTGTGACCAT GAT TTAGAAACTGTCAG CTGACAGTTTCTAA ATC CATGGTCACAGCTGC

3.10 Längenstandards

DNA-Marker (Genecraft):

1 kb DNA-Ladder: 250, 500, 750, 1000, 2000, 2500, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 10.000

100bp DNA-Ladder: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000

Protein-Marker (Biorad):

Kaleidoscope: 214, 132, 85, 40, 32, 17, 7 (kDa)

Page ruler stain: 170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 (kDa)

3.11 Enzyme und Kits

Tabelle 3.10 Verwendete Enzyme und Kits

Enzym / Kit	Bezugsquelle
Casein-Kinase II (CK2)	NEB
Protein Kinase A (PKA)	NEB
Taq Polymerase	Genecraft
T4 DNA Ligase	NEB
Shrimp Alkalische Phosphatase	NEB
Plasmid-DNA-Maxipräparations-Kit	Qiagen
Plasmid-DNA-Minipräparations Kit	Promega
Gel-Extraktions-Kit	Promega
DNA-Aufreinigungs-Kit	Promega
Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Enhanced Chemolumineszenz (ECL)-Kit	Amersham Bioscience
Fugene 6 Transfektionsreagenz	Roche
Proteasen Inhibitor Cocktail (Tabletten)	Roche

DNA-Restriktionsenzyme wurden entweder von MBI Fermentas oder NEB (New England Biolabs) bezogen.

3.12 Molekularbiologische Methoden

3.12.1 Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien

Über Nacht (ÜN)-Kulturen von Bakterien wurden bei 37 °C und ausreichender Belüftung in LB-Medium geschüttelt. Zur Selektion wurden dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) zugesetzt. Zur Anlage von Glycerinkulturen wurden 750 µl einer Bakterien-ÜN-Kultur mit 250 µl Glycerin in ein Cryoröhrchen überführt, gemischt und bei -80 °C gelagert.

3.12.2 Präparation von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Gewinnung kleinerer Plasmid-DNA-Mengen wurden DNA-Mini-Präparationen nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Stephen et al., 1990) durchgeführt. Hierfür wurden von einer 7 ml Übernachtskultur 6,5 ml entnommen und bei 13.000 Upm 10 Min lang zentrifugiert. Die restliche Bakterienkultur wurde für das Ansetzen einer Maxi-Präparation aufbewahrt. Das bei der Zentrifugation entstandene Zellpellet wurde in 200 µl Mini-Puffer I (50 mM D-Glucose, 25 mM Tris pH 8,0 und 10 mM EDTA (pH 8,0) resuspendiert. Danach wurden 400 µl Mini-Puffer II (0,2 M NaOH und 1 % SDS) hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und 5 Min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Mini-Puffer III (3 M Kaliumacetat pH 5,1) wurde wieder vorsichtig gemischt und anschliessend bei 13.000 Upm 5 Min lang zentrifugiert; dabei wurde die Plasmid-DNA von den Zellbestandteilen und Proteinen getrennt. Der Überstand mit der Plasmid-DNA wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und durch Zugabe von 2 ml absoluten Ethanol und anschliessender Zentrifugation für 5 Min bei 13.000 Upm gefällt. Die Plasmid-DNA wurde in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet und in 50 µl destillierten H₂O resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde 100 ml einer Übernachtskultur bei 4000 Upm für 10 Min abzentrifugiert. Die Lyse des Bakterien-Pellets und die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe eines Endotoxin-freien Isolierungs-Kits (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers. Das präzipitierte DNA-Pellet wurde in 300 µl TE Puffer resuspendiert, die DNA-Konzentration im UV-Spektrometer bei 260 nm bestimmt und bei -20 °C gelagert.

3.12.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die ATXN3-Fragmente (s. Tab. 3.6) wurden durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) hergestellt. Mit Hilfe der PCR läßt sich ein definierter Bereich einer doppelsträngigen DNA als Template vervielfältigen (Mullis et al., 1986). Hierzu wurden 50 ng einer ATXN3-Wildtyp-Plasmid-DNA mit 100 µM dNTPs (Genecraft), je 50 pmol 5' bzw. 3'Oligonukleotiden (s. Tab. 3.7) und 1 U Taq Polymerase in den jeweiligen Magnesium-haltigen Reaktionspuffern gemischt. Nach 5-minütiger Denaturierung bei 94 °C wurden 30 Zyklen zur Amplifikation (94 °C 30 Sek, 55 °C 30 Sek, 72 °C 30 Sek) und eine anschließende Extension für 7 Min bei 72 °C durchgeführt. Die Spezifität des PCR-Produktes wurde auf einem 1 - 2 %igen Agarosegel (s 3.12.5) überprüft. Anschliessend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt und der DNA-Gehalt im UV-Spektrometer bei 260 nm bestimmt.

Folgender PCR Ansatz wurde verwendet:

50 ng DNA-Matrize
 50 pmol Oligonukleotide (sense)
 50 pmol Oligonukleotide (anti-sense)
 100 µM dNTPs
 10x Taq-Polymerase-Puffer
 1 U Taq-Polymerase
 ad 50 µl dH₂O

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

94 °C	5'	} 30x
94 °C	30 Sek	
55 °C	30 Sek	
72 °C	30 Sek	
72 °C	7'	
4 °C	∞	

3.12.4 Restriktionsspaltung von DNA

Für die Restriktionsspaltung von DNA wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen mit den jeweils mitgelieferten Reaktionspuffern der Herstellerfirmen MBI Fermentas oder NEB eingesetzt.

Für analytische Ansätze wurden 1 - 2 µg Plasmid-DNA in dem entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer mit 5 U Restriktionsenzym für 3 - 4 Std bei 37 °C inkubiert. Die Überprüfung der DNA-Restriktion erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (s. 3.12.5).

Für präparative Ansätze im Rahmen der Klonierung wurden 3 - 5 µg Plasmid-DNA oder 1 - 3 µg des entsprechenden PCR-Produktes in dem vom Hersteller empfohlenen

Reaktionspuffer mit 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme für 4 - 12 Std bei 37 °C inkubiert und über ein 1 - 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit einem Gelextraktions-Kit isoliert (s. 3.12.6).

3.12.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Analyse der Restriktionsspaltung wurde die jeweiligen DNA-Proben mit 1/10 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und in einem 1 – 2 % TAE-Ethidiumbromid (1 µg/ml)-Agarosegel (s. 3.2) bei 100 - 120 V aufgetrennt. Die DNA wurde auf einem UV-Illuminator bei 254 nm sichtbar gemacht. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgte durch Vergleich zu einem DNA-Längenstandard wie dem λ-DNA HindIII-Marker.

3.12.6 Gelelution von DNA-Fragmenten

Nach Elektrophorese und Ethidiumbromidfärbung wurde das gewünschte DNA-Fragment unter langwelligem UV-Licht (300 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten und mit einem Gelextraktions-Kit der Firma Promega nach Herstellerangaben isoliert.

3.12.7 Dephosphorylierung von DNA

Vor einer Ligation (s. 3.12.8) wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektoren (s. 3.12.4) mit Shrimp Alkalischer Phosphatase (SAP; 1 U/µl) entfernt, um die Selbstligation des Vektors zu verhindern. Dazu wurden 3 - 5 µg linearisierte Plasmid-DNA mit 5 U SAP und Reaktionspuffer des Herstellers für 1 Std bei 37 °C inkubiert und zuletzt nochmal bei 67 °C für 15 Min inkubiert um die Phosphatase zu inaktivieren. Die linearisierte, dephosphorylierte Plasmid-DNA wurde anschliessend über ein Agarosegel aufgereinigt und isoliert (s. 3.12.5).

3.12.8 DNA-Ligation

Durch Ligation wurden PCR-amplifizierte und über Restriktionsenzyme gespaltene DNA-Fragmente in die entsprechenden linearisierten und dephosphorylierten Vektoren kloniert. Hierzu wurden 50 - 100 ng Vektor und eine entsprechende Menge DNA-Fragment (Insert) im Verhältnis 1:2, 1:3 und 1:4 mit 1 U T4-DNA-Ligase und 10x Ligationspuffer angesetzt und ÜN bei 16 °C inkubiert. 1/3 des Ligationsansatzes wurden zur Transformation in kompetente *E.coli* verwendet (s. 3.12.9).

3.12.9 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Die Vervielfältigung von Plasmid-DNA erfolgte über Transformation in kompetente Bakterienzellen. Zur Transformation von Bakterien wurden 10 ng Plasmid-DNA bzw. 1/3 eines Ligationsansatzes (s. 3.12.8) mit 50 µl kompetenten Bakterien (DH5α oder Top10) gemischt und für 30 Min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 42 Sek Bakterien für 2 Min auf Eis inkubiert, danach in 500 µl LB-Glucose-Medium (Glucose-Konz.: 20 mM/l) aufgenommen und für 1 Std bei 37°C inkubiert. Zur Selektion rekombinanter Bakterien-Klone wurde der Transformationsansatz auf einer LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und die Platte ÜN bei 37 °C inkubiert.

3.12.10 Identifizierung rekombinanter Klone

Für die Identifizierung rekombinanter Bakterienklone wurden jeweils mehrere Bakterienkolonien von der LB-Ampicillin-Platte gepickt (s. 3.12.9) und für eine Plasmid-DNA-Mini-Präparation in 7 ml LB-Medium angeimpft (s. 3.12.2). Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsenzymen gespalten, die für die Klonierung verwendet wurden, und anschliessend im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (s. 3.12.5), um erfolgreich ligierte Vektoren mit Insert-DNA zu identifizieren. Für positiv identifizierte rekombinante Klone wurde der restliche Kulturansatz von der DNA-Mini-Präparation für den Ansatz von Maxi-DNA-Präparation verwendet (s. 3.12.2).

3.12.11 DNA-Sequenzierung

Alle hergestellten DNA-Konstrukte wurden mit einem ABI Prism Sequenzierer 310 (Fa. Applied Biosystems) und dem Taq FS BigDye-Terminator-Kit (Fa. Perkin Elmer Applied Biosystems) sequenziert. Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden etwa 350 ng DNA mit jeweils 2 pmol der jeweiligen Oligonukleotide (s. Tab 3.8) und 1 µl BigDye-Terminator in einem 10 µl Volumen angesetzt und durch 25 Zyklen bei 60 °C für 4 Min und 94 °C für 1 Min in einem PCR-Gerät amplifiziert. Die amplifizierten Produkte wurden anschliessend durch Zugabe von Ammoniumacetat (0,3 M) und 2,5 Volumenteile Ethanol bei 15.000 Upm für 20 Min präzipitiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol wurden die DNA-Pellets in 4 µl H₂O und 16 µl Formamid für die automatische Sequenzierung aufgenommen.

3.12.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren können anhand der Absorption von UV-Licht bestimmt werden. Nukleinsäurebasen besitzen ein UV-Absorptionsmaximum bei 260 nm. Eine optische Dichte (OD) bei der Wellenlänge $\lambda = 260$ nm und einer Küvettendicke von 1 cm entspricht einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml bei doppelsträngiger DNA und 40 µg/ml bei einzelsträngiger RNA. Proteine besitzen ihr Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Das Verhältnis von OD_{260/280} ist ein Maß für die Verunreinigung der DNA durch Proteine. Reine DNA-Lösungen besitzen einen Quotienten zwischen 1.60 und 1.95.

Die zu messende DNA wurde 1:100 in destillierten H₂O verdünnt. Die Extinktion wurde anschliessend in einer Quarzküvette bei 260 nm und 280 nm gegen destilliertes H₂O vermessen.

3.12.13 Zielgerichtete Doppelstrang-Mutagenese

Um Mutationen gezielt in die ATXN3-kodierenden Vektoren einzufügen, wurde der QuickChange Site-directed Mutagenese-Kit (Fa. Stratagene) verwendet. Das Plasmid, welches die zu mutagenisierende DNA enthält, wurde dafür mit zwei zueinander komplementären Oligonukleotiden, die die gewünschte einzuführende Mutation enthalten, vollständig durch PCR amplifiziert (siehe Tab. 3.9). Da das für die PCR

eingesetzte Ausgangsplasmid im Gegensatz zum amplifizierten PCR-Plasmid methyliert vorliegt, kann durch einen anschliessenden Verdau mit dem Enzym Dpn I, das methylierte Ausgangsplasmid abgebaut werden und die mutagenisierte DNA angereichert werden. Das nicht methylierte, durch PCR neu hergestellte Plasmid wird dann durch Transformation kompetenter Bakterien vervielfältigt (s. 3.12.9) Die Mutagenese-Reaktionen wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.13 Proteinbiochemische Methoden

3.13.1 Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen (Zelllysate)

Zur Herstellung eines Gesamt-Zelllysats wurden eukaryontische Zellen bis zu einer Dichte von 80 - 90 % Konfluenz kultiviert, das Medium abgesaugt und die Zellen in 250 µl Lysepuffer+ Proteasen Inhibitor Cocktail von der Firma Roche (1 Tablette auf 10 ml Lysepuffer) von den Kulturschalen abgeschabt und auf Eis für 10 Min inkubiert. Anschliessend wurde der Ansatz bei 13.000 Upm, 4 °C für 12 Min zentrifugiert. Der Überstand mit dem löslichen Protein wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und ein Aliquot für die Bestimmung des Proteingehalts (s. 3.13.6) entnommen. Die Lysate wurden entweder sofort eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

3.13.2 Nukleäre Proteinextraktion aus eukaryontischen Zellen

Um die zytoplasmatische und nukleäre Fraktion voneinander zu trennen, wurden konfluent wachsende Zellen dreimal mit hypotonem Puffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 10 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT, 0,1 % NP-40) gewaschen und in 500 µl hypotonem Puffer A abgeschabt und 10 Min auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde anschliessend bei 2,000 xg, 4 °C für 5 Min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 120 µl hypotonem Puffer A + 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und erneut für 10 Min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2,000 xg, 4 °C für 5 Min wurde der Überstand als zytoplasmatische Fraktion isoliert. Das Pellet wurde in 80 µl hypotonem Puffer B (20 mM HEPES, 420 mM NaCl, 25 % Glycerol, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA) resuspendiert und für 30 Min auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 16,000 xg, 4 °C für 20 Min diente der erhaltene Überstand als

nukleäre Fraktion. Nach Bestimmung des Proteingehalts (s. 3.13.6) wurden die Protein-Fractionen bei -80 °C aufbewahrt.

Allen verwendeten Puffern wurde ein Proteasen-Inhibitor-Cocktail von der Firma Roche zugefügt (1 Tablette auf 10 ml Puffer).

3.13.3 Präzipitationen und Aufreinigung von His-Proteinen

Für die Präzipitation und Aufreinigung von Histidin-markierten Fusionsproteinen aus transient transfizierten eukaryontischen Zellen (s. 3.14.5 u 3.13.1) wurden 200 µg Zellysat mit 8 µl Ni-NTA-Agarose (3x gewaschen mit Lysispuffer) versetzt (Gesamt Volumen von 300 µl ad Lysispuffer - 0,6 M NaCl) und für 30 - 60 Min bei 4°C im Überkopfschüttler gemischt. Die Ni-NTA-Agarose wurde durch Zentrifugation (1300 Upm, 4 °C, 2 min) sedimentiert und 4 x mal mit Waschpuffer (Lysispuffer - 0,6 M NaCl, 10 mM Imidazol) je 5 Min gewaschen. His-Fusionsproteine wurden entweder von der Ni-NTA-Agarose durch 50 µl 100 mM Imidazol eluiert oder direkt in Laemmli-Laufpuffer bei 100 °C aufgekocht. Proteine wurden mittels SDS-PAGE (s. 3.13.7) und Western Blot (s. 3.13.9) analysiert.

3.13.4 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Die Expression von GST (Glutathion S-Transferase)-Fusionsproteinen (pGEX-5X-1 Konstrukte) erfolgte in *E. coli* DH5α. Zur Proteinexpression wurde LB-Medium 1:10 mit einer ÜN-Kultur angeimpft und im 37°C-Schüttler inkubiert. Bei einer OD₆₀₀ von 0.2 - 0.3 wurde die Kultur mit 0.15 mM IPTG (Isopropyl-thio-β-D-galactopyranosid) induziert und für weitere 3 Std bei 37 °C geschüttelt, um die Expression des Fusionsproteins zu ermöglichen. Danach wurde die Bakterienkultur 15 Min mit 5.000 Upm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom Bakterienpellet abgegossen, welches dann auf Eis in 10 ml Triton-X 100/PBS (1% Triton-X 100) Puffer resuspendiert wurde. Die Bakterien wurden dann durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen und das Zellysat 15 Min mit 10.000 Upm bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand mit den GST-Fusionsprotein wurde wie unter 3.13.5 beschrieben aufgereinigt.

3.13.5 Aufreinigung von GST-Fusionsprotein

Die Aufreinigung des GST-Fusionsproteins erfolgt über die Bindung an Glutathion-Sepharose 4B (Roche) und anschliessendem Waschen der Sepharose mit gebundenem Fusionsprotein. Hierzu wurde die Sepharose dreimal mit eiskaltem 1% Triton-X 100/PBS Puffer gewaschen, um den Ethanol-haltigen Lagerungspuffer zu entfernen. Zu 10 ml Bakterienlysat, welches das Fusionsprotein enthält, wurden 100 - 150 μ l der gewaschenen Sepharose dazu pipettiert und für 30 Min bei 4°C im Überkopfschüttler gemischt. Danach wurde die Sepharose mit den gebundenen Fusionsprotein abzentrifugiert (5 Min, 2.800 Upm bei 4°C) und mindestens dreimal mit 1% Triton-X 100/PBS gewaschen, um die Reste des Bakterienlysats zu entfernen. Die gebundenen GST-Fusionsproteine wurden mit 500 μ l 10 mM reduzierten Glutathion, 50 mM Tris/HCl (pH 8,0) von der Sepharose eluiert. Die Reinheit des Fusionsproteins wurde mittels SDS-PAGE und anschliessender Coomassie-Färbung überprüft (s. 3.13.7 u 3.13.8) Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration photometrisch gemessen (s. 3.13.6).

3.13.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des Bio-Rad Protein-Assays bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen Wasser/Bradford-Reagenz als Leerwert. Anhand einer BSA-Konzentrationsreihe (1 bis 12 μ g/ μ l) wurden die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben bestimmt.

3.13.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE; Laemmli, 1970) dient der linearen Auftrennung von verschiedenen Proteinen nach ihren Molekulargewichten. Hierfür wird ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen eingesetzt, einem Trenngel (unten) und einem Sammelgel (oben), die sich beide im Hinblick auf den pH, die Ionenstärke und die Porengröße unterscheiden. Die Proben werden im Sammelgel zunächst konzentriert, bevor sie im Trenngel aufgetrennt werden. Für ein 10 %iges Trenngel wurden 7.5 ml SDS-Trenngelpuffer, 10 ml Wasser und 10 ml Acrylamid gemischt. Durch Zugabe von 300 μ l APS und 30 μ l TEMED wurde die Polymerisation gestartet und die Trenngel-Lösung anschliessend sofort in die Gelapparatur gegossen

und mit etwas Isopropanol überschichtet. Vor dem Überschichten des Trenngels mit der Sammelgel-Lösung wurde das Isopropanol entfernt. Für das 5%ige Sammelgel wurde 3.75 ml SDS-Sammelgelpuffer, 8.75 ml Wasser und 2.5 ml Acrylamid (Fa. Biorad) gemischt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 150 µl APS und 15 µl TEMED gestartet. Die Probenaschen im Sammelgel wurden durch das Einsetzen eines Probenladungs-Kammes gebildet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen in Laemmli-Ladungspuffer für 10 Min bei 100 °C aufgeköcht. Die Elektrophorese erfolgte in Western Blot-Laufpuffer bei konstanten 120 V für 90 min. Die Proteine wurden wie unter 3.13.10, 3.13.11, 3.13.12 beschrieben sichtbar gemacht.

3.13.8 Coomassie Blau-Färbung

Für den Nachweis von Proteinen im SDS-Gel wurde eine Coomassie (0.1 % (w/v) Brillant blue R250 Färbelösung (Fa. Pierce) eingesetzt. Das Gel wurde für 1 Std in der Coomassie-Lösung geschwenkt und anschliessend mit destilliertem H₂O bis zur gewünschten Färbung der Proteinbanden entfärbt.

3.13.9 Western Blot

Beim Western Blot werden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine durch Elektrotransfer auf eine Nitrozellulose- oder PVDF (Polyvinyliden Difluorid)-Membran übertragen. Als Blotkammer wurde eine Transferkammer von Biorad verwendet und der Transfer wurde in Transferpuffer bei 400 mA für 1 Std unter Wasserkühlung durchgeführt. Beide Membrantypen wurden vor dem Zusammenbau der Apparatur in WB-Transferpuffer äquilibriert, wobei die PVDF Membran zuvor mit Methanol inkubiert wird.

3.13.10 Ponceau-Rot-Färbung von Western Blot

Der Transfer der Proteine von einem SDS-Gel auf die Membran wird durch eine reversible Ponceau-Rot-Färbung überprüft. Dazu wird die Membran für 1 Min in Ponceau S Färbelösung inkubiert. Danach wird die Nitrozellulosemembran mehrmals mit destilliertem H₂O gewaschen, um Proteinbanden (>50 ng) sichtbar zu machen. Durch kurzes Waschen der Membran in PBS-T-Puffer (PBS/0,05 % Tween) läßt sich

die Proteinfärbung vollständig entfernen. Diese Membranen können anschliessend für Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern oder für den Nachweis radioaktiv-markierter Proteine durch Autoradiografie verwendet werden.

3.13.11 Immunchemische Detektion von Western Blot

Transferierte Proteine auf einer Trägermembran können durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Hierzu wurde die Membran zuerst für 50 Min bei RT in einer Blockierungs-Lösung (5% BSA in PBS-T-Puffer) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Antikörper zu unterdrücken. Die so behandelte Membran wurde für 1 Std bei RT oder ÜN mit einer Primärantikörperlösung (s. Tab. 3.3, Verdünnung nach Herstellerangaben in Blockierungs-Lösung) versetzt. Die Membran wurde anschliessend 3x für 5 Min mit PBS-T-Puffer gewaschen und weiter für 50 Min bei RT mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (s. Tab. 3.4, Verdünnung 1:2000, oder nach Herstellerangaben in 1,2 % BSA, PBS-T-Puffer) inkubiert, der spezifisch an den primären Antikörper bindet. Die Membran wurde erneut 3x für 5 Min gewaschen. Die Detektion immobilisierter Antigene auf der Membran erfolgte dann durch die Zugabe von Chemolumineszenz-Substraten (ECL Kit; Fa. Amersham Bioscience), die von der Peroxidase des sekundären Antikörpers unter Lichtemission umgesetzt werden. Die freigesetzte Chemolumineszenz wurde mit Kodak X-OMAT Filmen nachgewiesen. Die Quantifizierung immundetektierter Proteinbanden erfolgte nach Scannen der belichteten Filme mit dem Programm ImageJ.

3.13.12 Autoradiogramm von Western Blot

Zur Detektion von ^{32}P -markierten Proteinen wurden die Proben in SDS-Gelen aufgetrennt und durch Western Blot auf eine Membran übertragen. Radioaktive Proteinbanden wurden anschliessend nach Exposition mit Kodak X-OMAT AR-Röntgenfilmen in Kodak X-Omatic-Filmkassetten nachgewiesen. Nach 6 - 48 stündiger Exposition bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurden die Filme entwickelt.

3.13.13 *In vitro* Phosphorylierung mit CK2 / PKA

Die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden mit aufgereinigten GST-Fusionsproteinen sowie den entsprechenden Kinasepuffern (CK2 - 20 mM Tris, 50 mM KCl, 10 mM MgCl₂, pH 7.2; PKA - 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂, pH 7.2) und Kinasen durchgeführt. Folgender Ansatz wurde bei 27 °C für 30 Min inkubiert.

5 µg GST-Fusionsprotein
2 U Kinase
20 µl Puffer
3 µl 100 µM [γ -³²P]-ATP

Der Reaktionsansatz wurde mit 2x Laemmli-Laufpuffer aufgeköcht und über SDS-PAGE (s. 3.13.7) aufgetrennt und, wie in 3.13.12 beschrieben, nachgewiesen.

3.13.14 *In vivo* Phosphorylierung

HEK293-Zellen kultiviert in 3 cm Zellkulturschalen wurden mit den jeweiligen DNA-Konstrukten transient transfiziert (s. 3.14.5) und nach 24 Std einmal mit phosphatfreiem DMEM Medium + Glutamin (angesetzt mit 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum und einer Penizillin/ Streptomycin-Lösung) gewaschen und in phosphatfreiem Medium für 45 Min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde das Medium durch 3 ml neues phosphatfreies Medium ersetzt und 30 µCi ³²P-Orthophosphat dazugegeben und für weitere 3 Std bei 37 °C inkubiert. Am Ende der Inkubation wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen, die Proteinextraktion und Präzipitation mit Ni-NTA-Agarose durchgeführt (s. 3.13.1 u 3.13.3).

3.13.15 Phosphoaminosäurenanalyse

[³²P]-markierte Proteine können durch partielle Hydrolyse mit HCl in Phosphoaminosäure-Peptide gespalten werden, und durch Auftrennung auf Dünnschicht-Chromatographieplatten im elektrischen Feld nachgewiesen werden von (Boyle et al., 1991). Nach der Präzipitation und Auftrennung der radioaktiv markierten His-Fusionsproteine über die SDS-PAGE (s. 3.13.7) und Transfer auf eine Polyvinylidene Difluorid (PVDF) Membran, wurden die entsprechenden Bande ausgeschnitten und in 6 M HCL für 2 Std bei 110 °C inkubiert. Der Hydrolyse-Ansatz

wurde in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet und das Pellet in 2 µl Elektrophorese-Puffer (5,9 % (v/v) Essigsäure, 0,8 % (v/v) Formylsäure, 0,3 % (v/v) Pyridin, 0,3 mM EDTA) resuspendiert. Die Proben wurden mit Phosphoaminosäuren-Markern (Fa. Sigma-Aldrich) auf die Dünnschicht-Chromatographieplatten aufgetragen und bei konstanten 1400 V und 40 mA für 1 Std aufgetrennt. Die Phosphoaminosäuren wurden anschliessend durch Auflegen eines Filmes autoradiografisch identifiziert (s. 3.13.12).

3.13.16 Reporter-gen-Analysen

Für Reporter-gen-Analysen wurden 1.5×10^5 CSM14.1 Zellen pro Kavität einer 24-well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 200 ng der angegebenen Reporter-gen-Firefly-Luciferase-Konstrukte transfiziert (s. 3.14.5). Zusätzlich wurde bei jeder Transfektion 0,4 ng eines Ko-Reporter-gens, Renilla-Luciferase (pRL-CMV, Promega), kotransfiziert. Nach 48 Std wurde die Luciferase-Aktivität durch das Dual-Luciferase Reporter-gen-Analyse System der Fa. Promega nach den Angaben des Herstellers im Mikroplatten-Luminometer (Fa. Berthold) gemessen.

3.14 Zellbiologische Methoden

3.14.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Für die Versuche wurden HEK293 Zellen und MEF verwendet. Die Kultivierung dieser Zellen erfolgte im CO₂-Inkubator bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5 % igem CO₂/Luft-Gemisch. HEK293 und MEF Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen in 10 ml DMEM + Glutamin, 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, einer Penizillin/ Streptomycin Lösung kultiviert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt.

3.14.2 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Zum Anlegen von Kryokulturen wurden konfluent gewachsene Zellen einer 175 cm² Zellkulturflasche mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mittels Trypsin-EDTA Lösung abgelöst. Anschliessend wurden die Zellen bei 1300 Upm bei RT für 3 Min zentrifugiert, der Überstand entsorgt und das Zellsediment in 1 ml frischem

Einfriermedium (10 % fötales Kälberserum (PAA) versetzt und mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Roth) resuspendiert. Der Ansatz wurde in Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C gelagert. Zur Reaktivierung wurden die Zellen bei 37 °C angetaut, DMSO-Reste durch einmaliges Waschen mit Normalmedium entfernt und die Zellen in Normalmedium wieder ausgesät.

3.14.3 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage 1:10 bis 1:20 passagiert. Dazu wurden sie 1x mit PBS gewaschen und zum Ablösen 3 Min mit 600 µl Trypsin/EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Die Inaktivierung des Trypsins erfolgte durch Zugabe von 5 ml Normalmedium. Nach dem Überführen in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen wurden die Zellen bei 1300 Upm und 3 Min zentrifugiert, der Überstand entsorgt und die Zellen in neuem Medium resuspendiert.

3.14.4 Bestimmung der Zellzahl

Von der Zellsuspension wurden 50 µl mit 450 µl Medium verdünnt. Anschliessend wurden 25 µl dieser Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellzahl unter dem Mikroskop bestimmt.

3.14.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Transfektion von HEK293- und MEF-Zellen wurde mit dem Transfektions-Reagenz Fugene 6 (Fa. Roche) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen bis zu einer Konfluenz von etwa 50 % kultiviert und mit Transfektionsreagenz-DNA-Gemisch (Verhältnis 1:3; nach den Angaben des Herstellers) transfiziert. Nach 18 Std wurden die transfizierten Zellen lysiert (s. 3.13.1).

3.14.6 Immunzytochemie

Deckgläschen wurden mit Poly-L-Lysin-Lösung 5 % (Sigma-Aldrich) für 30 Min bei 37 °C im CO₂-Brutschrank beschichtet und anschliessend mit PBS gewaschen. Die Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen wurden in die entsprechenden Zellkulturschalen gelegt und bis zu einer Konfluenz von 30 % kultiviert.

Anschliessend wurden die Zellen transient transfiziert (s. 3.14.5) und für weitere 24 Std kultiviert bis eine Konfluenz von etwa 70 % erreicht wurde. Die Zellen wurden dann 1x mit PBS-Puffer gewaschen und 5 Min bei -20 °C mit einem Aceton/Isopropanol (1:1)-Gemisch fixiert.

Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungen folgte eine 30-minütige Inkubation mit Blockierungslösung (5 % BSA in PBS). Der Primärantikörper (s. 3.7.1) wurde in mit 2 % BSA-haltigem PBS-Puffer verdünnt (1:500) und für 45 Min bei RT zu den fixierten Zell-Präparaten gegeben. Danach wurden die Präparate 5x mit PBS-Puffer gewaschen und für 30 Min mit Sekundärantikörper, verdünnt (1:500) in PBS-Puffer (2 % BSA), (siehe 3.1.7) inkubiert. Für die Kernfärbung wurden die Präparate mit DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol verdünnt (1:1000) in PBS-Puffer (2 % BSA) für 30 Sekinkubiert. Anschliessend wurden die Deckgläser erneut mit PBS-Puffer und destillierten H₂O gewaschen und mit Mowiol-Lösung auf dem Objektträger fixiert. Durch den Einsatz FITC- und/oder Texas Red-markierter Zweitantikörper (s. 3.7.2) konnte die zelluläre Lokalisierung immunodetektierter Antigens im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Zeiss) analysiert und dokumentiert werden.

IV. Ergebnisse

4.1 Potenzielle Phosphorylierungsmotive der Casein-Kinase II in ATXN3

Analysen der Primärstruktur von ATXN3 haben ergeben, dass ATXN3 zwei konservierte putative Casein-Kinase II (CK2) Motive (TDLE, TSEE) enthält, die durch eine Phosphorylierung der Threoninreste in den Positionen 207 und 277 modifiziert werden könnten (Tait et al., 1998; Albrecht, et al., 2002). Zusätzlich zu diesen Motiven wurden durch *in silico* Analysen mit den Phosphorylierungsprädiktions-Programmen Netphosk1.0 und Disphos1.3 zwei weitere CK2-Motive mit jeweils einem Serin an den Positionen 236 und 340 identifiziert (s. Abb. 4.1). Das Erkennungsmotiv der CK2 besteht aus vier Aminosäuren, von denen die erste Aminosäure, an der die Phosphorylierung stattfindet, ein Serin oder Threonin ist, gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren und einer Glutamin- bzw. Asparaginsäure. Die *in silico* Analyse des Disphos1.3 berechnet zusätzlich die Wahrscheinlichkeit (auf einer Skala von 0 bis 1) mit der eine Phosphorylierung der jeweiligen CK2-Motive stattfinden könnte (s. Tab. 4.1). Als potenzielle Kandidaten kamen nach dieser Analyse nur die beiden Serinreste an den Positionen 236 und 340 in Betracht.

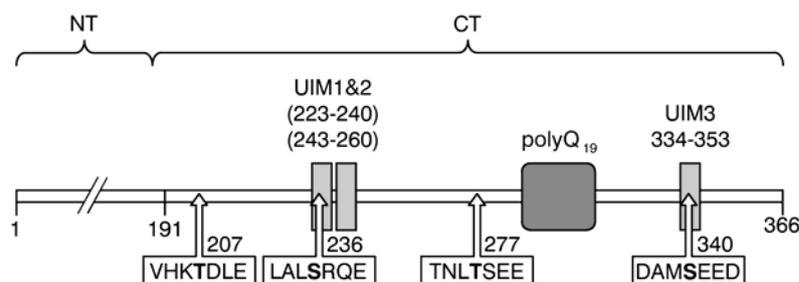


Abb 4.1 Schematische Darstellung von ATXN3 und potenzielle CK2-Motive. Zwei CK2-Motive, 236-239 und 340-352, befinden sich im ersten und dritten Ubiquitin-Interaktions-Motiv (UIM). Für die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden zusätzlich zum Volllängen-ATXN3, Konstrukte eingesetzt, die entweder die N- oder C-terminale Domäne von ATXN3 beinhalteten. Das Erkennungsmotiv der CK2 besteht aus vier Aminosäuren, von denen die erste Aminosäure, an der die Phosphorylierung stattfindet, ein Serin oder Threonin ist, gefolgt von zwei beliebigen Aminosäuren und einer Glutamin- bzw. Asparaginsäure.

Tabelle 4.1 *In silico* Analyse der vier CK2-Motive aus der Disphos 1.3 Datenbank. „AS“ bezieht sich auf die Aminosäure und der „Score“ ist die Wahrscheinlichkeit mit der eine Phosphorylierung an dieser Position stattfinden kann (angegeben mit ja oder nein). Maximaler Wahrscheinlichkeitswert ist 1.000.

Position	AS	Score	Sequenz	Ja/Nein
207	T	0.166	RVHKTDLER	Nein
236	S	0.915	ALALSRQEI	Ja
277	T	0.173	GTNLTSEEL	Nein
340	S	0.736	GDAMSEEDM	Ja

4.2 CK2 phosphoryliert den C-terminalen Bereich von ATXN3 *in vitro*

Für die *in vitro* Phosphorylierungsversuche wurden GST-Fusionsproteine von ATXN3-Q19 verwendet. Zusätzlich zum Volllängen-ATXN3-Q19-Protein (ATXN3-Q19-WT, Wildtyp), wurde der N-terminale (ATXN3-Q19-NT; 1-191) und der C-terminale Bereich (ATXN3-Q19-CT; 192-366), der die vier potenziellen CK2-Motive enthält, untersucht. Die entsprechenden GST-Fusionsproteine wurden in *E. coli* DH5 α exprimiert und über Glutathion-Sepharose aufgereinigt (s. 3.13.4 - 3.13.7).

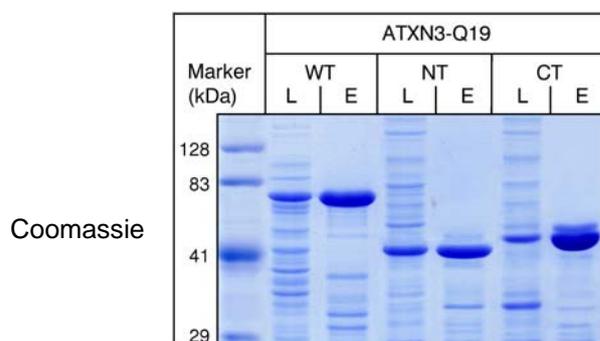


Abb. 4.2 Nachweis der gereinigten GST-ATXN3-Fusionsproteine im Coomassie-Gel, die für die *in vitro* CK2-Phosphorylierungsversuche verwendet wurden. Für den Nachweis der GST-Fusionsproteine ATXN3-Q19-WT (Volllängen-Protein, Wildtyp), ATXN3-Q19-NT und ATXN3-Q19-CT wurden jeweils 10 μ l der Bakterien-Zelllysate (L, nicht gereinigtes GST-ATXN3-Q19-Fusionsprotein) bzw. 10 μ l der gebundenen GST-ATXN3-Q19-Fusionsproteine (E) nach Aufreinigung über Glutathion-Sepharose in einem SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die molekularen Größen (kDa) der exprimierten Proteine entsprechen beim Volllängen ATXN3-Q19-WT etwa 78 kDa, bei ATXN3-Q19-NT und ATXN3-Q19-CT etwa 43 kDa und 45 kDa.

Der *in vitro* CK2-Phosphorylierungsversuch wurde mit CK2, ATP und [γ - 32 P]-ATP und den jeweils aufgereinigten GST-Fusionsproteinen unter Standardreaktionsbedingungen

durchgeführt (s. 3.13.13). Als Positivkontrolle der CK2-Phosphorylierung wurde Presenilin-2 (23 kDa) verwendet, das von der CK2 phosphoryliert wird (Walter et al., 1996). Das Autoradiogramm und der Western Blot der ^{32}P -markierten GST-ATXN3-Q19-Proteine zeigten, dass sowohl Volllängen ATXN3-Q19-WT als auch die C-terminale Domäne von ATXN3-Q19 phosphoryliert werden, während die N-terminale Domäne keine Phosphorylierung aufwies. Die Phosphorylierungssignale der GST-ATXN3-Q19-Fusionsproteine konnten eindeutig von den Signalen abgegrenzt werden, die durch die Autophosphorylierung der CK2 entstehen (s. Abb. 4.3A).

Zusätzlich zur *in vitro* Phosphorylierung von ATXN3-Q19 mit der CK2, wurde die Phosphorylierung von ATXN3-Q19 mit der Proteinkinase A (PKA) getestet. Als Positivkontrolle wurde Histon H3 (16 kDa) verwendet, das von der PKA phosphoryliert wird (Deborah, et al., 1999). ATXN3-Q19-WT wurde von der PKA nicht phosphoryliert, obwohl die *in silico* Analyse zwei potenzielle Phosphorylierungsstellen vorhersagte (s. Abb. 4.3B u. Abb. 4.8) und die Positivkontrolle Histon H3 phosphoryliert wurde.

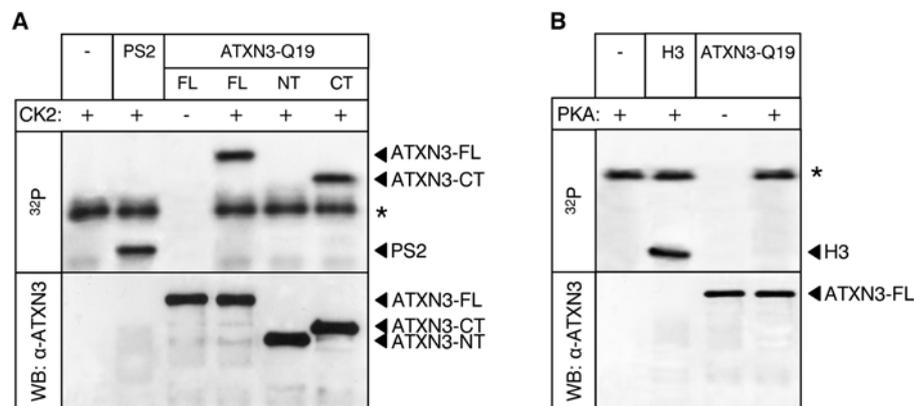


Abb. 4.3 *In vitro* Phosphorylierung von ATXN3 mit den Kinasen CK2 und PKA. Die GST-Fusionsproteine von ATXN3-Q19-WT, -NT, -CT und Kontroll-Ansätze wurden mit ATP, ^{32}P -ATP, und CK2 (A) bzw. PKA (B) inkubiert. Anschliessend wurden die radioaktiv markierten GST-ATXN3-Q19-Proteine über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot bzw. Autoradiogramm detektiert. Nur Volllängen ATXN3-Q19-WT und der C-terminale Bereich wurden von CK2 *in vitro* phosphoryliert. Als Negativkontrollen wurden Reaktionen angesetzt, die nur CK2 oder PKA enthielten, um die Autophosphorylierung der Kinasen zu identifizieren (s. Stern).

4.3 CK2 phosphoryliert ATXN3 *in vitro* an Serin 340

Um die CK2-Phosphorylierungsmotive von ATXN3-Q19-WT einzugrenzen, wurden die konservierten CK2-Motive durch gezielte Mutagenese verändert. Durch den Austausch der Aminosäuren Serin oder Threonin gegen die Aminosäure Alanin, wurde überprüft, ob an der entsprechenden Aminosäure-Position eine Phosphorylierung stattfinden kann (s. 3.13.13 u. 3.13.12). Hierzu wurde das GST-ATXN3-Q19-WT-Konstrukt durch Doppelstrang-Mutagenese mit komplementären Primern, die die einzuführende Mutation beinhalteten, amplifiziert (Tab. 4.2). Zusätzlich zu den einzelnen Alanin-Mutanten wurde eine kombinierte Mutante hergestellt, die alle vier Mutationen beinhaltet.

Tabelle 4.2 Aminosäure-Positionen und Bezeichnungen der mutagenisierten ATXN3-Konstrukte. Bezeichnungen der verwendeten GST-ATXN3-Q19-Konstrukte und der jeweiligen Aminosäure-Positionen, die in ATXN3-Q19 mutagenisiert wurden.

Mutagenisierte Positionen	Konstrukt
T207A	pGEX5X-1-ATXN3-Q19-T207A
S236A	pGEX5X-1-ATXN3-Q19-S236A
T277A	pGEX5X-1-ATXN3-Q19-T277A
S340A	pGEX5X-1-ATXN3-Q19-S340A
T207A, S236A, T277A, S340A	pGEX5X-1-ATXN3-Q19-Alle

Die *in vitro* Phosphorylierung der ATXN3-Q19-Alanin-Mutanten mit der CK2 zeigte eindeutig, dass nur die ATXN3-Q19-Alaninmutante S340A keine radioaktive Bande mehr im Autoradiogramm aufweist (s. Abb 4.4). Die anderen ATXN3-Alanin-Mutanten weisen radioaktive Banden im Autoradiogramm auf, deren Intensität der des ATXN3-Q19-WT entsprechen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ATXN3-Q19 *in vitro* spezifisch am Serinrest 340 von der CK2 phosphoryliert wird.

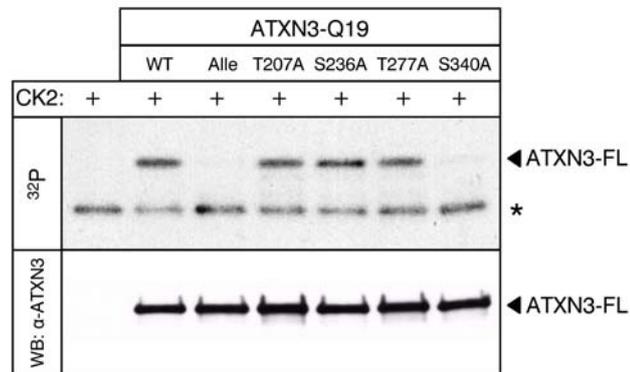


Abb. 4.4 *In vitro* Phosphorylierung von ATXN3 und der ATXN3-Alanin-Mutanten durch CK2. ATXN3-Q19-WT und die entsprechenden ATXN3-Alanin-Mutanten wurden mit ATP, ^{32}P -ATP, und CK2 inkubiert. Die radioaktiv markierten GST-Proteine wurden anschliessend über Glutathion-Sepharose aufgereinigt, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Autoradiogramm/Western Blot dargestellt. Von den ATXN3-Alanin-Mutanten wurde nur ATXN3-Q19-S340A, bzw. ATXN3-Q19-Alle (T207A, S236A, T277A, S340A) nicht mehr phosphoryliert. Als Kontrolle diente ein Reaktionsansatz, der nur mit der CK2 ohne rekombinantes Protein angesetzt wurde und die Autophosphorylierung der CK2 zeigt (Stern).

4.4 *In vivo* Phosphorylierung von ATXN3 in HEK293-Zellen

Die Ergebnisse der *in vitro* Versuche wurden im folgenden *in vivo* überprüft. Hierfür wurden die cDNAs der vorhandenen GST-ATXN3-Q19-Konstrukte in einen Vektor umkloniert, der die Expression der verschiedenen ATXN3-Q19-Isoformen mit einer C-terminalen 6-fachen Histidin-Markierung in eukaryontischen Zellen ermöglicht (s. 3.13.3). Die His-ATXN3-Fusionsproteine wurden in HEK293 Zellen (humane embryonale Nierenzellen) transient exprimiert, mit Ni-NTA-Agarose präzipitiert und im Coomassie-Gel überprüft (s. Abb. 4.5).

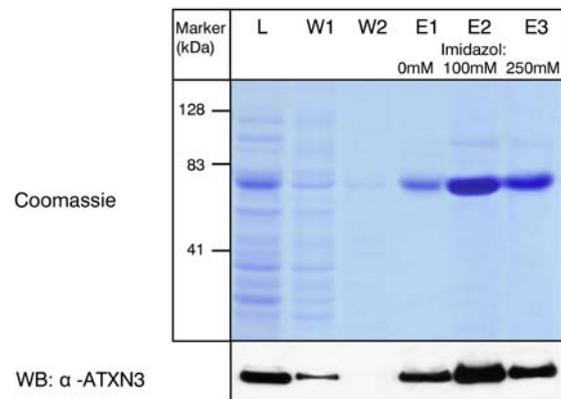


Abb. 4.5 Expression und Ni-NTA-Präzipitation von His-ATXN3-Fusionsprotein aus transfizierten HEK293-Zellen. Für den Nachweis des His-ATXN3-Q19-WT-Fusionsproteins wurden jeweils 35 μ l des Ausgangs-Zellysats (L), der beiden Waschschrte (W1, W2) und der Elutionsschritte (E1, E2, E3) im SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie Färbung (oberer Teil) sichtbar gemacht. Die Western Blot Analyse dieses Gels (unterer Teil) mit einem His-spezifischen Antikörper bestätigt, dass es sich bei dem aufgereinigtem His-Protein um ATXN3-Q19-WT handelt.

Die Phosphorylierung von Proteinen kann unterschiedlich schnell erfolgen und der Grad der Phosphorylierung hängt von der Präsenz und Aktivität zellulärer Phosphatasen ab (Ubersax et al., 2007; Patwardhan et al., 2007). Um die Inkorporation von ^{32}P in ATXN3-Q19-WT im Zeitverlauf zu ermitteln, wurde ATXN3-Q19-WT unterschiedlich lang und in An- oder Abwesenheit des Phosphatase-Inhibitors, Okadasäure (10 μ M), untersucht. In einem Zeitverlauf über 3 Std wurde die Inkorporation von ^{32}P in ATXN3-Q19-WT densitometrisch durch Quantifizierung der Banden im Autoradiogramm und Western Blot bestimmt (s. Abb. 4.6A, B) Mit Okadasäure kommt es zu einer Anreicherung von radioaktiv phosphoryliertem ATXN3-Q19-WT während ohne Okadasäure eine verzögerte Anreicherung phosphorylierten ATXN3-Q19-WT stattfindet. Das Autoradiogramm zeigt, dass nach einer Stunde Inkubationszeit ohne Okadasäure noch keine Phosphorylierung von ATXN3-Q19-WT nachgewiesen werden konnte, während mit Okadasäure bereits eine schwache Phosphorylierungsbande von ATXN3-Q19-WT zu erkennen ist (s. Abb. 4.6). Über die gesamte Inkubationszeit von 3 Std kommt es mit oder ohne Okadasäure zu einer Akkumulation von phosphoryliertem ATXN3-Q19-WT. Der Phosphatasen-Inhibitor Okadasäure ist somit nicht erforderlich, um die Stabilität der Phosphorylierung aufrechtzuerhalten. Alle im weiteren durchgeführten *in vivo*

Phosphorylierungsreaktionen wurden daher ohne Okadasäure und mit einer dreistündigen Inkubationszeit durchgeführt.

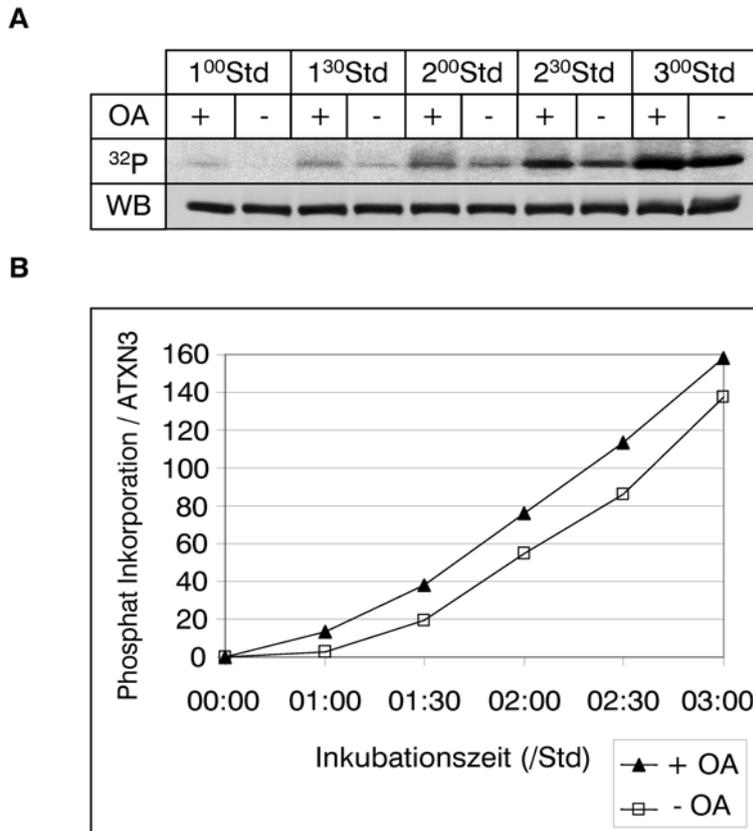


Abb. 4.6 *In vivo* Phosphorylierung von ATXN3 in HEK293 Zellen. (A) Autoradiogramm und Western Blot von transient mit ATXN3-Q19-WT transfizierten HEK293-Zellen. Die HEK293-Zellen wurden nach 48 Std für 1 Std in einem phosphatfreien Nährmedium inkubiert und anschliessend mit 0,5 mCi radioaktiven Orthophosphat unterschiedlich lang (0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30 und 3:00 Std) in An- oder Abwesenheit des Phosphatase-Inhibitors Okadasäure (OA; 10 μ M) markiert. Nach der Herstellung der entsprechenden Zelllysate wurde rekombinantes ATXN3-Q19-WT über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Autoradiografie bzw. Western Blot nachgewiesen. Eine Akkumulation phosphorylierten ATXN3-Q19-WT wird auch ohne OA erreicht (B) Quantifizierung des eingebauten ³²P in ATXN3-Q19-WT im Zeitverlauf der Inkubation. Die Bandenintensität im Autoradiogramm und Western Blot wurde densitometrisch vermessen und als Verhältnis eingebauten radioaktiven Phosphats zu immunreaktiven ATXN3-Q19-WT-Protein dargestellt.

4.5 *in vivo* Phosphorylierung des C-Terminus von ATXN3

Um den Bereich von ATXN3-Q19-WT einzugrenzen, der *in vivo* phosphoryliert wird, wurde die Phosphorylierung der N-terminalen mit der C-terminalen Region von ATXN3-Q19-WT in HEK293-Zellen verglichen. Übereinstimmend mit den *in vitro* Ergebnissen war die C-terminale Region von ATXN3-Q19-WT *in vivo* phosphoryliert, während der N-terminale Bereich von ATXN3-Q19-WT keine Phosphorylierung zeigte (s. Abb. 4.7A). Die *in vivo* Phosphorylierung der ATXN3-Q19-S340A-Mutante zeigte zwar eine deutliche Abnahme der Phosphorylierungsintensität im Vergleich zum ATXN3-Q19-WT, aber die Inkorporation von ^{32}P war nicht vollständig unterdrückt (s. Abb. 4.7B).

Zusätzlich wurde die Phosphorylierung von expandierten ATXN3 Wildtyp (ATXN3-Q70-WT) und der entsprechenden ATXN3-Q70-S340A-Mutante untersucht, um den Einfluss der verlängerten Polyglutaminregion auf die Phosphorylierung zu prüfen. Expandiertes ATXN3-Q70-WT und die ATXN3-Q70-S340A-Mutante zeigten vergleichbare Phosphorylierungsintensitäten wie normales ATXN3-Q19-WT und die ATXN3-Q19-S340A-Mutante (s. Abb. 4.7B).

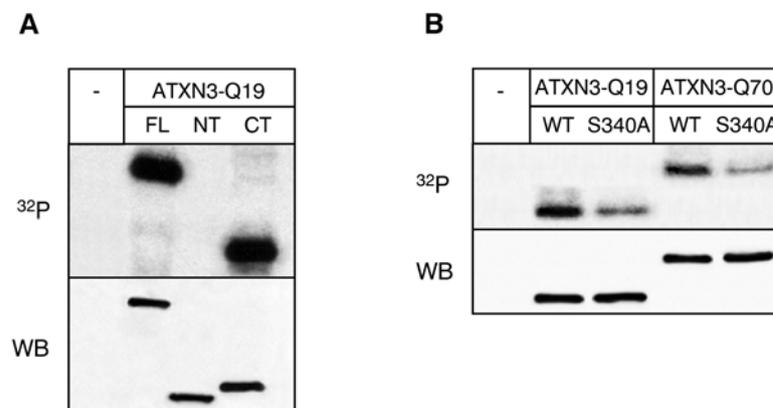


Abb. 4.7 *In vivo* Phosphorylierung von normalen und expandierten ATXN3 und der jeweiligen S340A-Mutanten in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit jeweils normalen und expandierten ATXN3-Q19-WT und den S340A-Mutanten für 48 Std transient transfiziert, für 1 Std in einer phosphatfreien Nährlösung inkubiert und anschliessend mit 0,5 mCi radioaktiven Orthophosphat 3 Std markiert. Das rekombinante His-ATXN3-Q19 der Zellysate wurde mit Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Autoradiografie bzw. Western Blot nachgewiesen. Volllängen ATXN3-Q19-WT sowie der C-terminale Bereich werden *in vivo* phosphoryliert. Die Mutagenese von S340A kann die Phosphorylierung von ATXN3-Q19 und -Q70 nicht vollständig unterdrücken.

4.6 Weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen von ATXN3

Da die Phosphorylierung der ATXN3-Q19-S340A-Mutanten nicht vollständig unterdrückt war, wurden weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen der C-terminalen Region von ATXN3 untersucht, die sich aus der *in silico*-Analyse mit den Programmen Netphosk1.0 und Disphos1.3 ergeben haben (s. Abb. 4.8). Es handelt sich dabei um 18 weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen (7 Threonine und 11 Serine), die von insgesamt sieben entsprechenden Kinasen erkannt werden könnten. Nach dieser Analyse werden ausschliesslich Serin- und Threonin-Reste im C-Terminus von ATXN3 phosphoryliert jedoch keine Tyrosin-Reste.

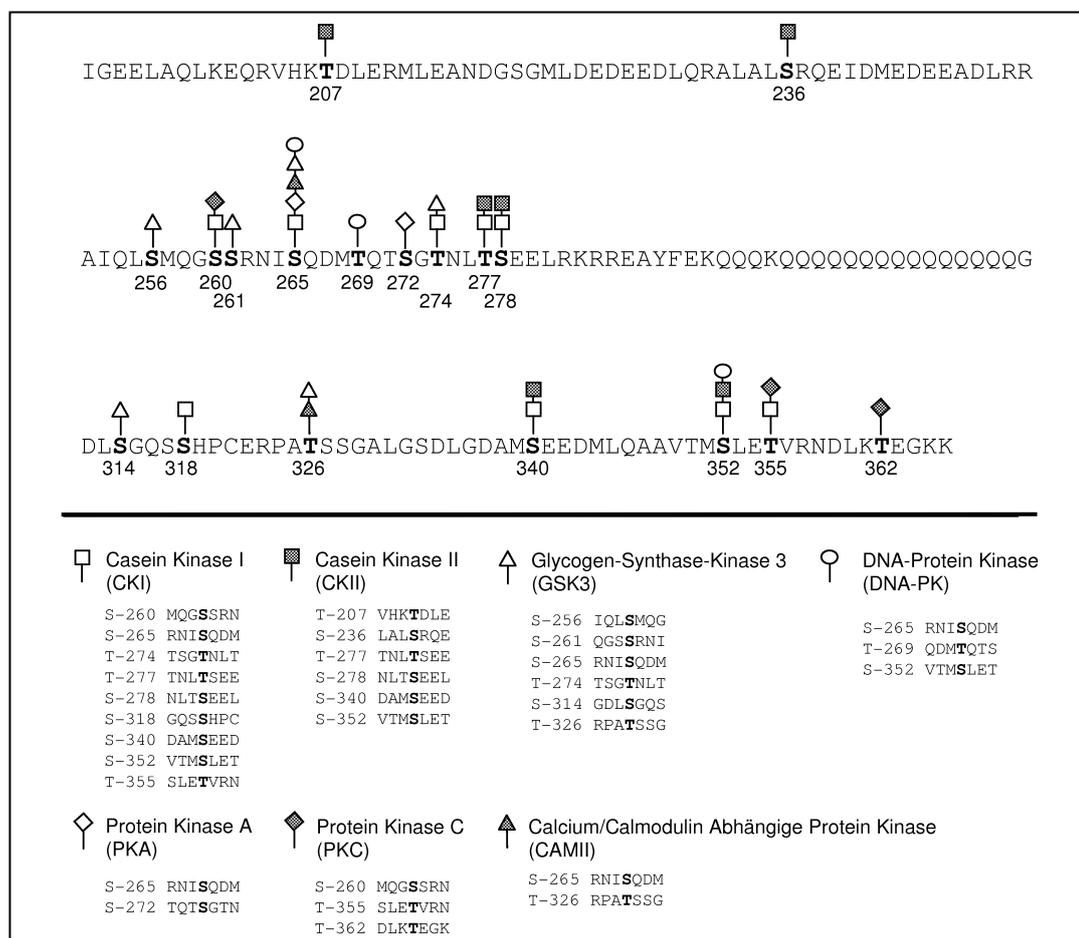


Abb 4.8 C-terminale Aminosäuresequenz und potenzielle Phosphorylierungsstellen von ATXN3.

Die Positionen der 18 Serin- und Threonin-Reste sind jeweils über der Aminosäuresequenz mit Symbolen gekennzeichnet. Die Symbole verweisen auf die jeweils identifizierten Sequenz-Motive und entsprechenden Kinasen im unteren Teil der Abbildung, die mit der Prädiktionsanalyse und den Programmen Netphosk1.0 und Disphos1.3 ermittelt wurden.

4.7 Phosphoaminosäuren-Analyse von ATXN3

Die Liste potenzieller Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von ATXN3 umfasst 18 Kandidaten, von denen 7 Threoninreste und 11 Serinreste für die Phosphorylierung in Frage kommen. Mit einer Phosphoaminosäuren-Analyse (s. 3.13.15) wurde überprüft, ob die Phosphorylierung von ATXN3 an Serin-, Threonin- oder Tyrosin-Resten erfolgt. Für die Analyse wurde das ATXN3-Q19-WT und die ATXN3-Q19-S340A-Mutante in HEK293-Zellen exprimiert und *in vivo* radioaktiv phosphoryliert (s. 3.13.13). Das radioaktiv markierte His-ATXN3-Fusionsprotein der Zelllysate wurde über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, im SDS-PAGE-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)- Membran übertragen. Im Autoradiogramm wurden die spezifisch phosphorylierten Banden aus der PVDF-Membran ausgeschnitten und in 6 M HCl für 2 Std bei 110 °C hydrolysiert, um eine Phosphoaminosäuren-Analyse einzelner Aminosäuren der präzipitierten Proteine zu ermöglichen. Da die Phosphodiester-Bindung zwischen der radioaktiven Phosphatgruppe und der jeweiligen Aminosäure bei der HCL-Behandlung nicht angegriffen wird, können nach Auftrennung dieses Gemischs über Zellulose-Dünnschicht-Chromatografieplatten mit einem entsprechenden Aminosäuren-Standard aus Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin die phosphorylierten Aminosäurenreste von ATXN3 im Autoradiogramm zugeordnet werden. Das Autoradiogramm der Dünnschicht-Chromatografie (s. Abb. 4.9B) zeigte, dass hydrolysiertes, markiertes ATXN3-Q19-WT und die ATXN3-Q19-S340A-Mutante ausschliesslich im Bereich des Phospho-Serin-Markers radioaktive Signale aufweisen. Darüber hinaus bestätigte die Phosphoaminosäuren-Analyse die verringere Phosphorylierung der ATXN3-Q19-S340A-Mutante (s. Abb. 4.9A, B).

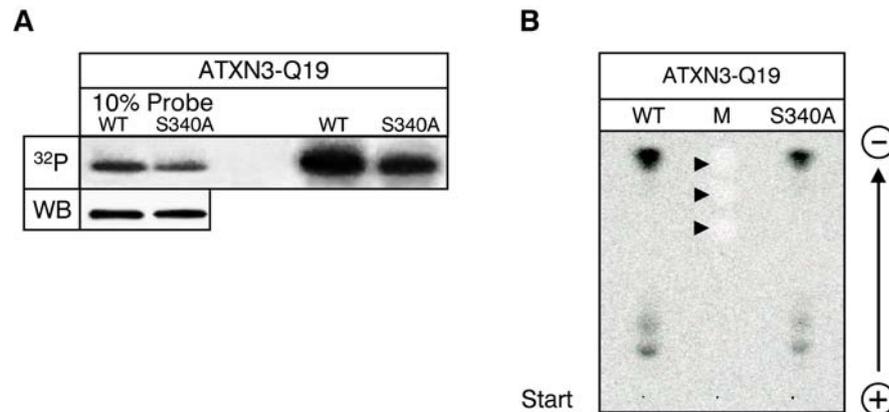


Abb. 4.9 Phosphoamino säuren-Analyse von ATXN3. HEK293-Zellen wurden jeweils mit ATXN3-Q19-WT und ATXN3-Q19-S340A für 48 Std transient transfiziert, für 1 Std in einer phosphatfreien Nährlösung inkubiert und anschliessend mit 0,5 mCi radioaktiven Orthophosphat 3 Std markiert. Das rekombinante His-ATXN3 der Zellysate wurde über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, anschliessend im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und auf eine Polyvinylidene Difluorid-(PVDF)-Membran übertragen. (A) Autoradiogramm und ATXN3-Q19-spezifischer Western Blot der His-ATXN3-Proben (ATXN3-Q19-WT und ATXN3-Q19-S340A) sowie 10 % des Ausgangszellysats, das für Aufreinigung über Ni-NTA-Agrose verwendet wurde. (B) Zellulose-Dünnschicht-Chromatografie und Autoradiografie der HCl-hydrolysierten, radioaktiven ATXN3-Banden von der PVDF-Membran. Die drei umkreisten und mit Pfeilen gekennzeichneten Bereiche entsprechen den Phosphoamino säuren-Markern Phospho-Serin, -Threonin und -Tyrosin. „Start“ bezeichnet den Ausgangspunkt des Probenaufrags. Die Phosphoamino säuren Analyse zeigt, dass die Phosphorylierung von ATXN3-Q19 ausschliesslich an Serin-Resten erfolgt.

4.8 Massenspektrometrische Analyse von ATXN3

Durch die Phosphoamino säurenanalyse konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Phosphorylierung von ATXN3-Q19-WT ausschliesslich an Serin- und nicht an Threonin- oder Tyrosin-Resten erfolgt. Um weitere, potenzielle Phosphorylierungsstellen in ATXN3 einzugrenzen, wurde eine massenspektrometrische Analyse von ATXN3 durchgeführt. Hierzu wurde ATXN3-Q19-WT-His-Fusionsprotein *in vivo* in HEK293-Zellen phosphoryliert und über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt (s. 4.6). Die ATXN3-Q19-WT-Bande wurde aus dem gefärbten Coomassie-Gel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse mit Trypsin verdaut und aufgereinigt (s. 3.13.3). Die identifizierten Peptide (Fa. Proteomics Factory, Berlin) deckten etwa 84 % der ATXN3-Proteinsequenz ab. In der Abbildung 4.10 sind die Peptidfragmente und -sequenzen aufgeführt, die als Phosphopeptide vom Massenspektrometer identifiziert wurden. Die identifizierten phosphorylierten Peptidsequenzen ermöglichten zwar keine exakte Zuordnung einzelner Phosphoserine innerhalb der Peptidfragmente,

stimmten aber mit Ausnahme des Serins in Position 236 mit der *in silico* Analyse potenzieller Phosphorylierungsstellen in ATXN3 überein (s. Abb. 4.8). Darüber hinaus könnten nach der massenspektrometrischen Analyse vier weitere Serinreste an den Positionen 317, 327, 328 und 333 als weitere potenzielle Phosphorylierungsstellen in ATXN3 in Frage kommen (Tab. 4.3).

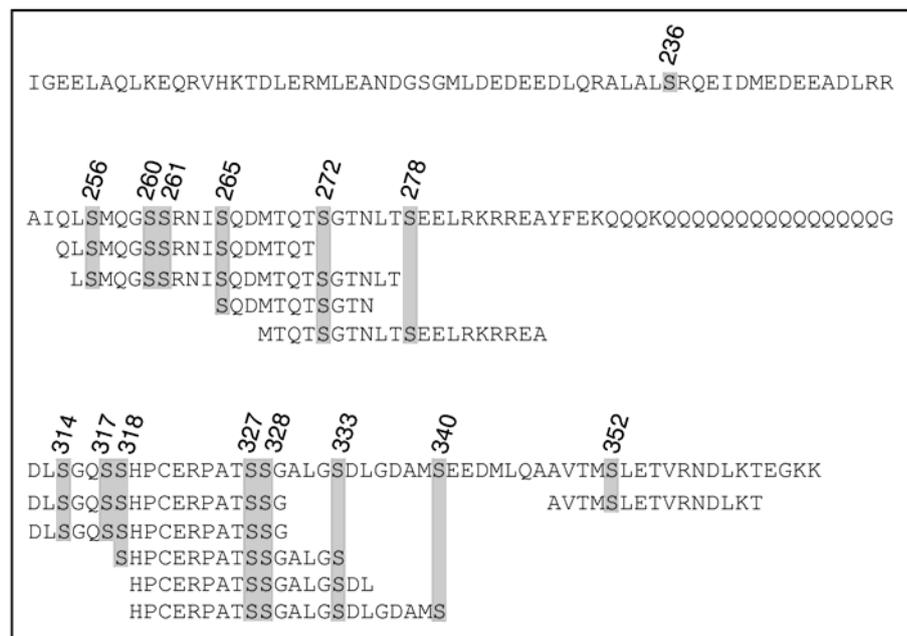


Abb. 4.10 Massenspektrometrische Analyse von ATXN3. HEK293-Zellen wurden mit His-ATXN3-Q19-WT für 48 Std transient transfiziert, für 1 Std in einer phosphatfreien Nährlösung inkubiert und anschliessend mit 0,5 mCi radioaktiven Orthophosphat 3 Std markiert. His-ATXN3-Q19-WT wurde über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, im SDS-PAGE aufgetrennt und anschliessend mit Coomassie gefärbt. Die entsprechende ATXN3-Q19-WT Bande wurde aus dem Coomassie-Gel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Analyse aufbereitet. Die mit der Massenspektrometrie identifizierten Peptidsequenzen, die eine oder mehrere Phosphatgruppen gebunden haben, sind jeweils unterhalb der C-terminalen Aminosäuresequenz von ATXN3-Q19-WT dargestellt.

Tabelle 4.3 Vergleich der durch die massenspektrometrische Analyse identifizierten und den durch die *in silico* Analyse vorhergesagten potenziellen Phosphorylierungsstellen in ATXN3. Übereinstimmende Serinpositionen sind mit einem Plus gekennzeichnet und nicht übereinstimmende Positionen mit einem Minus.

	Position der Serinreste														
	236	256	260	261	265	272	278	314	317	318	327	328	333	340	352
<i>In silico</i> Analyse	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
MS Analyse	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

4.9 Charakterisierung aller phosphorylierten Serine in ATXN3

Den bisherigen Ergebnissen zufolge wird ATXN3 *in vivo* ausschliesslich an Serinresten im C-terminalen Bereich phosphoryliert. Nach der *in silico* und massenspektrometrischen Analyse kommen dafür 15 Serine in Betracht (Tab. 4.3). Um die tatsächlichen Phosphorylierungsstellen in ATXN3 einzugrenzen, wurde daher jedes einzelne Serin durch zielgerichtete Mutagenese mit einem Alanin substituiert (s. Tab 4.4). In kurzem Abstand aufeinander folgende Serine wurden als zusammengesetzte Alanin-Mutanten hergestellt, so dass die Serinreste S260A und S261A, S317A und S318A sowie S327A und S328A jeweils gemeinsam mutagenisiert wurden.

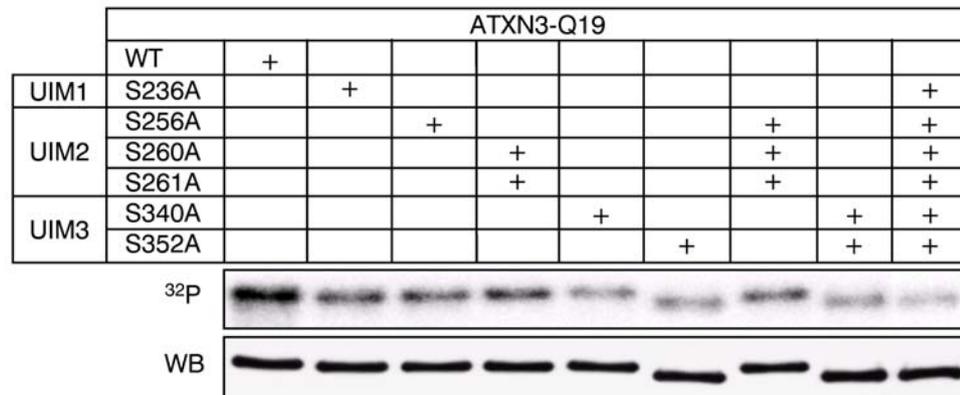
Tabelle 4.4 Aminosäure-Positionen und Bezeichnungen der mutagenisierten ATXN3-Konstrukte. Bezeichnungen der verwendeten His-ATXN3-Q19-Konstrukte und der jeweiligen Aminosäure-Positionen, die in ATXN3-Q19 mutagenisiert wurden.

Mutagenisierte Positionen	Konstrukt
S236A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S236A (UIM1)
S256A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S256A
S260A, S261A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S260A/S261A
S265A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S265A
S272A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S272A
S278A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S278A
S314A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S314A
S317A, S318A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S317A/S318A
S327A, S328A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S327A/S328A
S333A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S333A
S340A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S340A
S352A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S352A
S256A, S260A, S261A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261A (UIM2)
S340A, S352A	pcDNA3-ATXN3-Q19-S340A/S352A (UIM3)

Die His-ATXN3-Q19-Fusionskonstrukte wurden in HEK293-Zellen transfiziert und nach Standardbedingungen (s. 3.13.14) *in vivo* phosphoryliert. Hierfür wurden His-ATXN3-Q19-Fusionsproteine aus den jeweiligen Zelllysaten über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und mit Autoradiografie sichtbar gemacht. Die Bandenstärken im Autoradiogramm und Western Blot wurden densitometrisch vermessen und als Verhältnis der Phospho-Signalintensität zu immunoreaktiven ATXN3-Protein dargestellt. In Abbildung 4.11 sind die ATXN3-Q19-Mutanten gezeigt, die eine verringerte Phosphorylierung im Vergleich zu ATXN3 Wildtypprotein zeigten.

Die stärkste Verringerung der Phosphorylierungsintensität wurde mit den Alanin-Mutanten S340A und S352A beobachtet; auch die Alaninmutanten S236A, S256A und S260A/S261A wiesen eine deutliche Verringerung auf. Alle diese Positionen befinden sich in einem der drei UIMs (s. Abb. 4.1). Die Alanin-Mutanten S265A, S272A, S278A, S317A/S318A, S327A/S328A und S333A zeigten eine vergleichbar starke Phosphorylierung wie das ATXN3-Q19-Wildtypprotein (Daten nicht gezeigt) und tragen damit offenbar nicht zur Phosphorylierung von ATXN3 bei. Die Phosphorylierungsstellen der zweiten und dritten UIM wurden anschliessend zu jeweils einer Alaninmutante (UIM2: S256A+S260A+S261A; UIM3: S340A+S352A) zusammengesetzt und erneut in der *in vivo* Phosphorylierung untersucht. Im Vergleich zu den Intensitäten der Einzelmutanten wurde mit den zusammengesetzten Alanin-Mutanten jedoch nur eine geringfügig verringerte Intensität der Phosphorylierung erzielt. Eine Sechsfachmutante aus den Positionen der ersten, zweiten und dritten UIM (S236A, S256A, S260A, S261A, S340A und S352A) bewirkte einen Verlust der Phosphorylierung um etwa 80%. Auffallend ist ein Banden-Shift der Alanin-Mutante S352A, der möglicherweise durch eine SDS-resistente konformationelle Änderung zustande kommt.

A



B

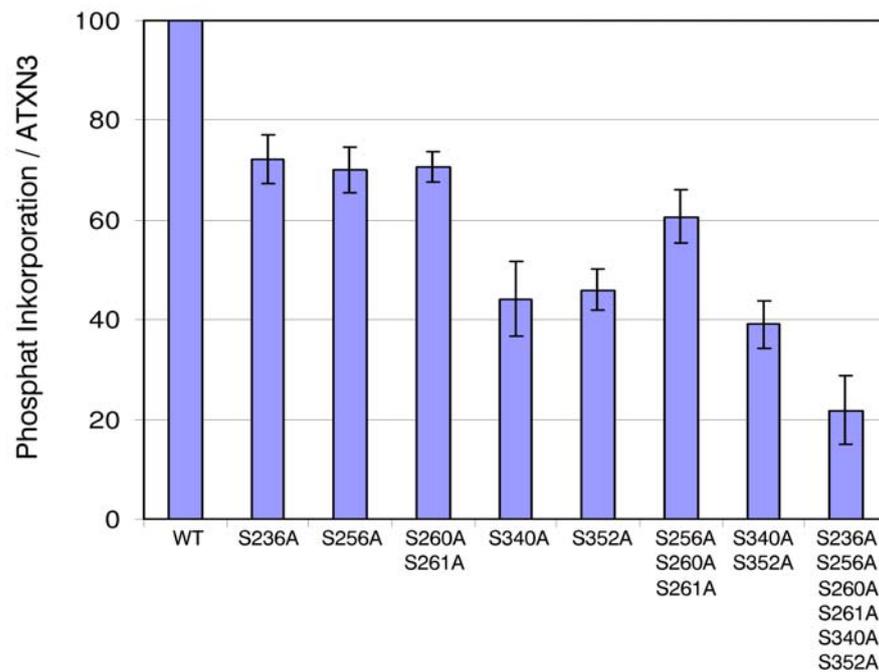


Abb 4.11 Phosphorylierung von ATXN3 an den Serinresten in den Positionen 236, 256, 260, 261, 340 und 352. (A) HEK293-Zellen wurden jeweils mit ATXN3-Q19-WT und den Alaninmutanten von ATXN3-Q19 für 48 Std transient transfiziert, 1 Std in einer phosphatfreien Nährlösung inkubiert und mit 0,5 mCi radioaktiven Orthophosphat 3 Std markiert. Das rekombinante His-ATXN3-Q19 der Zellysate wurde über Ni-NTA-Agarose aufgereinigt, anschliessend im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und durch Autoradiografie bzw. Western Blot sichtbar gemacht. (B) Quantifizierung des eingebauten ^{32}P in die jeweiligen ATXN3-Q19-Isoformen. Die Bandenintensität des Autoradiogramms und Western Blots wurde densitometrisch vermessen und als Verhältnis der Phosphosignal-Intensität zu immunreaktiven ATXN3-Protein dargestellt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar, wobei die Ratio des ATXN3-Q19-WT-Wertes als 100 % festgelegt wurde.

4.10 Lokalisierung von ATXN3 in HEK293-Zellen

Die Phosphorylierung stellt einen wichtigen zellulären Regulationsmechanismus biologischer Prozesse dar, der die Lokalisierung und Funktion von Proteinen beeinflusst (Cozzone, 1988; Zhou et al., 1999; Nestler & Greengard, 2002). Nachfolgend wurde daher der Einfluss der Phosphorylierung auf die Lokalisierung von ATXN3 in der Zelle untersucht.

Dazu wurden nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen transfizierter HEK293-Zellen hergestellt und die Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT und der sechsfachen ATXN3-Q19-Phosphomutante (ATXN3-Q19-Alle, S236A/S256A/S260A/ S261A/S340A/S352A) untersucht (s. 3.13.2). ATXN3 liegt in der Zelle überwiegend zytoplasmatisch vor (Paulson et al., 1997b). Die Ergebnisse (Abb 4.12) bestätigen, dass ATXN3-Q19-WT und ATXN3-Q19-Alle überwiegend in der zytoplasmatischen Fraktion zu finden sind (bzw. 70 % und 95 %), wobei der zytoplasmatische Proteinanteil von ATXN3-Q19-Alle im Vergleich zum Wildtyp 25 % höher liegt. Dementsprechend verringert sich der Anteil von ATXN3-Q19-Alle in der nukleären Fraktion auf 5 % im Vergleich zu 30 % Kernanteil von ATXN3-Q19-WT. Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die Phosphorylierung von ATXN3-Q19 einen erheblichen Einfluss auf seine zelluläre Lokalisierung besitzt und offenbar überwiegend phosphoryliertes ATXN3-Q19 in den Kern gelangt.

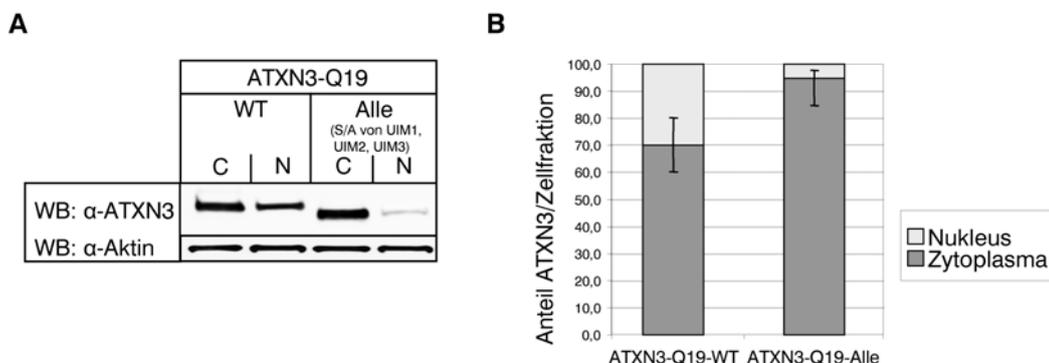


Abb. 4.12 Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT und dessen Phosphomutante nach subzellulärer Fraktionierung. (A) Transient mit ATXN3-Q19-WT oder der ATXN3-Q19-Alle-Mutante (S236A/S256A/S260A/ S261A/S340A/ S352A) transfizierte HEK293-Zellen wurden in zytoplasmatische (C) und nukleäre Fraktionen (N) aufgetrennt. Anschliessend wurden die Zell-Fractionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem His-Antikörper nachgewiesen. ATXN3-Q19-Alle lokalisiert im Gegensatz zu ATXN3-Q19-WT fast ausschliesslich im Zytoplasma. (B) Quantifizierung von ATXN3-Q19-WT und ATXN3-Q19-Alle in zytoplasmatischen und nukleären Fraktionen. Die Bandenintensität des Western Blots wurde densitometrisch vermessen und als Verhältnis von immunreaktiven ATXN3-Protein zu immunreaktiven Aktin-Protein dargestellt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar, wobei beide Fraktionen als 100 % festgelegt wurden.

4.11 Phosphorylierung von Serin 340 und 352 in ATXN3 beeinflusst die zelluläre Lokalisierung

Zur Überprüfung der Hypothese, dass phosphoryliertes ATXN3 in den Zellkern gelangt und im nicht phosphorylierten Zustand im Zytoplasma der Zelle vorliegt, wurden die His-Fusionsproteine ATXN3-Q19-WT und Sechsfach-Phosphomutante ATXN3-Q19-Alle in HEK293 Zellen transient exprimiert und die Lokalisierung der Proteine durch indirekte Immunfluoreszenz-Zytochemie überprüft (s. 3.14.6). Während das ATXN3-Q19-WT-Protein eine diffuse zytoplasmatische und nukleäre Verteilung in HEK293-Zellen zeigte, wurde das Protein der Phospho-Mutante ATXN3-Q19-Alle ausschliesslich im Zytoplasma nachgewiesen (s. Abb. 4.13A). Um darüber hinaus festzustellen, welche der sechs Serin-Phosphorylierungsstellen von ATXN3-Q19 die Änderung in der Lokalisierung beeinflusst, wurden alle Einzel- und kombinierten UIM-Alanin-Mutanten transient exprimiert und die Lokalisierung immunzytochemisch überprüft. Von den überprüften ATXN3-Q19-Phosphomutanten zeigte nur die kombinierte Alanin-Mutante der dritten UIM (ATXN3-Q19-S340A/S352A) eine der Sechsfach-Mutante ATXN3-Q19-Alle vergleichbare,

ausschliesslich zytoplasmatische Lokalisierung. Transient exprimiertes, expandiertes ATXN3-Q70-Wildtypprotein (ATXN3-Q70-WT) und die expandierte ATXN3-Q70-Mutanten, ATXN3-Q70-*Alle* und ATXN3-Q70-S340A/S352A, wiesen eine vergleichbare zelluläre Lokalisierung wie die nicht-expandierten ATXN3-Q19-Isoformen auf. ATXN3-Q70-WT zeigte eine diffuse zytoplasmatische und nukleäre Verteilung im Vergleich zu einer ausschliesslich zytoplasmatischen Lokalisierung der ATXN3-Q70-Mutanten ATXN3-Q70-*Alle* und ATXN3-Q70-S340A/S352A.

Nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen von ATXN3-Q19-S340A/S352A und ATXN3-Q70-S340A/S352A transfizierten HEK293-Zellen bestätigten die Protein-Verteilung der immunzytochemischen Abbildungen (s. Abb. 4.13B). Für die nukleäre Lokalisierung von nicht-expandiertem und expandiertem ATXN3 erscheint somit die Phosphorylierung der Serine in Position 340 und 352 erforderlich zu sein, während die Polyglutaminexpansion von ATXN3 keinen Einfluss zu haben scheint.

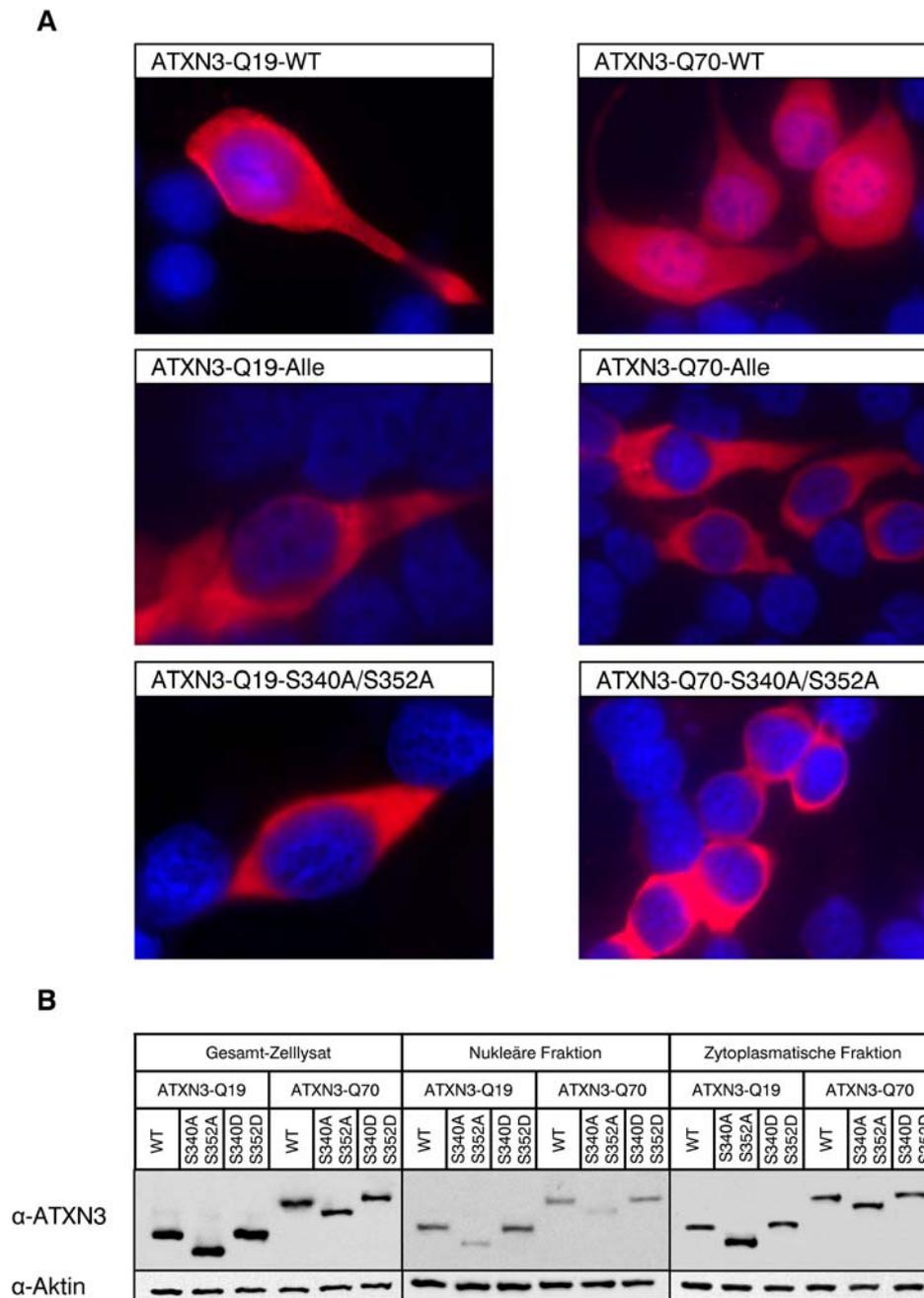


Abb. 4.13 Lokalisierung von normalen und expandierten ATXN3-Wildtyp und ATXN3-Mutanten in HEK293-Zellen. (A) Für die immunzytochemischen Färbungen von ATXN3-Q19-WT und der Mutanten ATXN3-Q19-Alle (S236A/S256A/S260A/S261A/S340A/S352A) und ATXN3-Q19-S340A/S352A, sowie expandiertes ATXN3-Q70-WT und der expandierten Mutanten ATXN3-Q70-Alle (S236A/S256A/S260A/S261A/S340A/S352A) und ATXN3-Q70-S340A/S352A wurden die Konstrukte jeweils in HEK293-Zellen transient exprimiert und durch indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen. Normales und expandiertes ATXN3-WT zeigen eine diffuse zytoplasmatische und nukleäre Verteilung, während die Alaninmutanten, ATXN3-Q19/Q70-Alle und ATXN3-Q19/Q70-S340A/S352A nur im Zytoplasma lokalisiert sind. Kernfärbungen mit DAPI (blau) und ATXN3-Nachweis mit His-Antikörper (rot). (B) Gesamt-Zelllysate (Gesamt Lysat), sowie nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen von ATXN3-Q19-S340A/S352A und ATXN3-Q70-S340A/S352A.

4.12 Phosphorylierung von ATXN3 beeinflusst Lokalisierung und Bildung intrazellulärer Inklusionen

Bei der SCA3 sowie in SCA3-Zell- und Tier-Modellen aggregiert expandiertes ATXN3 im Zellkern zu den charakteristischen nukleären, neuronalen Inklusionen (NI). Daher stellte sich die Frage, ob für die Lokalisierung der NI möglicherweise expandiertes ATXN3 in seiner phosphorylierten Form vorliegen muss und ob die nukleäre Inklusionsbildung mit der Phosphomutante ATXN3-Q70-S340A/S352A unterbleibt. Da expandiertes Volllängen-ATXN3-Q70 über den kurzen Zeitverlauf einer transienten Expression in HEK293-Zellen nicht aggregiert (s. Abb. 4.13A), wurde ein N-terminal, trunkiertes expandiertes ATXN3-Q70 Konstrukt (ATXN3-257Q70) verwendet, dessen N-Terminus bis zur Aminosäure 256 fehlt. Dieses trunkierte ATXN3-Fragment bildet auch bei transienten Transfektionen sehr effizient intrazelluläre Aggregate (Haacke et al., 2006). Für diese Untersuchungen wurde neben dem ATXN3-257Q70-WT auch eine entsprechende Alanin- und Aspartat-Mutante der Serin-Positionen 340/352 eingesetzt.

Die immunzytochemischen Abbildungen 4.14A zeigen, dass die Expression von ATXN3-257Q70-WT in transient transfizierten HEK293-Zellen zur Bildung von überwiegend nukleären Inklusionen und, zu einem geringeren Anteil, auch zu zytoplasmatischen Inklusionen führt. Im Gegensatz dazu bildet die ATXN3-257Q70-S340A/S352A-Mutante überwiegend zytoplasmatische Inklusionen und die ATXN3-257Q70-S340D/S352D-Mutante überwiegend nukleäre Inklusionen.

Die Quantifizierung der immunzytochemischen Färbungen bestätigte, dass ATXN3-257Q70-WT im Kern mehr Inklusionen als im Zytoplasma bildet. Bei der ATXN3-257Q70-S340A/S352A-Mutante ändert sich das Verhältnis deutlich, so dass wesentlich mehr zytoplasmatische als nukleäre Inklusionen vorliegen. Die ATXN3-257Q70-S340D/S352D-Mutante bildete dagegen überwiegend nukleäre Inklusionen und deutlich weniger zytoplasmatische Inklusionen (Abb 3.14B).

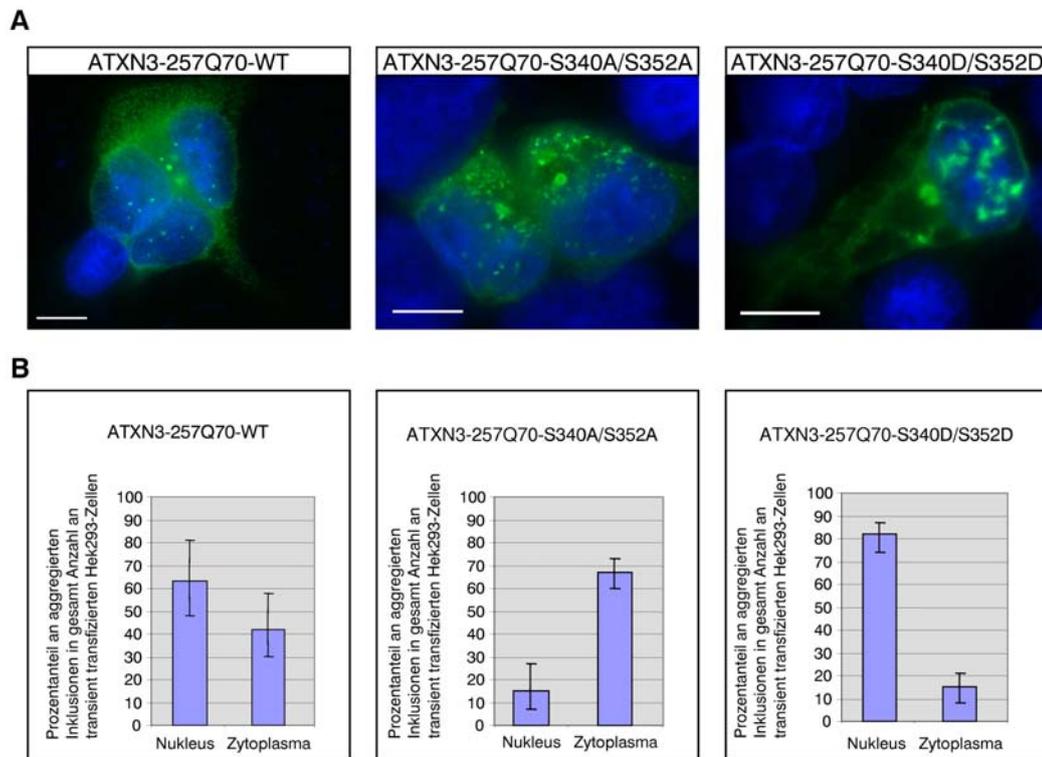


Abb. 4.14 Subzelluläre Lokalisierung und Quantifizierung von Inklusionen mit N-terminal trunziertem ATXN3-257Q70 und analoger Phosphomutanten in HEK293-Zellen. (A) Immunzytochemische Färbungen transient transfizierter HEK293-Zellen mit den Konstrukten ATXN3-257Q70, ATXN3-257Q70-S340A/S352A und ATXN3-257Q70-S340D/S352D. Kernfärbungen mit DAPI (blau) und ATXN3-Nachweis mit einem His-Antikörper (grün). Die Balken entsprechen jeweils 15 μm . (B) Die Quantifizierung der NIs wurde mit drei unabhängigen Färbungen transient transfizierter HEK293-Zellen und den angegebenen Konstrukten durchgeführt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar.

Um die Lokalisierung und Aggregation der N-terminal trunzierten ATXN3-Protein-Isoformen (ATXN3-257Q70-WT, ATXN3-257Q70-S340A/S352A und ATXN3-257Q70-S340D/S352D) in einem ATXN3-freien Hintergrund zu überprüfen, wurden homozygote ATXN3-*knockout*-Maus-Embryo-Fibroblasten-(MEF)-Zellen, die kein endogenes ATXN3 exprimieren, mit den ATXN3-Konstrukten transfiziert und nach 18 bzw. 36 Std Expressionszeit analysiert.

Die immunzytochemischen Färbungen der transfizierten ATXN3-*knockout*-MEF-Zellen zeigten, dass mit der ATXN3-Alanin-Mutante (ATXN3-257Q70-S340A/S352A) nur zytoplasmatische und mit der ATXN3-Aspartat-Mutante (ATXN3-257Q70-S340D/S352D) nur nukleäre Inklusionen gebildet werden. Im Gegensatz dazu bildete das ATXN3-Wildtypprotein Inklusionen sowohl im Kern als auch im Zytoplasma (s. Abb. 4.15). Über die längere Expressionszeit von 36 Std findet sich bei

der ATXN3-Aspartat-Mutante eine starke Zunahme an Zahl und Größe der gebildeten Inklusionen im Vergleich zu ATXN3-Wildtyp oder ATXN3-Alanin-Mutante nach 36 Std. Die Phosphorylierung von ATXN3 könnte demnach die Aggregationstendenz von ATXN3 beschleunigen.

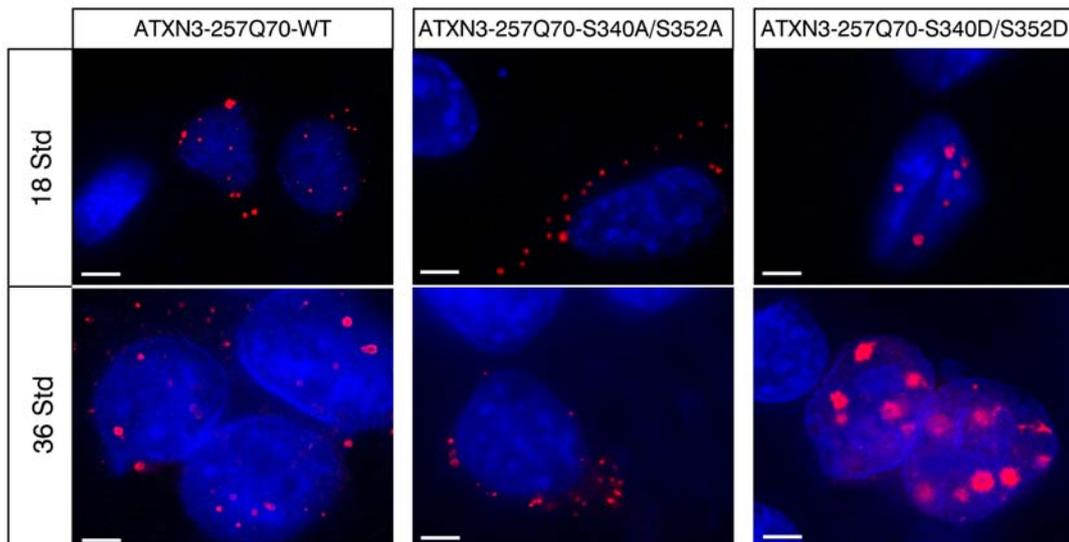


Abb. 4.15 Subzelluläre Lokalisierung von Inklusionen mit N-terminal trunkiertem ATXN3-257Q70 und analoger Phosphomutanten in MEF-Zellen. Immunzytochemische Färbungen transient transfizierter ATXN3-*knockout*-MEF-Zellen mit den Konstrukten ATXN3-257Q70, ATXN3-257Q70-S340A/S352A und ATXN3-257Q70-S340D/S352D nach 18 Std und 36 Std. Inklusionen von ATXN3-Q19-WT sind in MEF-Zellen im Zytoplasma und Kern vorhanden, während Inklusionen von ATXN3-Q19-S340A/S352A nur im Zytoplasma und die von ATXN3-Q19-S340D/S352D nur im Nukleus vorliegen. Die Aggregatbildung von ATXN3-Q19-S340D/S352D nimmt über längere Expressionszeiten (36 Std) zu verglichen mit ATXN3-Q19-WT und ATXN3-Q19-S340A/S352A. Kernfärbungen mit DAPI (blau) und ATXN3-Nachweis mit His-Antikörper (rot). Die Balken entsprechen jeweils 10 μ m.

4.13 Nukleäre Lokalisierung von phosphorylierten ATXN3 ist unabhängig von der NLS in ATXN3

ATXN3 besitzt ein konserviertes, putatives nukleäres Lokalisierungs-Signal (NLS) zwischen den Aminosäuren 282-285 (RKRR). Es sollte daher untersucht werden, ob die Phosphorylierung und Kerntranslokation von ATXN3 von der NLS-Sequenz abhängt. Hierfür wurde die NLS-Sequenz sowohl beim normalen ATXN3-Q19-WT als auch bei den Aspartat-Mutanten, ATXN3-Q19-S340D/S352D und ATXN3-257Q70-S340D/S352D, RKRR zu HHHH mutagenisiert und die subzelluläre Lokalisierung in transient transfizierten HEK293-Zellen untersucht.

Trotz des Verlusts der NLS konnte ATXN3-Q19-WT-HNHH sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus von HEK293-Zellen nachgewiesen werden. Auch die nukleäre Präsenz der Aspartat-Mutanten von ATXN3-Q19-S340D/S352D-HNHH und ATXN3-257Q70-S340D/S352D-HNHH änderte sich nicht durch die Mutagenese der NLS (s. Abb. 4.16).

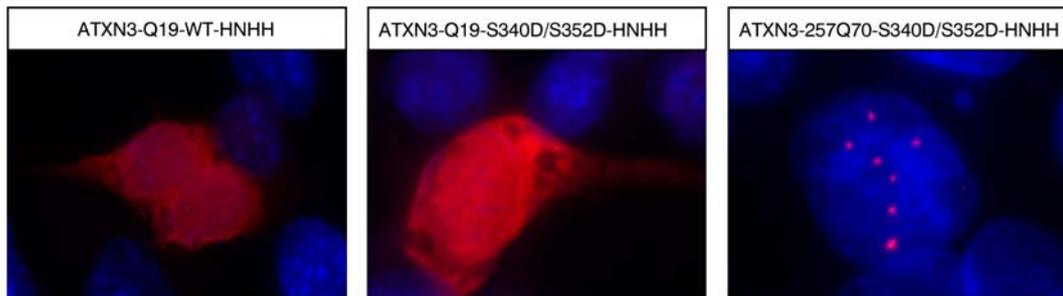


Abb. 4.16 Subzelluläre Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT-HNHH, ATXN3-Q19-S340/S352D-HNHH und ATXN3-257Q70-S340/352D-HNHH in MEF-Zellen. Immunzytochemische Färbungen transient transfizierter ATXN3-knockout-MEF-Zellen mit den Konstrukten ATXN3-Q19-WT-HNHH, ATXN3-Q19-S340D/S352D und ATXN3-257Q70-S340D/S352D. Die zelluläre Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT-HNHH, ATXN3-Q19-S340D/S352D-HNHH und ATXN3-257Q70-S340D/S352D-HNHH wurde durch die mutagenisierte NLS nicht verändert. Kernfärbungen mit DAPI (blau) und ATXN3-Nachweis mit His-Antikörper (rot).

4.14 Die Hemmung der ATXN3-Phosphorylierung mit einem CK2 Inhibitor verhindert die Kerntranslokation von ATXN3

Die bisherigen Ergebnissen haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von S340 und S352 in den CK2-Motiven von ATXN3 für die Kerntranslokation entscheidend ist. Da die Phosphorylierung von CK2-Motiven pharmakologisch mit dem CK2-Inhibitor 2-Dimethylamino-4,5,6,7-Tetrabromo-1H-Benzimidazol (DMAT) unterdrückt werden kann (Pagano et al., 2004), wurden HEK293-Zellen jeweils mit ATXN3-Q19-WT und N-terminal trunziertem ATXN3-257Q70-WT transfiziert und mit DMAT für 48 Std behandelt. Unterschiedliche DMAT-Konzentrationen wurden zuvor an den HEK293-Zellen ausgetestet und zeigten, dass bei einer Behandlung mit 15 μ M die geringsten zytotoxischen Effekte auftreten. Die DMAT-Behandlung der transfizierten Zellen führte mit ATXN3-WT zur ausschliesslich zytoplasmatischen Lokalisierung und mit ATXN3-257Q70-WT zur ausschliesslichen Bildung von zytoplasmatischen ATXN3-Inklusionen (s. Abb. 4.17A).

Zusätzlich wurden mit ATXN3-Q19-WT transfizierte HEK293-Zellen mit Cycloheximid (CHX, einem Proteinsynthese Inhibitor) und Okadasäure oder DMAT für 2 Std und 3 Std behandelt. Die Behandlung mit DMAT zeigte, dass der nukleäre Anteil von ATXN3-Q19-WT mit zunehmender Inkubationszeit geringer wurde. Die Behandlung mit Okadasäure dagegen führte zu einer nukleären Anreicherung von ATXN3-Q19-WT (s. Abb. 4.17B). Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der ATXN3-Phosphorylierung an den CK2-Motiven tatsächlich die nukleäre Translokation von ATXN3 verhindert.

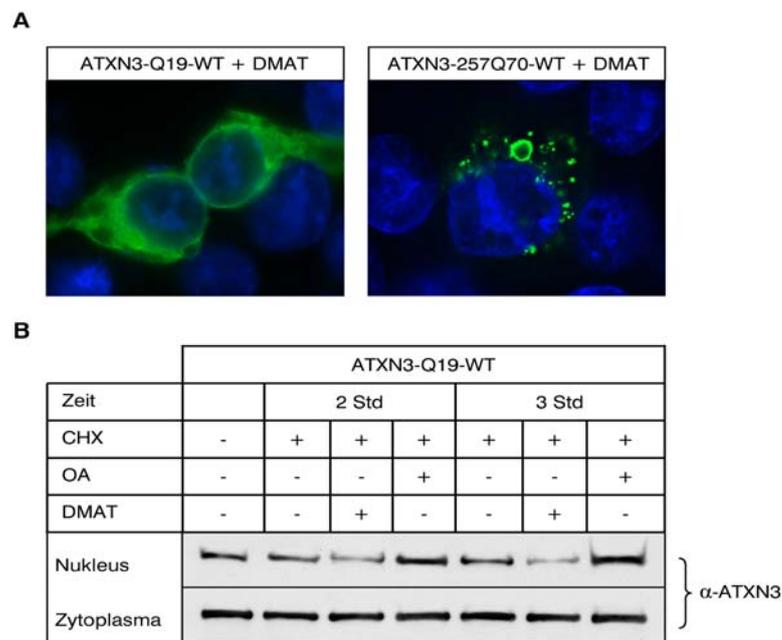


Abb. 4.17 Subzelluläre Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT und ATXN3-257Q70 in MEF-Zellen nach DMAT-Behandlung sowie zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen von ATXN3-Q19-WT transfizierten Zellen nach DMAT- oder OA-Behandlung. (A) Immunzytochemische Färbungen transient transfizierter ATXN3-*knockout*-MEF-Zellen mit ATXN3-Q19-WT und ATXN3-257Q70 nach 48 Std DMAT-Behandlung. ATXN3-Q19-WT befindet sich nach der DMAT-Behandlung überwiegend im Zytoplasma und auch die Inklusionen von ATXN3-257Q70 befinden sich überwiegend im Zytoplasma. Kernfärbungen mit DAPI (blau) und ATXN3-Nachweis mit His-Antikörper (rot). (B) Nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen von ATXN3-Q19-WT transfizierten HEK293-Zellen nach 2 Std und 3 Std CHX Behandlung mit DMAT oder OA. DMAT-Behandlung führte zu einer Verringerung des nukleären ATXN3-Q19-WT-Proteins, während die OA-Behandlung nukleäres ATXN3-Q19-WT-Protein anreicherte.

4.15 Casein-Kinase II interagiert mit ATXN3

Um zu überprüfen, ob ATXN3 tatsächlich ein Substrat der CK2 darstellt, wurde in HEK293-Zellen transient exprimiertes, His-markiertes ATXN3 mit Ni-NTA-Agarose präzipitiert und im Western Blot ko-präzipitiertes CK2-Protein nachgewiesen. Die Abbildung 4.18 zeigt, dass die CK2 mit ATXN3-Q19 ko-präzipitiert werden kann, so dass die CK2 sehr wahrscheinlich mit ATXN3 interagiert und die Phosphorylierung der CK2-Motive von ATXN3 vermittelt.

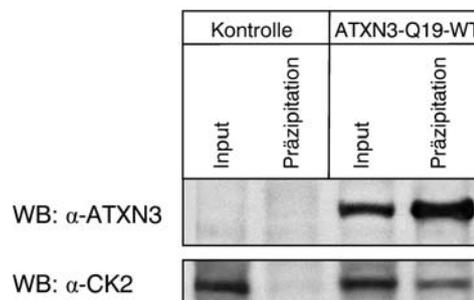


Abb 4.18 Western blot Analyse zur Protein-Protein-Interaktion von ATXN3 mit CK2. HEK293-Zellen wurden mit normalem ATXN3 (ATXN3-Q19-WT) transfiziert und nach 48 Std lysiert. His-ATXN3-Protein wurde nach Zugabe von Ni-NTA-Agarose aus den Zelllysats präzipitiert, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen CK2 und ATXN3 analysiert. Endogenes CK2 kopräzipitiert mit ATXN3-Q19-WT. Die Inputs entsprechen 10 % der Proteinmenge, die für die Präzipitation eingesetzt wurde. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierte HEK293-Zellen verwendet.

4.16 Phosphorylierung von S236 verstärkt die nukleäre Lokalisierung von ATXN3

Die Unterdrückung der ATXN3-Kerntranslokation durch den CK2-Inhibitor DMAT und die physiologische ATXN3-Interaktion mit der CK2 weisen eindeutig auf eine CK2-abhängige Phosphorylierung von ATXN3 hin. Aus der *in silico* Analyse (s. Abb. 4.8) und den *in vivo* Phosphorylierungs-Analysen (s. Abb. 4.11) geht hervor, dass neben den beiden identifizierten CK2-Motiven in der dritten UIM, S340 und S352, ein weiteres relevantes CK2-Motiv, S236, in der ersten UIM vorliegt. In der immunzytochemischen Färbung war die entsprechende Alanin-Mutante, ATXN3-Q19-S236A, nicht wie die ATXN3-Q19-S340A/S352A-Mutante, ausschliesslich zytoplasmatisch lokalisiert (Daten nicht gezeigt).

Um zu überprüfen, inwieweit S236 und die anderen identifizierten phosphorylierbaren Serin-Positionen ebenfalls zur nukleären Lokalisierung von ATXN3 beitragen könnten, wurden nukleäre und zytoplasmatische Fraktionen von transfizierten HEK293-Zellen untersucht, die die Protein-Isoformen ATXN3-Q19-WT, ATXN3-Q19-S236A, ATXN3-Q19-S236D, ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261A, ATXN3-Q19-S256D/ S260D/S261D, ATXN3-Q19-S340A/S352A, ATXN3-Q19-S340D/S352D, ATXN3-Q19-S256D/S260D/S261D/S340D/S352D, ATXN3-Q19-S236D/S340D/S352D und ATXN3-Q19-Alle (jeweils als Alanin- und Aspartat-Mutante) exprimierten (s. Abb. 4.19).

Die Alanin- und Aspartat-Mutante von ATXN3-Q19-S236 zeigte einen den Alanin- und Aspartat-Mutanten von ATXN3-Q19-S340/S352 ähnlichen, aber deutlich schwächeren, zellulären Lokalisierungs-Effekt. Der Western Blot und die entsprechende Quantifizierung (s. Abb. 4.19) zeigten, dass ATXN3-Q19-S236A im Nukleus weniger und als Aspartat-Mutante (ATXN3-Q19-S236D) stärker angereichert vorliegt im Vergleich zum ATXN3-Q19-WT-Protein. Obwohl sich von der zweifachen Alanin-Mutante, ATXN3-Q19-S340A/S352A, deutlich weniger im Kern als von der ATXN3-Q19-S236A findet und von der zweifachen Aspartat-Mutante, ATXN3-Q19-S340D/S352D, wesentlich mehr im Nukleus als von der ATXN3-Q19-S236D vorliegt, zeigten die kombinierten Dreier-Mutanten der Positionen S236/S340/S352 als Alanin- und Aspartat-Mutante eine deutliche Verstärkung der jeweiligen Lokalisierungseffekte (s. Abb. 4.19). Im Gegensatz dazu scheinen die Phosphorylierungsstellen der zweiten UIM, S256/S260/S261, keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisierung von ATXN3 zu besitzen, denn die nukleäre und zytoplasmatische Verteilung von ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261A und ATXN3-Q19-S256D/S260D/S261D ist vergleichbar mit der Verteilung des ATXN3-Q19-WT-Proteins. Darüber hinaus konnte mit der Aspartat-Mutante ATXN3-Q19-S256D/S260D/S261D/S340D/S352D keine stärkere nukleäre Lokalisierung als mit ATXN3-Q19-S340D/S352D erreicht werden.

Somit wird die nukleäre Lokalisierung von ATXN3 offenbar durch die Phosphorylierung der beiden CK2-Motive (S340 und S352) in der dritten UIM erreicht und durch die Phosphorylierung von S236 in der ersten UIM zusätzlich verstärkt. Die in der zweiten UIM gelegenen Phosphorylierungsstellen scheinen für die nukleäre Lokalisation von ATXN3 keine Bedeutung zu haben.

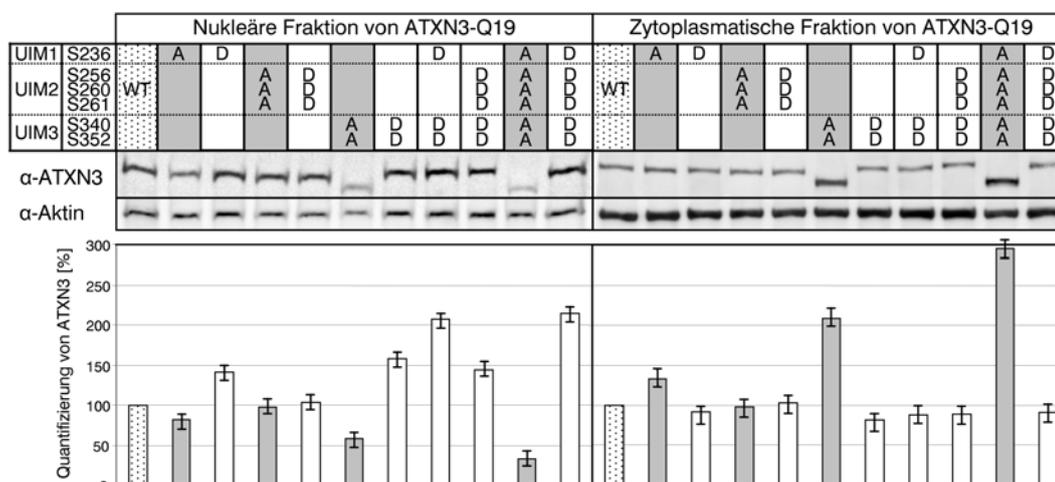


Abb. 4.19 Lokalisierung von ATXN3-Q19-WT und dessen Alanin-/Aspartat-Phosphomutanten nach Fraktionierung. Transient mit ATXN3-Q19-WT, ATXN3-Q19-S236A, ATXN3-Q19-S236D, ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261A, ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261D, ATXN3-Q19-S340A/S352A, ATXN3-Q19-S340D/S352D, ATXN3-Q19-S256D/S260D/S261D/S340D/S352D, ATXN3-Q19-S236D/S340D/S352D und ATXN3-Q19-Alle (Ala/Asp) transfizierte HEK293-Zellen wurden in zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen aufgetrennt. Anschließend wurden die Fraktionen mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot ATXN3 mit His-Antikörper nachgewiesen. Dargestellt sind die Western Blot-Analysen der nukleären und zytoplasmatischen Fraktionen (oben) und die entsprechende quantitative Auswertung (unten). Die Bandenintensität der Western Blots wurde densitometrisch vermessen und als Verhältnis von immunoreaktiven ATXN3-Protein zu immunoreaktiven Aktin-Protein dargestellt. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar, wobei ATXN3-Q19-WT als 100 % festgelegt wurden.

4.17 Phosphorylierung der CK2-Motive in der dritten UIM hat keinen Einfluss auf Ubiquitin-Bindungs-Eigenschaften von ATXN3

Die identifizierten Phosphorylierungspositionen befinden sich interessanterweise innerhalb der hoch konservierten funktionellen Ubiquitin-interagierenden-Motive (UIMs). Über die UIMs werden polyubiquitinierte Proteine gebunden und über die katalytische Cystein-Domäne von ATXN3 deubiquitiniert (Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004). Nach Angaben von Mao et al. (2005) sind für die Interaktion mit Polyubiquitinketten die erste und zweite UIM erforderlich, während die dritte UIM von ATXN3 keine Bedeutung bei der Interaktion spielt. Da die Phosphorylierung der identifizierten Positionen in den UIMs die Interaktion mit Substraten erheblich beeinflussen könnte, wurden Ko-Immunopräzipitationen mit synthetischen K48-gebundenen Polyubiquitinketten unterschiedlicher Länge und verschiedenen His-ATXN3-Fusionsproteinen durchgeführt. Zusätzlich zu ATXN3-Q19-WT wurden Alanin-Mutanten der zweiten und dritten UIMs (S256A/S260A/S261A und

S340A/S352A) verwendet. Die ATXN3-Bindung von Polyubiquitinketten mit weniger als vier Ubiquitinen wurde mit der Alaninmutante S256A/S260A/S261A stark reduziert, während die Alanin-Mutante S340A/S352A und die Aspartat-Mutante S340D/S352D eine ähnliche Ubiquitin-Bindung wie das ATXN3 Wildtypprotein aufwies (s. Abb. 4.20). Demzufolge hat die Phosphorylierung der CK2-Motive in der dritten UIM offenbar keinen Einfluss auf die Bindung von polyubiquitinierten Substraten.

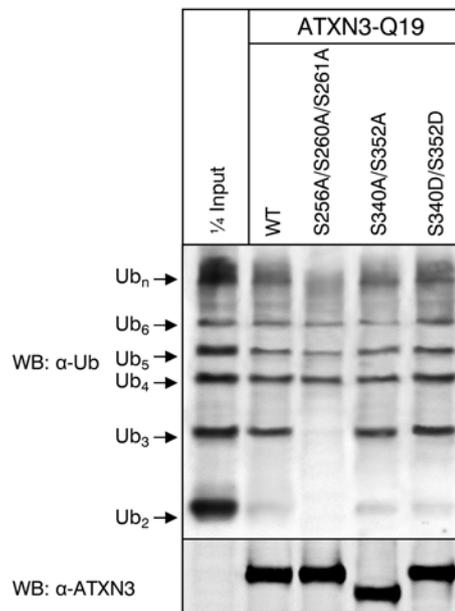


Abb. 4.20 Interaktion verschiedener ATXN3-Phospho-Mutanten mit synthetischen K48-gebundenen Polyubiquitinketten. Ko-Immunopräzipitationen von synthetischen K48-gebundenen Polyubiquitinketten mit His-ATXN3-Q19-WT und den Mutanten ATXN3-Q19-S256A/S260A/S261A, ATXN3-Q19-S340A/S352A und ATXN3-Q19-S340D/S352D. Die Alaninmutante der zweiten UIM, S256A/S260A/S261A bindet Polyubiquitinketten mit 4-6 Ubiquitin-Einheiten, während die Alanin- und Aspartatmutante der dritten UIM (S340/352A und S340/352D) wie ATXN3-Q19-WT Polyubiquitinketten mit drei und mehr Ubiquitin-Einheiten bindet.

4.18 Die Phosphorylierung von ATXN3 beeinflusst nicht die Interaktion von ATXN3 mit RAD23B, VCP oder HDAC3

Die Kerntranslokation von phosphoryliertem ATXN3 bzw. die zytoplasmatische Lokalisierung von nicht phosphoryliertem ATXN3 könnte von funktioneller Bedeutung bei der Interaktion mit physiologisch interagierenden Proteinen sein. Daher wurden drei bekannte ATXN3-Interaktionspartner RAD23B, VCP und HDAC3 untersucht (Wang et al., 2000; Doss-Pepe et al., 2003; Evert et al., 2006). RAD23B

spielt eine wichtige Rolle beim *nucleotide excision repair* (NER) und beim Ubiquitin-Proteasom-vermittelten Proteinabbau (Ortolan et al., 2004; Raasi & Pickart, 2003). ATXN3 interagiert mit VCP und reguliert so die Retrotranslokation von ERAD-Substraten (Wang et al., 2006; Zhong & Pittman, 2006). Die Histon-Deazetylase HDAC3 ist Bestandteil von transkriptionellen Repressorkomplexen auf Genpromotoren und inhibiert die Transkription durch Histon-Deazetylierung (Zhang et al., 2002). ATXN3 interagiert dabei direkt mit HDAC3 und beeinflusst die Aktivität HDAC3-enthaltender Repressorkomplexe (Evert et al., 2006).

Ko-Immunopräzipitationen (s 3.13.3) von HEK293-Zellen, die mit normalem ATXN3 (ATXN3-Q19-WT), der Sechsfach-Alanin-ATXN3-Mutante (ATXN3-Q19-Alle-Ala) und der Sechsfach-Aspartat-ATXN3-Mutante (ATXN3-Q19-Alle-Asp) transfiziert wurden, zeigten, dass die Interaktion der ATXN3-Alanin- und Aspartat-Mutanten mit endogenem RAD23B, VCP oder HDAC3 unverändert ist im Vergleich zu normalen ATXN3 (s. Abb. 4.21A-C). Die Phosphorylierung von ATXN3-Q19-WT scheint keinen Einfluss auf die Interaktion mit RAD23B, VCP und HDAC3 zu haben.

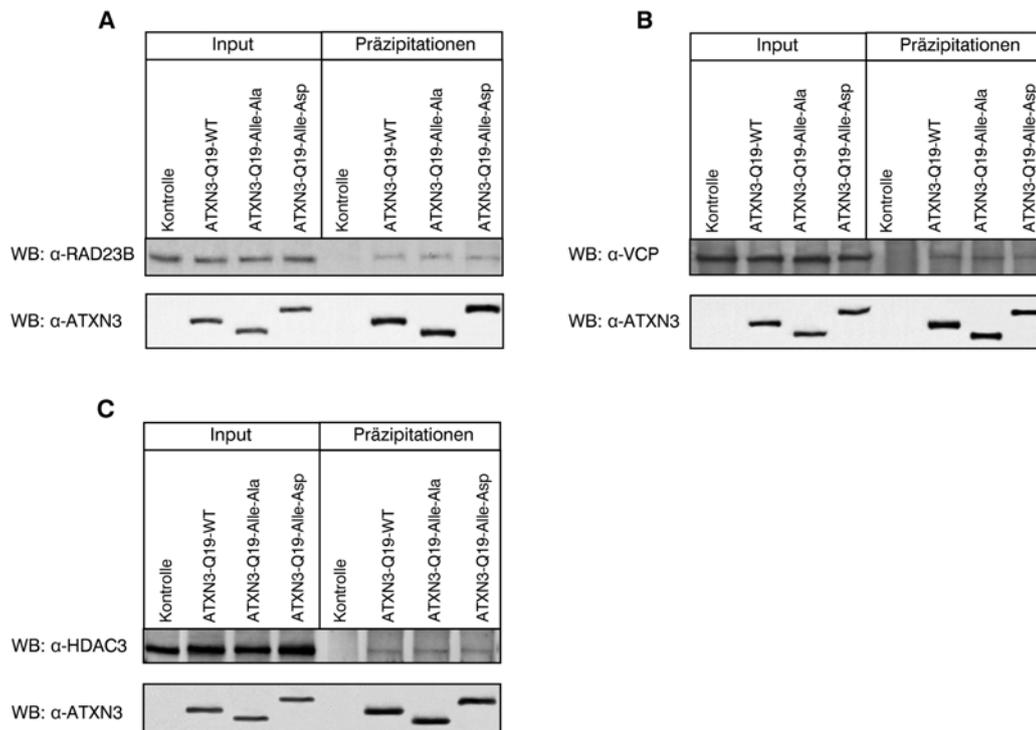


Abb 4.21 Western blot Analysen zur Protein-Protein-Interaktion von ATXN3 mit RAD23B, VCP und HDAC3. HEK293-Zellen wurden mit normalem ATXN3 (ATXN3-Q19-WT), der ATXN3-Alaninmutante (ATXN3-Q19-Alle-Ala, S236A/S256A/S260A/ S261A/S340A/S352A) und der ATXN3-Aspartatmutante (ATXN3-Q19-Alle-Asp, S236D/S256D/S260D/ S261D/S340D/S352D) transfiziert und nach 48 Std lysiert. His-ATXN3-Proteinkomplexe wurden nach Zugabe von Ni-NTA-Agarose aus den Zelllysaten präzipitiert, im SDS-PAGE-Gel aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen (A) RAD23B, (B) VCP, (C) HDAC3 und ATXN3 analysiert. Endogenes RAD23B, VCP und HDAC3 kopräzipitiert sowohl mit ATXN3-Q19-WT als auch mit der Alanin- und Aspartat-Mutante. Die Inputs entsprechen 10 % der Proteinmenge, die für die Präzipitation eingesetzt wurden. Als Kontrolle wurden nicht-transfizierten HEK293-Zellen verwendet.

4.19 Phosphorylierung von ATXN3 steigert die transkriptionelle Repression des MMP-2 Gens

ATXN3 fungiert als transkriptioneller Ko-Repressor des MMP-2-Gens. ATXN3 bindet spezifisch an die Promoter-Region des MMP-2-Gens und bildet einen Repressor-Komplex mit dem nukleären Rezeptor Korepressor, NCoR und der Histon-Deazetylase, HDAC3. Die Ausbildung des Repressor-Komplexes führt zur Deazetylierung Chromatin-gebundener Histonproteine am MMP-2-Promoter und reprimiert die Transkription des MMP-2-Gens (Evert et al., 2006). Da die Phosphorylierung von ATXN3 zu einer verstärkten Kerntranslokation führt, könnte auf diese Weise die transkriptionelle Repressor-Aktivität von ATXN3 auf Zielgene wie MMP-2 verstärkt werden. In Reporter-gen-Analysen wurde die Effekte von ATXN3-

Q19-WT, Alanin- und Aspartat-Phospho-Mutanten der Serin-Reste S340/S352, S236/S340/S352 und S236/S256/S260/S261/S340/S352 auf die MMP-2-Transkription untersucht. Hierfür wurden die genannten ATXN3-Konstrukte zusammen mit einem MMP-2-Promotor-Luziferasekonstrukt (s. 3.13.16) in mesenzepale Ratten-Zelllinien (CSM14.1) transfiziert und anschliessend die Luziferaseaktivitäten gemessen (s. Abb. 4.22).

Die Aspartat-Mutante ATXN3-Q19-S236D/S340D/S352D zeigte eine starke Zunahme der Repressor-Aktivität auf die MMP-2-Transkription im Vergleich zum ATXN3-Q19-WT (s. Abb. 4.22A). Diese Repressor-Aktivität von ATXN3 konnte nicht durch zusätzliche Aspartat-Mutationen in den Positionen von S256/S260/S261 (ATXN3-Q19-S236D/S256D/S260D/S261D/S340D/S352D) gesteigert werden. Die entsprechenden Alanin-Mutanten von ATXN3 zeigten dagegen eine deutliche Abnahme der Repressor-Aktivität auf die MMP-2-Gentranskription.

Um den Effekt der Phosphorylierung von endogenen ATXN3 in CSM14.1 Zellen auf die transkriptionelle Repressor-Aktivität zu untersuchen, wurden native CSM14.1-Zellen mit dem MMP-2 -Promotor-Reporterkonstrukt transfiziert und mit dem CK2-Inhibitor DMAT behandelt (s. Abb. 4.22B). Die DMAT-Behandlung bewirkte eine konzentrationsabhängige Steigerung der MMP-2-Gentranskription, die höchstwahrscheinlich auf eine zytoplasmatische Lokalisierung und einen damit verbundenen Verlust der Repressor-Aktivität von ATXN3 zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Phosphorylierung von ATXN3 durch verstärkte Kerntranslokation zu einer Steigerung der transkriptionellen Repressor-Aktivität von ATXN3 führen kann.

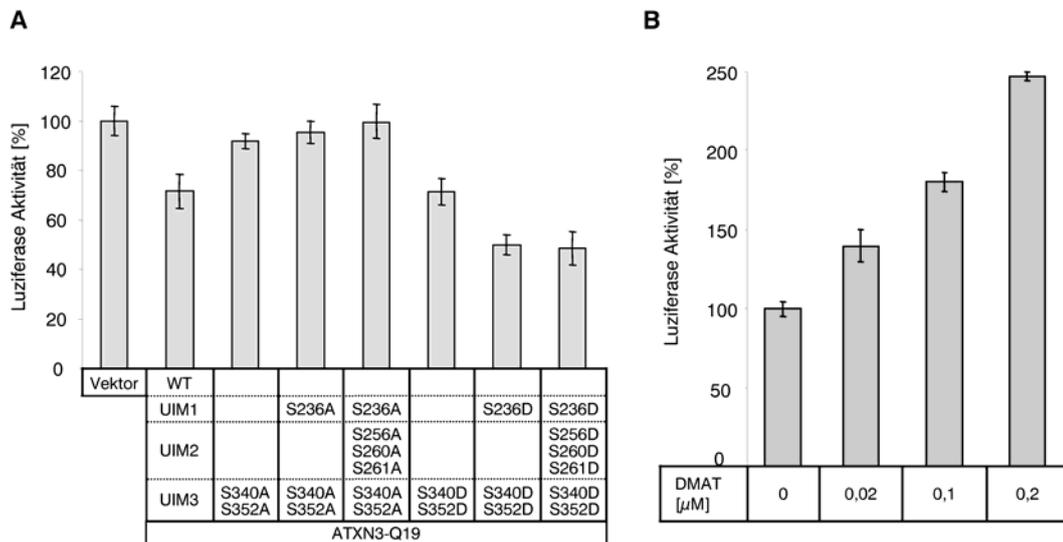


Abb. 4.22 Untersuchung der transkriptionellen Repressoraktivität von ATXN3-Q19-WT und den jeweiligen Alanin- und Aspartat-Mutanten. (A) Reportergen-Analysen mit einem MMP-2-Promotor-Luziferase-Konstrukt und ATXN3-Q19-WT sowie entsprechenden Alanin-/Aspartat-Isoformen in CSM14.1-Zellen. Die Aspartat-Mutante ATXN3-Q19-S236D/S340D/S352D zeigte die stärkste Repressoraktivität während alle untersuchten Alanin-Mutanten einen Verlust der Repressoraktivität zeigten im Vergleich zum Wildtyp. (B) Reportergen-Analyse von transfizierten CSM14.1-Zellen mit dem MMP-2-Reporter-Konstrukt unter DMAT-Behandlung. Die Behandlung mit steigenden DMAT-Konzentrationen führte zu einem Anstieg der MMP-2-Transkription. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar. Die Luziferase-Aktivität wurde jeweils auf die Aktivität in Leer-Vektor transfizierten oder unbehandelten Zellen bezogen.

V. Diskussion

Die Phosphorylierung von Proteinen beeinflusst deren Funktion und stellt einen der wichtigsten Regulationsmechanismen von biologischen Prozessen in der Zelle dar. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATXN3 mit der CK2-Kinase interagiert und an spezifischen Serinresten durch die CK2 phosphoryliert wird. Die CK2-Phosphorylierung bewirkt eine nukleäre Translokation des Proteins und führt zu einer Steigerung der transkriptionellen Repressor-Aktivität von ATXN3. Die Phosphorylierung von expandiertem ATXN3 führt zu gesteigerter nukleärer Aggregation des mutierten Proteins und Verlust der transkriptionellen Repressor-Aktivität von ATXN3. Durch pharmakologische Versuche mit CK2-Inhibitoren konnte weiterhin gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation und nukleäre Aggregation von ATXN3 verhindert werden kann. Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass die Phosphorylierung von ATXN3 einen entscheidenden Einfluss auf die zelluläre Lokalisierung und Funktion des Proteins hat und bei der SCA3-Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen könnte.

5.1 Identifizierung relevanter Phosphorylierungsstellen in ATXN3

Durch systematische Mutations- und Phosphoaminosäuren-Analysen konnte gezeigt werden, dass ATXN3 *in vitro* und *in vivo* ausschließlich an spezifischen Serinresten im C-terminalen Bereich des Proteins von der CK2 phosphoryliert wird. Im Gegensatz zu den *in vitro* Experimenten, die eine Phosphorylierung von ATXN3 ausschließlich an S340 zeigten, konnte *in vivo* mit der ATXN3-S340A-Mutante keine vollständige Unterdrückung der Phosphorylierung beobachtet werden. Der *in vivo* Befund machte deutlich, dass weitere Phosphorylierungsstellen im C-Terminus von ATXN3 existieren, die bei der *in vitro* Phosphorylierung nicht erfasst werden konnten, da wichtige Voraussetzungen wie z.B. die zelluläre Lokalisierung und das Verhältnis von Substrat und Kinase *in vitro* nicht eingehalten werden können (Liu & Heckman, 1998; Mochly-Rosen et al., 1991; Staudinger et al., 1995).

Durch die Kombination weiterer, Mutagenese-, Phosphoaminosäuren- und Massenspektrometrie-Analysen mit *in vivo* phosphoryliertem ATXN3 konnte

schließlich gezeigt werden, dass neben S340 die Serinreste S236, S256, S260, S261 und S352 von ATXN3 phosphoryliert werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sehr viel mehr Serinreste von ATXN3 *in vivo* phosphoryliert werden als in der kürzlich veröffentlichten Studie von Fei et al. (2007). Bei dieser Studie wurde gezeigt, dass ATXN3 *in vitro* von der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) an S256 phosphoryliert wird und zu einer erhöhten Löslichkeit von expandierten ATXN3 beiträgt (Fei et al., 2007). Die Analysen in dieser Arbeit zeigen, dass S256-Phosphorylierung hinsichtlich der Phosphorylierungsintensität und Lokalisierung von ATXN3 eine untergeordnete Rolle spielen.

Viele Proteine besitzen mehrere Phosphorylierungsstellen, die von unterschiedlichen Kinasen phosphoryliert werden können, wobei die erste Phosphorylierung die darauf folgenden Phosphorylierungen z.B. durch konformationelle Änderungen des Proteins ermöglicht. Ein Beispiel für eine solche Kaskade ist das Mitogen-Aktivierungsprotein, MAP, das mit jeder zusätzlichen Phosphorylierung eine neue Funktion erhält (Pearson et al., 2001). Die festgestellten unterschiedlichen Phosphorylierungsintensitäten der identifizierten Positionen in ATXN3 könnten ein Hinweis darauf sein, dass die einzelnen Serinreste von ATXN3 über eine ähnliche, sequenzielle Kaskade phosphoryliert werden. Die stärkste Verringerung der Phosphorylierungsintensität wurde mit den Alanin-Mutanten S340A und S352A erreicht, während die Alaninmutanten S236A, S256A und S260A/S261A eine geringere Abnahme der Phosphorylierungsintensitäten aufwiesen. Ob die Phosphorylierung von S340 und S352 dabei als initiales Signal dient, das die Phosphorylierung weiterer Positionen einleitet, muß in zusätzlichen Studien geklärt werden.

5.2 Einfluss der Phosphorylierung auf subzelluläre Lokalisierung

Die subzelluläre Lokalisierung Polyglutamin-expandierter Proteine wird als wichtiger pathogenetischer Prozess angesehen. Experimente mit Huntingtin und Ataxin-1 zeigen, dass eine nukleäre Lokalisierung des expandierten Proteins für die Pathogenese und den progredienten Zelltod notwendig ist (Klement et al. 1998; Saudou et al. 1998; Peters et al. 1999). So zeigen transgene Tiere, die Ataxin-1 mit defektem nukleären Importsignal exprimieren, eine zytoplasmatische Lokalisation von Ataxin-1 und verringerte Neurotoxizität (Klement et al. 1998). Auch bei der HD

korreliert die frühe nukleäre Lokalisation von mutantern Huntingtin in striatalen Zellen von YAC-HD-Mäusen mit einer massiven Atrophie des Striatums, einer der am stärksten betroffenen Region bei der HD.

Für die Translokation von Proteinen aus dem Zytoplasma in den Zellkern, die grösser als 40 kDa sind, wird ein sogenanntes Kernlokalisierungssignal (NLS, *nuclear localisation signal*) benötigt. An die NLS bindet der Importrezeptor Importin und das GTP-bindende Protein RAN, die die Energie-abhängige Translokation des Komplexes durch die Kernpore vermitteln (Kalderon et al., 1984; Newmeyer & Forbes, 1988; Richardson et al., 1988). Die NLS liegt in vielen Proteinen maskiert vor und wird erst durch eine Konformationsänderung, wie z.B. durch Phosphorylierung, zugänglich. Bei HD führt die selektive Phosphorylierung von Serinrest 421 in mutantern Huntingtin zu einer reduzierten nukleären Translokation und verringerter striataler Toxizität. Möglicherweise wird durch die Phosphorylierung die NLS maskiert und auf diese Weise die nukleäre Translokation verhindert (Van Raamsdonk et al., 2007).

Mit den in dieser Arbeit eingesetzten Phosphorylierungs-defizienten und -imitierenden ATXN3-Konstrukten konnte gezeigt werden, dass die nukleäre Translokation von ATXN3 über die Phosphorylierung der drei CK2-Motive S236, S340 und S352 erfolgt. Die Phosphorylierung von S236 erscheint dabei nicht unbedingt notwendig zu sein, verstärkt aber die nukleäre Translokation von ATXN3. Die Mutagenese der postulierten putativen NLS (Tait et al., 1998; Trottier et al., 1998; Perez et al., 1998) bewirkte keine Veränderung der subzellulären Lokalisation von ATXN3, so dass diese putative NLS in ATXN3 offenbar keine funktionelle Bedeutung besitzt. Eine mögliche Maskierung der prädiktierten NLS durch die CK2-Phosphorylierung erscheint daher unwahrscheinlich, obwohl die Existenz weiterer NLS nicht ausgeschlossen werden kann.

5.3 Einfluss der Phosphorylierung auf Aggregation und Toxizität

Transgene SCA3-Mäuse, die expandiertes ATXN3 über zwei angefügte SV40-NLS-Sequenzen im Kern exprimieren, erkrankten wesentlich früher und weisen im Vergleich zu SCA3-Tieren, die mutiertes ATXN3 ohne exogene NLS exprimieren eine verstärkte Inklusionsbildung in verschiedenen Neuronen auf (Bichelmeier et al., 2006). Im Gegensatz dazu weisen transgene SCA3-Mäuse, die ATXN3 mit einen zusätzlichen

nukleären Exportsignal (NES, *nuclear export signal*) exprimieren, einen milderen Phänotyp und eine geringere Inklusionsbildung auf. Demnach sind die bei der SCA3 stattfindenden Polyglutamin-induzierten Aggregationsprozesse im Kern mit Zytotoxizität und Neurodegeneration assoziiert.

Die in dieser Arbeit eingesetzten Phosphorylierungs-defizienten und -imitierenden C-terminalen expandierten ATXN3-Konstrukte (ATXN3-257Q70) zeigen, dass die zelluläre Lokalisierung der Inklusionen von der CK2-Phosphorylierung abhängig ist. Die Phosphorylierung von ATXN3-257Q70 führt zu einer massiven Bildung nukleärer Inklusionen. Bei der SCA1 ermöglicht die Phosphorylierung von S776 in ATXN1 die Interaktion mit dem Multifunktionsprotein 14-3-3, die zu einer Stabilisierung und erhöhten Inklusionsbildung von ATXN1 führt. Für ATXN3 konnte bislang keine Interaktion mit 14-3-3 nachgewiesen werden (Mosbacher, 2007). Dennoch könnten andere Interaktionspartner existieren, welche die Lokalisierung und die Kerntranslokation von ATXN3 beeinflussen.

Die Aggregation der PolyQ-expandierten Proteine stellt nach neueren Befunden möglicherweise einen neuroprotektiven Mechanismus der Zelle dar, um das mutierte Protein zu inaktivieren (Bates, 2003; Saudou 1998; Sisodia et al., 1998; Tobin u Signer, 2000; Rubinsztein, 2002; Tayloret al., 2002; Soto, 2003, Bowman, 2005). Die eigentlich neurotoxische Wirkung expandierter PolyQ-Proteine wird den durch Proteolyse entstehenden verkürzten PolyQ-Fragmenten zugeschrieben, die als Monomer eine außerordentliche Aggregations- und Oligomerisationsneigung aufweisen. Diese Monomere interagieren mit einer Vielzahl weiterer zellulärer Proteine. So finden sich in den PolyQ-Aggregaten molekulare Chaperone, proteasomale Bestandteile und Komponenten der Transkription, die für eine Dysregulation der zellulären Homöostase verantwortlich sein könnten (Paulson et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Perez et al., 1998; Chai et al, 1999; Evert et al., 2000; McCampbell et al., 2000; Uchihara et al.; 2001; Zander et al., 2001; Diaz-Hernandez et al., 2004). Die neurotoxische Wirkung der Polyglutamin-haltigen Monomere entfaltet sich daher sehr wahrscheinlich vor der Aggregation unlöslicher PolyQ-expandierter Proteine. In Mausmodellen der HD, SCA1 und SCA7 kommt es bereits zu phänotypischen Veränderungen vor der Bildung der makroskopisch sichtbaren Inklusionen (Hodgson et al.,1999; Menalled et al., 2002; Watase et al., 2002; Yoo et

al., 2003). Die Inklusionen sind demnach zwar ein charakteristisches Kennzeichen der PolyQ-induzierten Pathogenese, die Toxizität wird jedoch durch die Sequestrierung interagierender Proteine hervorgerufen.

5.4 Funktionelle Bedeutung der ATXN3-Phosphorylierung

ATXN3 fungiert als transkriptioneller Ko-Repressor des Matrix-Metalloproteinase 2-Gens (MMP-2) (Evert et al., 2006). ATXN3 bindet an die Promoter-Region des MMP2-Gens und rekrutiert den nukleären Rezeptor Korepressor NCoR und die Histondeazetylase HDAC3. Die Ausbildung dieser Repressorkomplexe führt zu einer Deazetylierung Chromatin-gebundener Histonproteine am MMP-2-Promoter und zur transkriptionellen Repression des MMP-2-Gens (Evert et al., 2006). Die Reporterstudien mit den Phosphorylierungs-imitierenden ATXN3-Asp-Mutanten haben gezeigt, dass die Phosphorylierung den transkriptionellen Repressoreffekt von ATXN3 verstärkt, während die nicht-phosphorylierbaren ATXN3-Ala-Mutanten mit einem Verlust der Repression korrelierten. Auch die Inhibition der Phosphorylierung durch DMAT bewirkte einen Verlust der transkriptionellen Repressoraktivität von ATXN3. Demnach reguliert die CK2-Phosphorylierung nicht nur die nukleäre Translokation von ATXN3, sondern vermittelt auch die transkriptionelle Repressoraktivität von ATXN3.

Die MMP-2 spielt eine wichtige Rolle beim Auf- und Abbau der Extrazellulärmatrix (EZM) und ist ein zentraler Mediator entzündlicher Prozesse durch Zytokin-Aktivierung. Neben der transkriptionellen Kontrolle der Genexpression wird MMP-2 durch posttranslationales Prozessieren zum aktiven Protein und durch sogenannte *tissue inhibitor of matrix metalloproteinases* (TIMPs) nach Sekretion in die EZM reguliert. Eine Störung dieser Regulationsmechanismen kann pathologische Auswirkungen haben und wurde auch bereits mit der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung und Multiplen Sklerose in Verbindung gebracht. (Evert et al., 2001).

Neben der Fähigkeit Gene, wie MMP-2 auf transkriptioneller Ebene zu regulieren, besitzt ATXN3 drei Ubiquitin-interagierende-Motive (UIM), deren unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden. In den drei UIMs liegen auch die identifizierten Phosphorylierungsstellen vor: S236 im ersten UIM, S260, S261 und S256 im zweiten UIM und S340 und S352 im dritten UIM (s. Abb. 3.1). ATXN3 bindet Peptidketten mit

vier und mehr Ubiquitinen über seine UIMs und spaltet Ubiquitinketten von Testsubstraten wie Lysozym *in vitro* durch sein katalytisches Zentrum. (Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004; Burnett u Pittman, 2005). Die Phosphorylierung der ATXN3-UIMs könnte daher die Interaktion und die Proteolyse von polyubiquitinierten Proteinen beeinflussen. Da bislang keine physiologischen Substrate von ATXN3 bekannt sind und die untersuchten bekannten, nicht-ubiquitinierten Interaktionspartner VCP, RAD23B und HDAC3 keine Veränderungen bei den Bindungsstudien zeigten, können nur zukünftige Studien mit noch zu identifizierenden physiologischen ATXN3-Substraten den möglichen Einfluss der ATXN3-Phosphorylierung auf seine Ubiquitin-assoziierten Funktionen zeigen.

Die Bindung von ATXN3 zu polyubiquitinierten Proteinen erfolgt überwiegend durch die Bindungsstelle S256 in der zweiten UIM, während der Position S236 nur eine untergeordnete Rolle zukommt und die S352 in der dritten UIM für die Bindung polyubiquitiniertes Substrate vermutlich ebenfalls eine untergeordnete Rolle spielt (s. Abb. 5.2). (Mao et al., 2005). Die Phosphorylierung der beiden CK2-Motive (S340/352) in der dritten UIM könnte somit vorrangig als nukleäres Translokationssignal genutzt werden.

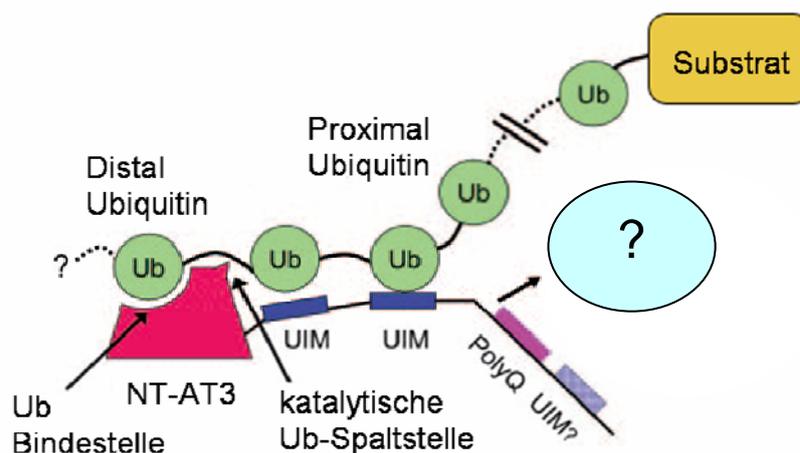


Abb. 5.2 Modell der ATXN3-Funktion als Deubiquitinase (nach Mao et al., 2005). ATXN3 besitzt in der N-terminalen Region ein katalytisches Zentrum, das Ubiquitin-Moleküle von interagierenden, polyubiquitinierten Substraten abspaltet. Die Interaktion zwischen der Ubiquitinkette und den UIMs von ATXN3 erfolgt hauptsächlich über die zweite UIM. Die Sequenz um die Polyglutaminregion von ATXN3 wird diesem Modell nach für die Interaktion mit anderen Proteinen benötigt.

Fei et al haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von ATXN3 *in vitro* durch GSK3 β in Position S256 Einfluss auf die Löslichkeit von ATXN3 hat und damit die Aggregation expandierten ATXN3 beeinflussen könnte (Fei et al., 2007). Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass S256 *in vivo* schwach phosphoryliert wird und zur Kerntranslokation nicht beiträgt.

Darüber hinaus haben Experimente unseres Kooperationspartners (Dr. H. Tricoire, Paris) gezeigt, dass die Expression von Phosphorylierungs-defizienten und -imitierenden ATXN3 in *Drosophila melanogaster* einen entscheidenden Einfluss auf die Lebenszeit der Fliegen hat. Fliegen mit Phosphorylierungs-defizienten ATXN3-Q70 leben länger als transgene Fliegen mit Phosphorylierungs-imitierenden ATXN3-Q70 (s. Abb. 5.3A). Zudem kommt es bei den transgenen SCA3-Alanin-Fliegen zu einer verringerten Inklusionsbildung während transgene SCA3-Aspartat-Fliegen deutlich mehr und größere neuronale Inklusionen aufweisen (s. Abb. 5.3B)

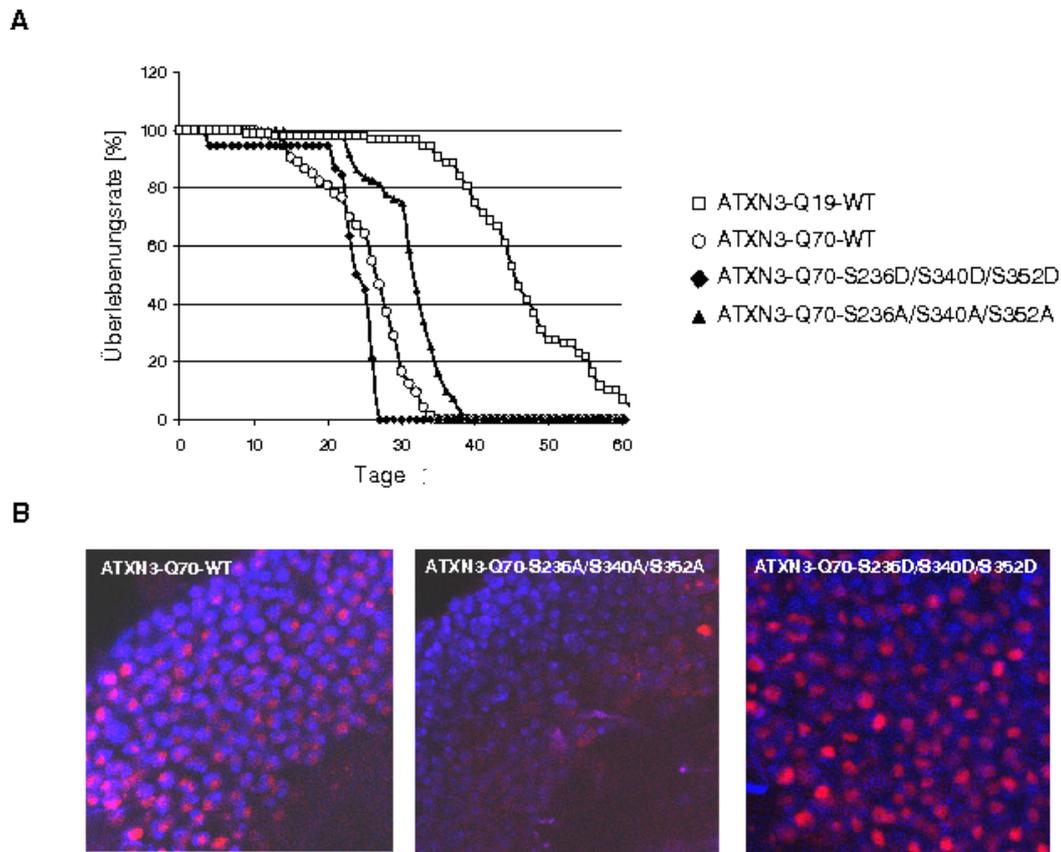


Abb. 5.3A Phosphorylierung von ATXN3 fördert die Aggregatbildung und neuronale Toxizität *in vivo* in *D. melanogaster*. (A) Überlebensrate von *D. melanogaster*, die jeweils ATXN3-Q70-WT, ATXN3-Q70-S340A/S352A und ATXN3-Q19-S340D/S352D über den neuronalen Treiber *elavGS* exprimieren. Fliegen, die verlängertes ATXN3 (ATXN3-Q70-WT, offener Kreis) exprimieren, leben kürzer als Fliegen mit normalem ATXN3 (ATXN3-Q19-WT, offenes Rechteck). ATXN3-Q70-S340D/S352D-Fliegen (Raute) zeigen eine deutliche Abnahme der Überlebensrate im Vergleich zu ATXN3-Q70-WT, während die ATXN3-Q70-S340A/S352A (Dreieck) eine gesteigerte Überlebensrate zeigen. Die Werte stellen die Mittelwerte \pm Standardabweichung (SEM) in Prozent von jeweils drei unabhängigen Versuchen dar. (B) Immunhistochemische Färbungen von Gehirnen aus 10 Tage alten *D. melanogaster*, die jeweils ATXN3-Q70-WT, ATXN3-Q70-S340A/S352A und ATXN3-Q19-S340D/S352D neuronal exprimieren (rot). Die Expression der Aspartat-Mutante verstärkte die Größe und Anzahl der neuronalen Aggregate im Vergleich zu ATXN3-Wildtyp, während die Expression der Alanin-Mutante deutlich weniger neuronale Aggregate erzeugte. Die Kernfärbungen wurden mit DAPI (blau) und die ATXN3-Färbungen mit einem His-Antikörper (rot) durchgeführt.

Die Regulation der CK2-abhängigen Phosphorylierung von ATXN3 könnte somit einen ersten therapeutischen Ansatzpunkt darstellen, um die SCA3-Pathogenese zu verzögern. CK2-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Studien eingesetzt (Critchfield et al., 1997). Natürliche Flavonoide mit CK2-inhibierender Wirkung wurden gegen Pankreaskarzinomzellen *in vitro* mit positiven Ergebnissen getestet

(Ujiki et al., 2006). Ähnliche Flavonoide werden aufgrund der ihnen zugeschriebenen anti-oxidativen Eigenschaften als Nahrungsergänzungsmittel kommerziell angeboten. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, ob mit CK2-Inhibitoren die ATXN3-Q70-induzierte Pathogenese in *D. melanogaster* und transgenen Maus-Modellen aufgehalten werden kann, bevor klinische Studien an SCA3-Patienten initiiert werden können.

VI. Literaturverzeichnis

Albà MM, Santibáñez-Koref MF, Hancock JM (2001) The comparative genomics of polyglutamine repeats: extreme differences in the codon organization of repeat-encoding regions between mammals and *Drosophila*. *J Mol Evol*, 52(3), 249-59.

Albrecht M, Golatta M, Wüllner U, Lengauer T (2004) Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem*, 271(15), 3155-70.

Arrasate M, Mitra S, Schweitzer ES, Segal MR, Finkbeiner S (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, 431(7010), 805-10.

Bates G (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet*, 361(9369), 1642-4.

Blanquet PR (2000) Casein kinase 2 as a potentially important enzyme in the nervous system. *Prog Neurobiol*, 60(3), 211-46.

Berke SJ, Chai Y, Marrs GL, Wen H, Paulson HL (2005) Defining the role of ubiquitin-interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem*, 280(36), 32026-34.

Bichelmeier U, Schmidt T, Hübener J, Boy J, Rüttiger L, Häbig K, Poths S, Bonin M, Knipper M, Schmidt WJ, Wilbertz J, Wolburg H, Laccone F, Riess O (2007) Nuclear localization of ataxin-3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo evidence. *J Neurosci*, 27(28), 7418-28.

Bilen J, Bonini NM (2007) Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS Genet*, 3(10), 1950-64.

Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18(7), 1723-9.

Bowman AB, Yoo SY, Dantuma NP, Zoghbi HY (2005) Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet*, 14(5), 679-91.

Boyle WJ, van der Geer P, Hunter T (1991) Phosphopeptide mapping and phosphoamino acid analysis by two-dimensional separation on thin-layer cellulose plates. *Methods Enzymol*, 201, 110-49.

Burnett B, Li F, Pittman RN (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, 12(23), 3195-205.

Burnett BG, Pittman RN (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(12), 4330-5.

Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM, Paulson HL (1999) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci*, 19(23), 10338-47.

Chai Y, Shao J, Miller VM, Williams A, Paulson HL (2002) Live-cell imaging reveals divergent intracellular dynamics of polyglutamine disease proteins and supports a sequestration model of pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 9310-9315.

Chai Y, Berke SS, Cohen RE, Paulson HL (2004) Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem*, 279(5), 3605-11.

Chen HK, Fernandez-Funez P, Acevedo SF, Lam YC, Kaytor MD, Fernandez MH, Aitken A, Skoulakis EM, Orr HT, Botas J, Zoghbi HY (2003) Interaction of Akt-phosphorylated ataxin-1 with 14-3-3 mediates neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 1. *Cell*, 113(4), 457-68.

Cozzzone AJ (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol*, 42, 97-125.

Critchfield JW, Coligan JE, Folks TM, Butera ST (1997) Casein kinase II is a selective target of HIV-1 transcriptional inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94(12), 6110-5.

DeManno DA, Cottom JE, Kline MP, Peters CA, Maizels ET, Hunzicker-Dunn M (1999) Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Mol Endocrinol*, 13(1), 91-105.

Díaz-Hernández M, Moreno-Herrero F, Gómez-Ramos P, Morán MA, Ferrer I, Baró AM, Avila J, Hernández F, Lucas JJ (2004) Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *J Neurosci*, 24(42), 9361-71.

DiFiglia M, Sapp E, Chase KO, Davies SW, Bates GP, Vonsattel JP, Aronin N (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, 277(5334), 1990-3.

Di Maira G, Salvi M, Arrigoni G, Marin O, Sarno S, Brustolon F, Pinna LA, Ruzzene M (2005) Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB. *Cell Death Differ*, 12(6), 668-77.

Donaldson KM, Li W, Ching KA, Batalov S, Tsai CC, Joazeiro CA (2003) Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 8892-8897.

Doss-Pepe EW, Stenroos ES, Johnson WG, Madura K (2003) Ataxin-3 interactions with rad23 and valosin-containing protein and its associations with ubiquitin chains and the proteasome are consistent with a role in ubiquitin-mediated proteolysis. *Mol Cell Biol*, 23(18), 6469-83.

Dürr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, Chneiweiss H, Benomar A, Lyon-Caen O, Julien J, Serdaru M, Penet C, Agid Y, Brice A (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: Clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, 39, 490-499.

Emamian ES, Kaytor MD, Duvick LA, Zu T, Tousey SK, Zoghbi HY, Clark HB, Orr HAT (2003) Serine 776 of ataxin-1 is critical for polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Neuron*, 38(3), 375-87.

Evert BO, Wüllner U, Klockgether T (2000) Cell death in polyglutamine diseases. *Cell Tissue Res*, 301(1), 189-204.

Evert BO, Vogt IR, Kindermann C, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, Schmitt I, Klockgether T, Wüllner U (2001) Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci*, 21(15), 5389-96.

Evert BO, Araujo J, Vieira-Saecker AM, de Vos RA, Harendza S, Klockgether T, Wüllner U (2006) Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci*, 26(44), 11474-86.

Fei E, Jia N, Zhang T, Ma X, Wang H, Liu C, Zhang W, Ding L, Nukina N, Wang G (2007) Phosphorylation of ataxin-3 by glycogen synthase kinase 3 β at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, 357(2), 487-92.

Grünbaum L, Müller U (1998) Induction of a specific olfactory memory leads to a long-lasting activation of protein kinase C in the antennal lobe of the honeybee. *J Neurosci*, 18(11), 4384-92.

Haacke A, Broadley SA, Boteva R, Tzvetkov N, Hartl FU, Breuer P (2006) Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non-expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet*, 15(4), 555-68.

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem*, 67, 425-79.

Hiyama H, Yokoi M, Masutani C, Sugasawa K, Maekawa T, Tanaka K, Hoeijmakers JH, Hanaoka F (1999) Interaction of hHR23 with S5a. The ubiquitin-like domain of hHR23 mediates interaction with S5a subunit of 26 S proteasome. *J Biol Chem*, 274(39), 28019-25.

Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell*, 84(6), 813-5.

Hodgson JG, Agopyan N, Gutekunst CA, Leavitt BR, LePiane F, Singaraja R, Smith DJ, Bissada N, McCutcheon K, Nasir J, Jamot L, Li XJ, Stevens ME, Rosemond E, Roder JC, Phillips AG, Rubin EM, Hersch SM, Hayden MR (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, 23(1), 181-92.

Humbert S, Bryson EA, Cordelières FP, Connors NC, Datta SR, Finkbeiner S, Greenberg ME, Saudou F The IGF-1/Akt pathway is neuroprotective in Huntington's disease and involves Huntingtin phosphorylation by Akt. *Dev Cell*, 2(6), 831-7.

Huynh DP, Figueroa K, Hoang N, Pulst SM (2000) Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human. *Nat Genet*, 26(1), 44-50.

Ikeda H, Yamaguchi M, Sugai S, Aze Y, Narumiya S, Kakizuka A (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet*, 13(2), 196-202.

Jung J, Bonini N (2007) CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science*, 315(5820), 1800-1.

Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, 39(3 Pt 2), 499-509.

Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S, Kakizuka A (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nature Genet*, 8, 221-228.

Kazantsev A, Walker HA, Slepko N, Bear JE, Preisinger E, Steffan JS et al (2002) A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nature Genet*, 30, 367-376.

Khalfan W, Ivanovska I, Rose MD (2000) Functional interaction between the PKC1 pathway and CDC31 network of SPB duplication genes. *Genetics*, 155(4), 1543-59.

Kim JH, Park KC, Chung SS, Bang O, Chung CH (2003) Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem*, 134(1), 9-18.

Klement IA, Skinner PJ, Kaytor MD, Yi H, Hersch SM, Clark HB, Zoghbi HY, Orr HT (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, 95, 41-53.

Krebs EG, Beavo JA (1979) Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem*, 48, 923-59.

Kuhlbrodt K, Mouysset J, Hoppe T (2005) Orchestra for assembly and fate of polyubiquitin chains. *Essays Biochem*, 41, 1-14.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-5.

LaFevre-Bernt MA, Ellerby LM (2003) Kennedy's disease. Phosphorylation of the polyglutamine-expanded form of androgen receptor regulates its cleavage by caspase-3 and enhances cell death. *J Biol Chem*, 278(37), 34918-24.

Li F, Macfarlan T, Pittman RN, Chakravarti D (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, 277, 45004-45012.

Lieberman DN, Mody (1999) Casein kinase-II regulates NMDA channel function in hippocampal neurons. *Nat Neurosci*, 2(2), 125-32.

Lim J, Hao T, Shaw C, Patel AJ, Szabó G, Rual JF, Fisk CJ, Li N, Smolyar A, Hill DE, Barabási AL, Vidal M, Zoghbi HY (2006) A protein-protein interaction network for human inherited ataxias and disorders of Purkinje cell degeneration. *Cell*, 125(4), 645-7.

Lin CH, Yeh SH, Lin CH, Lu KT, Leu TH, Chang WC, Gean PW (2001) A role for the PI-3 kinase signaling pathway in fear conditioning and synaptic plasticity in the amygdala. *Neuron*, 31(5), 671-4.

Lindberg RA, Quinn AM, Hunter T (1992) Dual-specificity protein kinases: will any hydroxyl do? *Trends Biochem Sci*, 17(3), 114-9.

Liu WS, Heckman CA (1998) The sevenfold way of PKC regulation. *Cell Signal*, 10(8), 529-42.

Lommel L, Ortolan T, Chen L, Madura K, Sweder KS (2002) Proteolysis of a nucleotide excision repair protein by the 26 S proteasome. *Curr Genet*, 42(1), 9-20.

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-34.

Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, Polo S, Hodsdon ME, De Camilli P (2005) Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(36), 12700-5.

Maruyama H, Izumi Y, Morino H, Oda M, Toji H, Nakamura S, Kawakami H (2002) Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet*, 114(5), 578-83.

McCampbell A, Taylor JP, Taye AA, Robitschek J, Li M, Walcott J, Merry D, Chai Y, Paulson H, Sobue G, Fischbeck KH (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, 9(14), 2197-202.

Menalled LB, Sison JD, Wu Y, Olivieri M, Li XJ, Li H, Zeitlin S, Chesselet MF (2002) Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci*, 22(18), 8266-76.

Mochly-Rosen D, Khaner H, Lopez J, Smith BL (1991) Intracellular receptors for activated protein kinase C. Identification of a binding site for the enzyme. *J Biol Chem*, 266(23), 14866-8.

Mosbacher S (2007) Charakterisierung 14-3-3zeta homologer Gene und deren Bedeutung für die Parkinson'sche Erkrankung. Dissertation, Eberhard Karls Universität Tübingen.

Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972) Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology*, 22(1), 49-55.

Newmeyer DD, Forbes DJ (1988) Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. *Cell*, 52(5), 641-53.

Nestler EJ, Greengard P (1999) Protein Phosphorylation is of Fundamental Importance in Biological Regulation. American Society for Neurochemistry, Basic Neurochemistry Molecular, Cellular and Medical Aspects Sixth Edition.

Nicastro G, Menon RP, Masino L, Knowles PP, McDonald NQ, Pastore A (2005) The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(30), 10493-8

Okamura-Oho Y, Miyashita T, Nagao K, Shima S, Ogata Y, Katada T, Nishina H, Yamada M (2003) Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein is phosphorylated by c-Jun NH2-terminal kinase. *Hum Mol Genet*, 12(13), 1535-42.

Ordway JM, Tallaksen-Greene S, Gutekunst CA, Bernstein EM, Cearley JA, Wiener HW, Dure LS 4th, Lindsey R, Hersch SM, Jope RS, Albin RL, Detloff PJ (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, 91(6), 753-63.

Ortolan TG, Chen L, Tongaonkar P, Madura K (2004) Rad23 stabilizes Rad4 from degradation by the Ub/proteasome pathway. *Nucleic Acids Res*, 32(22), 6490-500. Print 2004.

Patwardhan P, Miller WT (2007) Processive phosphorylation: mechanism and biological importance. *Cell Signal*, 11, 2218-26.

Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN (1997) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, 19, 333-344.

Paulson HL, Das SS, Crino PB, Perez MK, Patel SC, Gotsdiner D, Fischbeck KH, Pittman RN (1997b) Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, 41(4), 453-62.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev*, 22(2), 153-83.

Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM, Pittman RN (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol*, 143(6), 1457-70.

Perez MK, Paulson HL, Pittman RN (1999) Ataxin-3 with an altered conformation that exposes the polyglutamine domain is associated with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet*, 8(13), 2377-85.

Perutz MF, Johnson T, Suzuki M, Finch JT (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(12), 5355-8.

Peters MF, Nucifora FC Jr, Kushi J, Seaman HC, Cooper JK, Herring WJ, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (1999) Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci*, 14(2), 121-8.

Raasi S, Pickart CM (2003) Rad23 ubiquitin-associated domains (UBA) inhibit 26 S proteasome-catalyzed proteolysis by sequestering lysine 48-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem*, 278(11), 8951-9.

Richardson WD, Mills AD, Dilworth SM, Laskey RA, Dingwall C (1988) Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell*, 52(5), 655-64.

Rubinsztein DC (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, 18(4), 202-9.

Saudou F, Finkbeiner S, Devys D, Greenberg ME (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, 95(1), 55-66.

Scheel H, Tomiuk S, Hofmann K (2003) Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, 12(21), 2845-52.

Scherzinger E, Lurz R, Turmaine M, Mangiarini L, Hollenbach B, Hasenbank R, Bates GP, Davies SW, Lehrach H, Wanker EE (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, 90(3), 549-58.

Schmitt I, Brattig T, Gossen M, Riess O (1997) Characterization of the rat spinocerebellar ataxia type 3 gene. *Neurogenetics*, 1(2), 103-12.

Seilhean D, Takahashi J, El Hachimi KH, Fujigasaki H, Lebre AS, Biancalana V, Dürr A, Salachas F, Hogenhuis J, de Thé H, Hauw JJ, Meininger V, Brice A, Duyckaerts C (2004) Amyotrophic lateral sclerosis with neuronal intranuclear protein inclusions. *Acta Neuropathol*, 108(1), 81-7.

Sinden RR. (1999) Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats *Am J Hum Genet*, 64(2), 346-53.

Sisodia SS (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell*, 95(1), 41-53.

Soto C (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, 4(1), 49-60.

Staudinger J, Zhou J, Burgess R, Elledge SJ, Olson EN (1995) PICK1: a perinuclear binding protein and substrate for protein kinase C isolated by the yeast two-hybrid system. *J Cell Biol*, 128(3), 263-71.

Tait D, Riccio M, Sittler A, Scherzinger E, Santi S, Ognibene A, Maraldi NM, Lehrach H, Wanker EE (1998) Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet*, 7(6), 991-7.

Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, 296(5575), 1991-5.

Taylor SS, Zheng J, Radzio-Andzelm E, Knighton DR, Ten Eyck LF, Sowadski JM, Herberg FW, Yonemoto WM (1993) cAMP-dependent protein kinase defines a family of enzymes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 340(1293), 315-24.

Tobin AJ, Signer ER (2000) Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol*, 10(12), 531-6.

Trottier Y, Cancel G, An-Gourfinkel I, Lutz Y, Weber C, Brice A, Hirsch E, Mandel JL (1998) Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, 5(5), 335-47.

Tzvetkov N, Breuer P (2007) Josephin domain-containing proteins from a variety of species are active de-ubiquitination enzymes. *Biol Chem*, 388(9), 973-8.

Ubersax JA, Ferrell JE Jr. Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. (2007) *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 530-41.

Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S, Iwabuchi K (2001) Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol*, 102(2), 149-52.

Ujiki MB, Ding XZ, Salabat MR, Bentrem DJ, Golkar L, Milam B, Talamonti MS, Bell RH Jr, Iwamura T, Adrian TE (2006) Apigenin inhibits pancreatic cancer cell proliferation through G2/M cell cycle arrest. *Mol Cancer*, 5, 76.

Ulery PG, Nestler EJ (2007) Regulation of DeltaFosB transcriptional activity by Ser27 phosphorylation. *Eur J Neurosci*, 25(1), 224-30.

Ulloa L, Díaz-Nido J, Avila J (1994) Depletion of catalytic and regulatory subunits of protein kinase CK2 by antisense oligonucleotide treatment of neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol*, 14(5), 407-14.

Van Raamsdonk JM, Warby SC, Hayden MR (2007) Selective degeneration in YAC mouse models of Huntington disease. *Brain Res Bull*, 72(2-3), 124-31.

Walter J, Capell A, Grünberg J, Pesold B, Schindzielorz A, Prior R, Podlisny MB, Fraser P, Hyslop PS, Selkoe DJ, Haass C (1996) The Alzheimer's disease-associated presenilins are differentially phosphorylated proteins located predominantly within the endoplasmic reticulum. *Mol Med*, 2(6), 673-91.

Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG (1968) An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*, 243(13), 3763-5.

Wang Q, Li L, Ye Y (2006) Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *Cell Biol*, 174(7), 963-71.

Wang G, Sawai N, Kotliarova S, Kanazawa I, Nukina N (2000) Ataxin-3, the MJD1 gene product, interacts with the two human homologs of yeast DNA repair protein RAD23, HHR23A and HHR23B. *Hum Mol Genet*, 9(12), 1795-803.

Warrick JM, Chan HY, GrayBoard GL, Chai YH, Paulson HL, Bonini NM (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet*, 23, 425-428.

Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, Gordesky-Gold B, Faust LZ, Paulson HL, Bonini NM (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in *Drosophila* by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell*, 18(1), 37-48.

Watase K, Weeber EJ, Xu B, Antalffy B, Yuva-Paylor L, Hashimoto K, Kano M, Atkinson R, Sun Y, Armstrong DL, Sweatt JD, Orr HT, Paylor R, Zoghbi HY (2002) A long CAG repeat in the mouse *Sca1* locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*, 34(6), 905-19.

Weihl CC, Dalal S, Pestronk A, Hanson PI (2006) Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation. *Hum Mol Genet*, 15(2), 189-99.

Wójcik C, Yano M, DeMartino GN (2004) RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multicellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci*, 117(Pt 2), 281-92.

Woods, B. T., Schaumburg, H. H. (1972). Nigro-spino-dentatal degeneration with nuclear ophthalmoplegia: A unique and partially treatable clinicopathological entity. *J. Neurol. Sci.* 17: 149-166.

Yoo SY, Pennesi ME, Weeber EJ, Xu B, Atkinson R, Chen S, Armstrong DL, Wu SM, Sweatt JD, Zoghbi HY (2003) SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron*, 37(3), 383-401.

Zander C, Takahashi J, El Hachimi KH, Fujigasaki H, Albanese V, Lebre AS, Stevanin G, Duyckaerts C, Brice A (2001) Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genet*, 10(22), 2569-79.

Zhang S, Xu L, Lee J, Xu T (2002) Drosophila atrophin homolog functions as a transcriptional corepressor in multiple developmental processes. *Cell*, 108, 45-56.

Zhou XZ, Lu PJ, Wulf G, Lu KP (1999) Phosphorylation-dependent prolyl isomerization: a novel signaling regulatory mechanism. *Cell Mol Life Sci*, 56, 788-806.

Zhong X, Pittman RN (2006) Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet*, 15(16), 2409-20.

VII. Abkürzungsverzeichnis

ATXN3	Ataxin-3
BSA	Rinderserumalbumin
CAG	Glutamine
CBP	CREB binding protein
CHX	Cycloheximid
CK2	Casein-Kinase II
CREB	cAMP response element binding protein
CSM14.1:	Mesenzephalie Rattenzellen
DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
DMAT	2-Dimethylamino-4,5,6,7-Tetrabromo-1H-Benzimidazol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRPLA	dentatorubro-pallidoluysische Atrophie
DUB	Deubiquitinierendes Enzym
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
EZM	Extrazellulärmatrix
GPCR	G-Protein gekoppelte Rezeptoren
GST	Glutathion S-Transferase
HAT	Histon-Azetyltransferase
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen (<u>h</u> uman <u>e</u> mbrionic <u>k</u> idney)
His	Histidine
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactopyranosid
HD	Huntington'sche Krankheit
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MMP	Metalloproteinase
Min	Minute(n)
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NES	Nukleäres Export Signal

NLS	Nukleäres Lokalisierungssignal
NI	Neuronale Inklusionen
OA	Okadasäure
polyQ	Polyglutamin-Abschnitt
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT	Raumtemperatur
SBMA	spinobulbäre Muskelatrophie
SCA	Spinozerebelläre Ataxie
Sek	Sekunde
Std	Stunden
TATA	Bindestelle für Transkriptionsfaktoren / Histone
TBP	TATA Binding Protein
TIMP	tissue inhibitor of matrix metalloproteinases
Ubl	Ubiquitin-ähnliche Domäne
UIM	Ubiquitin interagierendes Motiv
ÜN	Übernacht
Upm	Umdrehung per Minute
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WB	Westernblot