
**Mechanismen der Ataxin-3 regulierten Gentranskription
bei der Spinozerebellären Ataxie Typ 3**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Julieta Peixoto Araújo

aus

Bonn

Bonn 2010

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

1. Gutachter: PD. Dr. rer. nat. Bernd Evert
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Hoch

Tag der Promotion: 03. September 2010

Erscheinungsjahr: 2010

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

I. Eidesstattliche Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 an der Klinik und Poliklinik für Neurologie, Abteilung Neurobiologie unter der Leitung von Herrn PD. Dr. rer. nat. Bernd Evert angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als angegebener Quellen angefertigt wurde. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind gemäß §6 der Promotionsordnung vom 07.01.2004 als solche kenntlich gemacht.

Bonn, den

Julieta Peixoto Araújo

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgender Originalpublikation veröffentlicht:

Araujo J, Breuer P, Pfeifer A, Klockgether T, Wüllner U and Evert BO (2010). Ataxin-3 coactivates the FOXO4-dependent oxidative stress response. J. Neurosci. (submitted)

Weitere Publikationen:

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.

Konferenzen:

Poster: "Profiling of ataxin-3 interacting transcription factors". Neuroscience Meeting 2007 in San Diego, USA

Poster: "Ataxin-3 interacting transcription factors and implications for disease pathogenesis". EUROSCA final Meeting 2008 in Mallorca, Spanien

Poster: "The interaction of Ataxin-3 with FOXO4 and its implication for disease pathogenesis". The 8th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2009, Deutschland

Invited Poster: "ATXN3 cooperates in the FOXO4-dependent oxidative stress response". 3rd Ataxia Investigators' Meeting - In Conjunction with the 2010 Annual Meeting of the National Ataxia Foundation in Chicago, USA

Dedicado aos meus pais e ao meu amor

II. INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Polyglutamin-Krankheiten	1
1.1.1. Klinische und molekulare Charakteristiken.....	1
1.1.2. Aggregation – der Pathomechanismus der PolyQ-Krankheiten?	3
1.1.3. Transkriptionelle Dysregulation bei PolyQ-Krankheiten	4
1.2. Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)	7
1.3. Ataxin-3	8
1.3.1. Charakteristiken des <i>Machado-Joseph-Disease</i> -Gens.....	8
1.3.2. Struktur, posttranslationale Modifikation, Expression und Lokalisation des <i>MJD</i> -Genprodukts ATXN3	10
1.3.3. Funktionen von ATXN3.....	12
1.3.3.1. ATXN3 ist ein deubiquitinierendes Enzym (DUB).....	12
1.3.3.2. ATXN3 reguliert mit VCP und Rad23 die Retrotranslokation von ERAD-Substraten .	14
1.3.3.3. ATXN3 kontrolliert die Proteinqualität über Aggresome	16
1.3.3.4. Ataxin-3 und seine Rolle bei der Transkription.....	16
1.4. FOXO4	18
1.4.1. FOXO4, ein FOX-Protein der Klasse O	18
1.4.2. Signalwege zur Regulation von FOXO4	19
1.5. Zielsetzung	20
2. MATERIAL.....	22
2.1. Chemikalien	22
2.2. Verbrauchsmaterialien	22
2.3. Geräte	22
2.4. Längenstandards.....	24

2.5. Kits	24
2.6. Reagenzien	24
2.7. Radioaktive Reagenzien	25
2.8. Puffer und Lösungen	25
2.9. Enzyme und fertige Puffer	27
2.10. Oligonukleotide	28
2.10.1. EMSA-Oligonukleotide.....	28
2.10.2. Oligonukleotide für RT- und quantitative PCR	28
2.10.3. Sequenzierungsoligonukleotide	29
2.10.4. Klonierungsoligonukleotide.....	29
2.11. Antikörper	30
2.11.1. Primärantikörper	30
2.11.2. konjugierte Sekundärantikörper.....	31
2.12. Vektoren	31
2.12.1. Leervektoren	31
2.12.2. Zur Verfügung gestellte fertige Konstrukte.....	32
2.12.3. Hergestellte Konstrukte	33
2.13. Organismen und Gewebeproben	34
2.13.1. <i>E. coli</i> Stämme.....	34
2.13.2. Zelllinien	34
2.13.3. Gewebeproben	35
2.14. Medien für die Kultivierung von Bakterien	35
2.15. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	36
2.15.1. Medienzusammensetzung der einzelnen Zelllinien	36
3. METHODEN	37
3.1. Molekularbiologische Methoden	37
3.1.1. Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien.....	37
3.1.2. Plasmid-DNA Isolierung aus <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab	37
3.1.3. DNA-Analyse.....	37
3.1.3.1. Agarosegelelektrophorese.....	37

3.1.3.2.	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von gereinigter DNA..	38
3.1.4.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
3.1.4.1.	Klonierungs-PCR	38
3.1.4.2.	Kolonie-PCR	39
3.1.5.	Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese	39
3.1.6.	Klonierung von DNA-Fragmenten	40
3.1.6.1.	Enzymatische Spaltung von Vektor-DNA bzw. DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen	40
3.1.6.2.	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	40
3.1.6.3.	Ligation eines DNA-Fragments mit einem Vektor	40
3.1.6.4.	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien	41
3.1.6.5.	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	41
3.1.7.	Zielgerichtete Mutagenese	41
3.1.8.	DNA-Sequenzierung	42
3.1.9.	RNA Isolierung und cDNA Synthese	42
3.1.10.	Quantitative real-time PCR (qPCR)	43
3.2.	Zellkultur	44
3.2.1.	Isolierung von Lymphozyten aus humanen Blutproben und Immortalisierung mit Epstein Barr Virus (EBV)	44
3.2.1.1.	Fluoreszente Durchflusszytometrie der lymphoblastoiden B-Zellen	44
3.2.2.	Kultivierung von Suspensionskulturen	45
3.2.3.	Kultivierung von adhärenenten Zellen	45
3.2.4.	Bestimmung der Zellzahl	45
3.2.5.	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen	46
3.2.6.	Transfektion von HeLa-Zellen	46
3.2.7.	Infektion von LCLs mit shRNA lentiviralen Partikeln	46
3.2.8.	Immunfluoreszenz und alkalische Phosphatase (AP) Färbung an HeLa-Zellen und Gewebeschnitten	46
3.2.9.	H ₂ O ₂ -Behandlung von Zellen	47
3.2.10.	Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in LCL-Zellen	47
3.2.11.	Vitalitätstest	48
3.2.12.	Reportergenanalysen	48
3.3.	Proteinbiochemische Methoden	49
3.3.1.	Proteinlysate	49
3.3.1.1.	Gesamtzelllysate mit RIPA-Lysispuffer	49
3.3.1.2.	Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionierung von Proteinen (nach BioTechniques, 2001)	49

3.3.2.	Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford <i>et al.</i> , 1976)	50
3.3.3.	Koimmunpräzipitation (IP)	50
3.3.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	51
3.3.5.	Coomassie-Brilliant-Blau Färbung	51
3.3.6.	Western-Blot	52
3.3.7.	Ponceau S Färbung.....	52
3.3.8.	Immundetektion mittels Chemilumineszenz.....	52
3.3.9.	Rekombinante Proteinexpression	53
3.3.9.1.	Expression und Aufreinigung von GST-ATXN3-Fusionsproteinen	53
3.3.9.2.	Expression und Aufreinigung von His-FOXO4-Fusionsproteinen	54
3.3.9.3.	Dialyse von aufgereinigtem rekombinatem Protein.....	54
3.3.9.4.	Proteinkonzentrationsbestimmung für rekombinante Proteine	54
3.3.9.5.	Proteinpräzipitation über GST-Epitope (GST-Pulldown)	55
3.3.9.6.	Protein <i>in vitro</i> Interaktion	55
3.4.	Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor Interaktionsarray.....	56
3.4.1.	Nukleäre Extraktion	56
3.4.2.	Sondenbindung an die Proteinkomplexe (nach TF-TF TranSignal™ Interaction Arrays von Panomics)	56
3.4.3.	Immunpräzipitation (IP) von DNA/ Proteinkomplexen (nach TF-TF TranSignal™ Interaction Arrays von Panomics)	56
3.4.4.	Hybridisierung mit den Arraymembranen	57
3.4.5.	Analyse der Dotblots	57
3.5.	“Electrophoretic Mobility Shift Assay” (EMSA)	58
3.5.1.	Radioaktive Sondenherstellung	58
3.5.2.	Native Gelelektrophorese (colourless native – PAGE).....	59
3.6.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	60
3.6.1.	Chromatinpräparation aus LCL-Zelllinien	60
3.6.2.	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP).....	60
3.6.3.	Quantitative PCR zur Analyse der ATXN3 Proteinbindung am <i>SOD2</i> -Promotor	60
4.	ERGEBNISSE	61
4.1.	Suche nach ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren	61
4.1.1.	Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarray	61
4.1.1.1.	Überprüfen und Herstellen geeigneter nukleärer Extrakte für den Interaktionsarray	61

4.1.1.2.	Dotblotanalyse	63
4.1.2.	Überprüfen der DNA/ Proteinkomplexbildung mittels EMSA	66
4.1.3.	Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1	69
4.1.3.1.	Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1 in CSM14.1- und HeLa-Zellen	69
4.1.3.2.	Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1 in humanem <i>Pons</i> eines Kontroll- und SCA3-Patienten	71
4.1.4.	Analyse der Proteininteraktion durch GST-Pulldown-Experimente	73
4.1.5.	Physiologische und PolyQ-unabhängige Interaktion von FOXO4 und ATXN3.....	76
4.1.6.	<i>In vitro</i> Interaktion von GST-ATXN3 und N-terminalem His-FOXO4	78
4.1.7.	Nukleär lokalisiertes FOXO4 kolokalisiert mit ATXN3	79
4.2.	Funktionelle Analyse der Interaktion von FOXO4 und ATXN3	81
4.2.1.	Reportergenanalysen	81
4.2.2.	<i>SOD2</i> -Expression in humanen Pongewebe von Kontroll- und SCA3-Patienten	84
4.2.3.	Herstellung von EBV-immortalisierten humanen lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von Kontroll- und SCA3-Patienten	85
4.2.4.	<i>SOD2</i> -Expression in humanen lymphoblastoiden Zellen (LCLs) von Kontroll- und SCA3-Patienten.....	87
4.2.5.	Knockdown von ATXN3 durch RNA-Interferenz in LCLs	89
4.2.6.	ATXN3 bindet an den humanen <i>SOD2</i> -Genpromotor	90
4.2.7.	SCA3-LCLs besitzen erhöhte Spiegel endogener reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)	92
4.2.8.	Oxidativer Stress als Stimulus zur Aktivierung der <i>SOD2</i> -Expression über FOXO4 und ATXN3	94
4.2.8.1.	Nukleäre Translokation von FOXO4 und ATXN3 korreliert mit erhöhter <i>SOD2</i> -Expression in HeLa-Zellen nach H ₂ O ₂ -Behandlung	94
4.2.8.2.	H ₂ O ₂ -Behandlung führt zu erhöhter <i>SOD2</i> -Gen- und Proteinexpression in Kontroll-LCLs, nicht aber in SCA3-LCLs.....	95
4.2.9.	Verringerte Viabilität von SCA3-LCLs bei oxidativem Stress.....	96
5.	DISKUSSION	98
5.1.	ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren	99
5.2.	Expression und Lokalisation der ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren.....	100
5.3.	ATXN3 verstärkt die Transkription FOXO4-abhängiger Gene	102
5.4.	ATXN3 als Regulator der <i>SOD2</i> -Expression	104
5.5.	Oxidativer Stress induziert die <i>SOD2</i> -Transkription über FOXO4 und ATXN3	106

5.6.	Modell der ATXN3-aktivierten, FOXO4-abhängigen <i>SOD2</i> -Gentranskription	107
5.7.	FOXO-Transkriptionsfaktoren und oxidativer Stress bei neurodegenerativen Krankheiten	109
5.8.	Ausblick	110
6.	ZUSAMMENFASSUNG	112
7.	REFERENZEN	113
7.1.	Literatur	113
7.2.	Websites	128
8.	VERZEICHNISSE.....	129
8.1.	Abbildungsverzeichnis	129
8.2.	Tabellenverzeichnis	131
8.3.	Abkürzungsverzeichnis	132
9.	ANHANG.....	135
9.1.	Nukleotidsequenzen	135
9.1.1.	ATXN3Q23 cDNA.....	135
9.1.2.	ATXN3Q70 cDNA.....	136
9.1.3.	FOXO4 cDNA	136

1. EINLEITUNG

1.1. Polyglutamin-Krankheiten

Polyglutamin (PolyQ)-Krankheiten sind eine Gruppe überwiegend dominant vererbter, neurodegenerativer Krankheiten, die durch eine pathologische Verlängerung von CAG-Trinukleotid-Wiederholungen (CAG-Repeats) im kodierenden Bereich eines Gens hervorgerufen werden. Diese CAG-Repeats führen zur Bildung verlängerter PolyQ-Abschnitte im jeweiligen Protein. Der PolyQ-Abschnitt stellt die einzige strukturelle Übereinstimmung der mutierten Proteine dar. Die Entstehung der pathologischen Expansion ist bislang nicht eindeutig geklärt. In einfachen Organismen werden sie durch „Slippage“ (Verrutschen) der DNA-Polymerase während der Replikation, durch homologe Rekombination, Genkonversion oder DNA-Reparaturmechanismen erzeugt (Sinden *et al.*, 1999). In Säugerkeimzellen scheint die Verlängerung während der Exzisionsreparatur zu entstehen (Kovtun & McMurray, 2001). Bislang sind neun PolyQ-Krankheiten bekannt: die Huntington'sche Krankheit (HD), die spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA), die dentatorubropallidoluysische Atrophie (DRPLA) sowie sechs spinozerebelläre Ataxien (SCA1, 2, 3, 6, 7, 17) (Bauer & Nukina, 2009).

1.1.1. Klinische und molekulare Charakteristiken

Auch wenn die Krankheitsbilder der einzelnen PolyQ-Krankheiten sehr unterschiedlich sind, gibt es doch einige Gemeinsamkeiten. Sie zeichnen sich durch einen späten Erkrankungsbeginn und eine konstante Progression der Erkrankungssymptome aus. Diese setzen umso früher ein und sind umso gravierender, je länger das CAG-Repeat ist. Das Phänomen der Antizipation ist ein gemeinsames Charakteristikum der PolyQ-Krankheiten, bei dem die nachfolgende Generation durch eine erhöhte Anzahl an CAG-Repeats früher erkrankt und schwerere Symptome erleidet (Schöls *et al.*, 2004).

Die CAG-Repeat-Verlängerung scheint weder die Transkription noch die Translation der verschiedenen Gene bzw. Proteine zu beeinflussen, da deren Expressionslevels unverändert bleiben. Sowohl normale als auch mutierte Allele bzw. Proteine werden gleichermaßen exprimiert. Trotz der ubiquitären Expression der PolyQ-Proteine im zentralen Nervensystem, sind nur bestimmte Nervenzelltypen betroffen. Die jeweilige spezifische Vulnerabilität der betroffenen neuronalen Subtypen und somit auch der Hirnareale wird dem proteinspezifischen Kontext des PolyQ-Abschnittes zugeschrieben.

Es sind keine Patientenfälle von HD, SBMA, DRPLA, SCA1-3 oder 7 bekannt, die durch Deletionen oder Punktmutationen hervorgerufen werden. Die Erkrankungen scheinen daher nicht auf einen primären Funktionsverlust, eine Haploinsuffizienz oder einem dominant negativen Effekt zurückzuführen zu sein, sondern vielmehr auf einen Funktionsgewinn. Diese Annahme kann durch Mausmodelle unterstützt, aber auch in Frage gestellt werden. So zeigt zum Beispiel die homozygote Ataxin-3 (ATXN3) Knockout-Maus keinen neurologischen Phänotyp (Schmitt *et al.*, 2007), während der Knockout vom *Huntingtin-(Htt)*-Homolog in der Maus zur embryonalen Letalität und dessen Verlust im adulten Stadium zu einem progressiven neurodegenerativen Phänotyp führt (Dragatsis *et al.*, 2000).

Für den Funktionsgewinn spricht die Tatsache, dass expandiertes PolyQ-Protein in *Drosophila melanogaster* Neurodegeneration erzeugt, obwohl es kein funktionelles Homolog in dieser Spezies gibt. So entsteht z. B. durch die Überexpression des humanen, expandierten Androgenrezeptors (AR) androgenabhängig Neurodegeneration in den Neuronen der Photorezeptoren des *Drosophila*-Auges (Takeyama *et al.*, 2002).

Der Funktionsgewinn kann auch in einem Funktionsverlust enden, wenn die neu erworbene schädigende Funktion der expandierten Krankheitsproteine z. B. durch Sequestrierung in Einschlusskörperchen (Inklusionen, s. 1.1.1) einen Funktionsverlust des normalen Proteins zur Folge hat (Uchihara *et al.*, 2001; Haacke *et al.*, 2006).

1.1.2. Aggregation – der Pathomechanismus der PolyQ-Krankheiten?

Das auffälligste pathologische Merkmal der PolyQ-Krankheiten ist die Akkumulation der mutierten unlöslichen Proteine als meist nukleäre oder aber auch zytoplasmatische Inklusionen in den betroffenen Neuronen (Davies *et al.*, 1997; DiFiglia *et al.*, 1997; Bauer & Nukina, 2009). Als Inklusionen bezeichnet man Einschlusskörperchen in einer Zelle, in denen sich die jeweiligen verlängerten PolyQ-Proteine sammeln. Ihre Rolle in der Pathogenese der PolyQ-Krankheiten wird kontrovers diskutiert. In den letzten Jahren wurde jedoch postuliert, dass oligomere Zusammenschlüsse wie Protofibrillen und Mikroaggregate die Toxizität verursachen und dass große Aggregate durch das Abfangen der mutierten Proteine auch neuroprotektiv wirken können (Saudou *et al.*, 1998; Arrasate *et al.*, 2004).

Die Ursache der Oligomerisierung ist eine Konformationsänderung der Proteine, die durch die Verlängerung der PolyQ-Abschnitte oberhalb einer pathologischen Grenze von mehr als 36-40 Glutaminen bewirkt wird. Diese Fehlfaltung führt zu einer Art polarem Reißverschluss (Zipper), bei dem die verlängerte Proteinform eine antiparallele β -Faltblattstruktur aufweist und amyloide Fibrillen ausbildet (Perutz *et al.*, 1994 und 1996; Scherzinger *et al.*, 1997). Es konnte gezeigt werden, dass mutiertes PolyQ-Protein (in diesem Beispiel N-terminales Htt-Fragment) mit β -Faltblattstruktur in primären Neuronen Aggregation und Toxizität hervorruft, während ein analoges Protein, das keine β -Faltblattstruktur mehr ausbilden kann, nicht mehr aggregiert und auch nicht mehr toxisch wirkt (Poirier *et al.*, 2005).

Über die Auswirkung der PolyQ-Aggregate liegen widersprüchliche Daten vor. So korreliert die Bildung von Aggregaten nicht immer mit dem neuronalen Zelltod, da beides auch unabhängig voneinander auftreten kann (Lunkes & Mandel, 1998; Reddy *et al.*, 1998; Becher *et al.*, 1998; Warrick *et al.*, 1999; Koyano *et al.*, 2002). So führt zum Beispiel die Deletion der Selbstassoziationsregion von Ataxin-1 (ATXN1) im transgenen Mausmodell nicht zu nukleären Inklusionen (NI), wohl aber zur Entwicklung eines neurologischen Phänotyps (Klement *et al.*, 1998). Ähnliches wurde auch für ein SCA3-Mausmodell beschrieben, bei dem hemizygot transgene SCA3-Mäuse mit einem Jahr keine NI aufweisen, jedoch neurologische Symptome entwickelten (Boy *et al.*, 2010). Dagegen zeigt ein transgenes SCA3-YAC (yeast artificial chromosome)-Mausmodell

nach vier Wochen nur leichte neurologische Symptome, dafür bilden sich aber NI (Cemal *et al.*, 2002). Diese Unterschiede könnten jedoch auch auf den verwendeten Promotor zurückzuführen sein. Bei der transgenen SCA3-Maus von Boy *et al.* (2010) wurde ein Prion-Promotor und bei der transgenen SCA3-Maus von Cemal *et al.* (2002) der endogene ATXN3-Promotor zur Expression des Transgens eingesetzt.

Ein wichtiges Argument für den Beitrag der Aggregate zur Pathogenese ist, dass sie nicht nur mutierte PolyQ-Proteine beinhalten, sondern auch zahlreiche zelluläre Proteine rekrutieren, wie z. B. Transkriptionsfaktoren und Teile des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Chai *et al.*, 2002; Donaldson *et al.*, 2003). Durch die Aggregate können somit essentielle Proteine depletiert und zelluläre Prozesse gestört werden.

1.1.3. Transkriptionelle Dysregulation bei PolyQ-Krankheiten

Sieben der neun PolyQ-Krankheitsproteine sind entweder direkt oder indirekt an transkriptionellen Vorgängen beteiligt (s. Tabelle 1.1; Riley & Orr, 2006; Helmlinger *et al.*, 2006). Dabei sind das TATA-Bindungsprotein (TBP) bei der SCA17 und der Androgenrezeptor (AR) bei der SBMA selbst Transkriptionsfaktoren, während die anderen fünf PolyQ-Proteine (Ataxin-1, 3, 7, Atrophin-1, Huntingtin) durch Bindung an Transkriptionsregulatoren die Transkription beeinflussen können.

TBP ist ein genereller Transkriptionsfaktor, der von allen drei RNA-Polymerasen benötigt wird. Sein DNA-Bindungsmotiv, die TATA-Box, kommt in vielen eukaryotischen Genpromotoren vor. Als Untereinheit des makromolekularen Transkriptionsfaktor II D (TFIID)-Komplexes, ist TBP wiederum Teil des RNA-Polymerase-II-Präinitiationskomplexes, der für den Beginn der Transkription fast aller Gene in einer eukaryotischen Zelle notwendig ist. Inwiefern die physiologische Funktion von TBP bei der Transkriptionsinitiation durch die Verlängerung des CAG-Repeats verändert wird, ist bislang nicht bekannt. Es konnte jedoch eine selektive Veränderung der neuronalen Genexpression festgestellt werden. Beispielsweise ist die Transkription des Tyrosinkinase-A-Rezeptors (TrkA), dem Rezeptor für den Nervenwachstumsfaktor (NGF), im *Zerebellum* von transgenen TBP-Mäusen vermindert. TrkA ist wichtig für die neuronale Differenzierung und das neuronale Überleben und könnte somit die selektive Neurodegeneration bei der SCA17 erklären (Shah *et al.*, 2009).

Erkrankung	Protein	PolyQ-Länge		Putative Funktion
		normal	pathogen	
SBMA	Androgenrezeptor (AR)	9-36	38-62	Steroidhormonrezeptor
HD	Huntingtin (HTT)	6-35	36-121	Signaltransduktion, Proteinfaltung, Transport, Transkription
SCA1	Ataxin-1 (ATXN1)	6-39	41-83	Transkription
SCA2	Ataxin-2 (ATXN2)	14-32	34-77	RNA-Metabolismus
SCA3	Ataxin-3 (ATXN3)	12-40	62-86	Deubiquitinase, Transkription
SCA6	Spannungsabhängige Kalziumkanaluntereinheit α 1a (CACNA1A)	4-18	21-30	Kalziumsignaltransduktion
SCA7	Ataxin-7 (ATXN7)	7-18	38-200	Transkription
SCA17	TATA-Box Bindungsprotein (TBP)	25-43	45-63	Genereller Transkriptionsfaktor
DRPLA	Atrophin-1 (ATN1)	7-34	49-88	Transkription

Tabelle 1.1: Liste bekannter PolyQ-Krankheiten mit den jeweiligen Erkrankungsproteinen, den normalen und pathogenen PolyQ-Repeat-Längen, sowie den putativen Funktionen der einzelnen Proteine.

Der Androgenrezeptor (AR) ist ein Steroidhormonrezeptor, der durch das androgene Steroidhormon Testosteron bzw. Dihydrotestosteron aktiviert wird. Er sorgt beim Menschen während des gesamten Lebens für die Ausprägung des männlichen Erscheinungsbildes und Verhaltens. Da in SBMA-Tiermodellen durch eine Androgen-Entzugstherapie die neuronale Dysfunktion behoben werden kann, scheint die Hormonbindung an die Ligandenbindungsstelle des AR kritisch für die Pathogenese der Krankheit zu sein. Der Verlust der Motorneurone könnte somit im Zusammenhang mit der testosteroninduzierten Translokation und Akkumulation des mutierten AR im Zellkern stehen (Katsuno *et al.*, 2002; Takeyama *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2009).

Die restlichen fünf PolyQ-Proteine beeinflussen die Transkription durch Interaktion mit anderen Transkriptionsregulatoren bzw. Transkriptionsfaktoren. Diese Interaktion kann sowohl spezifisch für das jeweilige PolyQ-Protein sein, als auch PolyQ-abhängig bei mehreren PolyQ-Proteinen vorkommen. Expandierte PolyQ-Proteine rekrutieren die Interaktoren in zytoplasmatische oder nukleäre Inklusionen (Mitsui *et al.*, 2002; Doi *et al.*, 2008) und verändern dadurch die Genexpression.

Ataxin-7 (ATXN7) stellt in diesem Zusammenhang ein gutes Beispiel für die Hemmung eines spezifischen Interaktionspartners dar. Es ist eine Untereinheit des TFTC/ STAGA-Transkriptionskomplexes, dem TBP-freien TAF-enthaltenden SPT3/ TAF9/ GCN5-Azetyltransferase-Komplex. Der Komplex interagiert mit einem für Photorezeptoren spezifischen Aktivator, dem „cone-rod“ (Zäpfchen-Stäbchen)-Homöobox-Protein. Bei expandiertem ATXN7 wird das „cone-rod“-Homöobox-Protein in die ATXN7-Aggregate rekrutiert, was wiederum die Hemmung der Azetyltransferasefunktion des TFTC/STAGA-Komplexes zur Folge hat. Gene, die wichtig für die Retinafunktion sind, werden dadurch abgeschaltet und verursachen die ausschließlich bei der SCA7 auftretende Retinadegeneration (La Spada *et al.*, 2001; Palhan *et al.*, 2005).

Das CREB (cAMP response element binding protein)-Bindungsprotein (CBP) interagiert gleich mit mehreren PolyQ-Proteinen. Es enthält selbst 18 konsekutive Glutamine, über die homotypische Glutamin-Glutamin-Interaktionen mit PolyQ-Proteinen entstehen können und ist zusammen mit CREB ein Vermittler überlebenswichtiger Signale in Neuronen (Walton & Dragunow, 2000). Über seine Histonazetyltransferase (HAT)-Funktion ermöglicht CBP verschiedenen Transkriptionsfaktoren die Bindung an ihre entsprechenden DNA-Motive. Bei HD, DRPLA, SBMA, SCA3 sowie SCA7 kolokalisiert CBP mit den NI und es wurden deutlich geringere Mengen löslichen CBPs nachgewiesen (McCampbell *et al.*, 2000; Nucifora *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2002; Ström *et al.*, 2005). Die Störung der CREB/ CBP-regulierten Genexpression könnte somit einen gemeinsamen Mechanismus der PolyQ-Krankheiten darstellen. Konditionelle Mausmodelle, bei denen CREB und dessen Homolog CREM postnatal ausgeschaltet wurden, zeigen eine progressive Neurodegeneration in *Hippocampus* und *Striatum* (Mantamadiotis *et al.*, 2002).

Neben CBP besitzen weitere Transkriptionsregulatoren glutaminreiche Aktivierungsdomänen, die die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren und die

Genregulation beeinflussen (Freiman & Tjian, 2002). So findet sich z. B. auch TBP in den NI humanen SCA1-, SCA2-, SCA3-, DRPLA- und HD-Hirngewebes (Perez *et al.*, 1998; Uchihara *et al.*, 2001, van Roon-Mom *et al.*, 2002).

1.2. Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3)

Ataxie ist ein Oberbegriff für verschiedene Störungen der Bewegungskoordination, deren Ursache das Sterben von Nervenzellen im Kleinhirn oder Rückenmark ist. Die Bezeichnung wird vom griechischen Wort „ataxia“ abgeleitet, was übersetzt „ohne Ordnung“ bedeutet. Die spinozerebellären Ataxien (SCAs) werden autosomal dominant vererbt. Die spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist die weltweit häufigste Form mit einer Prävalenz von 1:100.000. Erstmals wurde die SCA3 unter den Namen Machado- und Joseph-Krankheit beschrieben (Nakano *et al.*, 1972; Rosenberg *et al.*, 1976), woraus dann der Begriff Machado-Joseph-Krankheit resultierte. Beide Namen stammen von portugiesischen Großfamilien, die von den Azoren abstammen und an SCA3 erkrankten.

Bei den meisten SCA3-Patienten beginnt die Erkrankung im mittleren Lebensalter zwischen 30 und 40 Jahren und äußert sich durch unterschiedliche Symptome. Neben einer progressiven Ataxie mit Gang- und Standunsicherheit können Ophthalmoplegie, die Lähmung der Augenbewegung, und medizinische Pyramidenbahnzeichen auftreten. Weitere Symptome der Erkrankung sind Sprachstörungen, Polyneuropathie (Erkrankung des peripheren Nervensystems) und Basalgangliensymptomatik (über das Ziel hinauschießende, am Ziel vorbei treffende Bewegungen, sowie die Zunahme des Zitterns der Gliedmaßen bei zielgerichteter Bewegung) (Dueñas *et al.*, 2006; Paulson *et al.*, 2007; Deutsche Heredo-Ataxie Gesellschaft e.V., <http://www.ataxie.de/sca3.0.html>). Die Symptome stehen im direkten Zusammenhang mit den pathologisch betroffenen Gehirnnarealen. Obwohl der Name der Erkrankung annehmen lässt, dass vornehmlich die Atrophie des Kleinhirns (*Zerebellum*) die Ursache ist, lassen die Symptome auch auf andere erkrankte Hirnnareale schließen. Neben den Kleinhirnkernen, insbesondere der grauen Substanz im *Pontozerebellum* (*Nucleus dentatus*), sind auch die Kerne des Hirnstammes (*Truncus cerebri*), sowie die der Schwarzen Substanz (*Substantia nigra*)

atrophiert. Es kommt zu einer Vergrößerung des vierten Hirnventrikels und außerdem sind die Basalganglien, das Rückenmark, sowie das periphere Nervensystem von der Krankheit betroffen (Paulson *et al.*, 2007; Deutsche Heredo-Ataxie Gesellschaft e.V., <http://www.ataxie.de/sca3.0.html>).

Die weit gefächerten Charakteristiken der SCA3 lassen sich auf die Dynamik der verursachenden Mutation zurückführen. Die von Kawaguchi *et al.* (1994) erstmals beschriebene Mutation der SCA3 ist die Verlängerung eines CAG-Trinukleotid-Repeats in Exon 10 des *MJD (Machado-Joseph-Disease)*- oder auch *ATXN3 (Ataxin-3)*-Gens. Diese kodiert einen verlängerten PolyQ-Abschnitt im C-Terminus des Ataxin-3 (ATXN3)-Proteins. Ein gesunder Mensch hat zwischen 12 und 40 CAG-Repeats während ein erkrankter Mensch zwischen 62 und 86 CAG-Repeats aufweist. Die CAG-Repeat-Länge kann bei paternaler Vererbung zunehmen (Riess *et al.*, 2008; Boy *et al.*, 2010). Das Phänomen der Antizipation kommt durch eine Repeat-Verlängerung während der Keimbahn-Transmission in Kombination mit der Nukleotid-Exzisionsreparatur zustande. Die Repeat-Länge korreliert mit dem Schweregrad der Erkrankung, ist invers zu dessen Einsetzen und zu 45-60% für die Variabilität des Erkrankungsbeginns verantwortlich (Paulson *et al.*, 2007; Riess *et al.*, 2008). Der klinische Phänotyp verschlimmert sich drastisch bei homozygoter Vererbung, was einen Gendosiseffekt nahe legt (Carvalho *et al.*, 2008).

1.3. Ataxin-3

1.3.1. Charakteristiken des *Machado-Joseph-Disease*-Gens

Das humane *Machado-Joseph-Disease (MJD)*- bzw. *Ataxin-3 (ATXN3)*-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 14 in der Region 14q24.3-q32.2 und umfasst 48070 Basenpaare (NG_008198.1 RefSeqGene, pubmed; Takiyama *et al.*, 1993). Es wird in 3' – 5' Richtung abgelesen und besteht aus insgesamt 13 Exons (1-6, 6a, 7-9, 9a, 10, 11). Bisher konnten 58 verschiedene Spleißvarianten des *MJD*-Transkripts identifiziert werden, die sich aus fünf alternativen Spleißmöglichkeiten einzeln oder in den

verschiedenen Kombinationen ergeben. In Blutproben von SCA3-Patienten und Kontrollen wurden 57 Varianten identifiziert, die höchst-wahrscheinlich 21 proteinkodierende mRNAs repräsentieren (Kawaguchi *et al.*, 1994; Goto *et al.*, 1997; Ichikawa *et al.*, 2001; Bettencourt *et al.*, 2010). Für vier mRNA-Varianten konnte eine ubiquitäre Expression in verschiedenen humanen Geweben, unter anderem in allen Gehirnregionen, nachgewiesen werden (Ichikawa *et al.*, 2001). Beim Vergleich von SCA3-Patienten und Kontrollen wurden keine unterschiedlichen mRNA-Expressionslevels gefunden. Eine Korrelation der Spleißvarianten oder ihrer Expressionslevels mit dem Schweregrad der Erkrankung oder der Repeat-Länge wurde zwar bisher nicht berichtet, kann jedoch aufgrund der Fülle an neuen Spleißvarianten nicht ausgeschlossen werden.

Spezies	Gen	Homologie (%)	
	Symbol	DNA	Protein
<i>Homo sapiens</i>	<i>MJD</i>		
vs. <i>Pan troglodytes</i>	<i>ATXN3</i>	98.9	99.0
vs. <i>Canis lupus familiaris</i>	<i>ATXN3</i>	95.9	93.2
vs. <i>Bos taurus</i>	<i>ATXN3</i>	95.5	92.7
vs. <i>Mus musculus</i>	<i>Atxn3</i>	87.0	88.1
vs. <i>Rattus norvegicus</i>	<i>Atxn3</i>	87.0	85.7
vs. <i>Gallus gallus</i>	<i>ATXN3</i>	80.1	79.1
vs. <i>Danio rerio</i>	<i>atxn3</i>	70.7	64.8
vs. <i>Caenorhabditis elegans</i>	<i>atx-3</i>	38.0	49.9
vs. <i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>AT3G54130</i>	38.9	46.6
vs. <i>Oryza sativa</i>	<i>Os01g0851400</i>	35.9	44.7

Tabelle 1.2: Homologe *MJD*-Gene in eukaryotischen Organismen mit Angabe der Gensymbole, sowie der Homologie (in %) von DNA und Proteinen im Vergleich zur humanen *MJD*-Sequenz.

Da das *MJD*-Gen hoch konserviert ist, existieren homologe Gene in verschiedenen Eukaryoten (s. Tabelle 1.2). Bei den aufgeführten Spezies weist die Josephin-Domäne im N-terminalen Bereich des Gens die höchste Homologie auf (s. Tabelle 1.2; Tzvetkov *et al.*, 2007). Interessanterweise findet sich der CAG-Trinukleotid-Abschnitt nur beim

Schimpanzen (*Pan troglodytes*), der Maus (*Mus musculus*), der Ratte (*Rattus norvegicus*) und dem Huhn (*Gallus gallus*). Eine Verlängerung des CAG-Repeat-Abschnittes konnte bei anderen Spezies nicht festgestellt werden (Limprasert *et al.*, 1996). Demzufolge ist die Nukleotid-Repeat-Verlängerung ein Mutationsmechanismus, der nur im humanen Genom beobachtet wurde. Generell sind Repeat-Verlängerungen auch in niedrigeren Organismen instabil. In *Drosophila melanogaster* erzeugt das Einbringen des humanen expandierten *MJD*-Gens in seinem genomischen Kontext in die Keimbahn eine Repeat-Instabilität (Jung & Bonini, 2007).

1.3.2. Struktur, posttranslationale Modifikation, Expression und Lokalisation des *MJD*-Genprodukts ATXN3

Das humane, nicht expandierte ATXN3-Protein weist ein Molekulargewicht von etwa 42kDa auf und vergrößert sich entsprechend durch die Verlängerung des PolyQ-Abschnittes. Strukturell ist ATXN3 zusammengesetzt aus einer konservierten, globulären N-terminalen Josephin-Domäne (JD) mit einer papainähnlichen Faltung (Mao *et al.*, 2005; Nicastro *et al.*, 2005) und einem eher unstrukturierten C-Terminus, der zwei α -helikale Ubiquitin-Interaktionsmotive (UIM), einen polymorphen PolyQ-Abschnitt sowie ein kurzes, variables Ende enthält (Masino *et al.*, 2003; 2004). Eine Spleißvariante von ATXN3 besitzt ein putatives drittes UIM am C-terminalen Ende (Goto *et al.*, 1997; s. Abbildung 1.1). Im nicht aggregierten Zustand zeigt der PolyQ-Abschnitt eine „random coiled“ Konformation, die nach Ausbildung haarnadelförmiger beta-Faltblattstrukturen und Anlagerung weiterer gefalteter Proteinmoleküle zur Bildung von Protofilamenten und fibrillären Aggregatstrukturen führt.

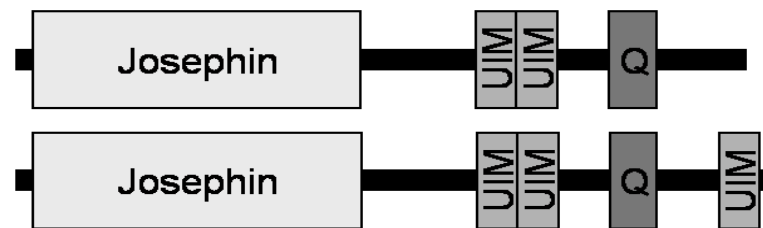


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der ATXN3-Proteinvarianten mit einer N-terminalen Josephin-Domäne (JD), zwei bzw. drei Ubiquitin-Interaktionsmotiven (UIM) und einem PolyQ-Abschnitt (Q).

Während in HeLa-Zellen verschiedene Proteinisoformen von ATXN3 nachgewiesen werden können, scheint es im Gehirn nur eine Isoform zu geben, wobei nicht sicher ist, um welche der beiden Proteinvarianten es sich handelt (s. Abbildung 1.1; Trottier *et al.*, 1998). Sowohl das normale als auch das mutierte ATXN3 werden in vergleichbaren Mengen ubiquitär in verschiedenen neuronalen Subpopulationen im humanen Gehirn exprimiert. Beispiele dafür sind die Purkinjezellen im *Zerebellum* oder die Pyramidenzellen im zerebellären *Kortex*, die bei der SCA3 keine Pathologie aufweisen (Paulson *et al.*, 1997b). Im Gegensatz dazu bilden die Neurone im ventralen *Pons* die für die SCA3 typischen NI und atrophieren (Paulson *et al.*, 1997a). Außerdem wird ATXN3 auch in den meisten nicht neuronalen Geweben exprimiert. Die selektive Toxizität trotz ubiquitärer Expression spricht dafür, dass zusätzliche zelltypspezifische Faktoren oder Umstände für die Erkrankung notwendig sind (Paulson *et al.*, 1997b).

ATXN3 ist hauptsächlich zytoplasmatisch, in Dendriten und Axonen, gelegentlich auch nukleär lokalisiert (Paulson *et al.*, 1997b). Zwei Stimuli, die zur Translokation von ATXN3 in den Nukleus führen, sind oxidativer und proteotoxischer Stress. Die Translokation bei dem proteotoxischen Stress Hitzeschock erfolgt jedoch erst nach Phosphorylierung an Serin 111 (S111) (Reina *et al.*, 2010). Außerdem kommt es zu einer nukleären Translokation von ATXN3 durch die Caseinkinase-II-vermittelte Phosphorylierung der Serine S236 und S340/S352 (Mueller *et al.*, 2009). Ferner besitzt ATXN3 funktionelle Lokalisierungssignale wie das konservierte C-terminale nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) und zwei N-terminale nukleäre Exportsignale (NES) (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009; Antony *et al.*, 2009). Außerdem kann ATXN3 auch indirekt über den nukleären

Exportkanal CRM1 (chromosome region maintenance1, exportin-1) ins Zytoplasma gelangen (Macedo-Ribeiro *et al.*, 2009).

Expandiertes ATXN3 ist hauptsächlich nukleär in unlöslichen NI betroffener Zellen lokalisiert (Paulson *et al.*, 1997a). Es wird weniger effizient aus dem Nukleus exportiert und aggregiert mit normalem ATXN3 in den NI (Chai *et al.*, 2002). Damit ist die nukleäre Lokalisation für die Pathogenese der SCA3-Krankheit sehr wahrscheinlich von großer Bedeutung. Transgene Mäuse, die ein mutiertes ATXN3 mit zusätzlichem NES exprimieren, zeigen mildere neurologische Symptome und bilden keine neuronalen NI (Bichelmeier *et al.*, 2007). Dementsprechend bewirkt die Phosphorylierung an S236 und S340/S352 eine erhöhte Bildung von NI (Mueller *et al.*, 2009), während die *in vitro* Phosphorylierung an S256 durch die Glykogensynthase-Kinase-3-beta zu einer verringerten Oligomerisierung des mutierten ATXN3 führt (Fei *et al.*, 2007). Hierbei ist jedoch nicht klar, ob diese einen nukleären Export bewirkt.

Wie zuvor schon erwähnt (s. 1.1.3) wird normales ATXN3 nicht nur von expandiertem ATXN3 in Inklusionen aggregiert, sondern auch von anderen PolyQ-Proteinen wie expandiertem ATXN1, ATXN2 und ATN1 (Perez *et al.*, 1998; Uchihara *et al.*, 2001). Daher wird angenommen, dass der Verlust der physiologischen Funktion von ATXN3 (s. 1.3.3) auch bei anderen neurodegenerativen Krankheiten von Bedeutung sein könnte.

1.3.3. Funktionen von ATXN3

1.3.3.1. ATXN3 ist ein deubiquitinierendes Enzym (DUB)

ATXN3 ist eine ubiquitinspezifische Cysteinprotease im Ubiquitin-Proteasom-System, die auch als Ubiquitinhydrolase bezeichnet wird (Scheel *et al.*, 2003; Albrecht *et al.*, 2004; Ries *et al.*, 2008). Das katalytische Zentrum wird aus der Triade mit Cystein 14, Histidin 119 und Asparagin 134 in der JD gebildet, das im Vergleich zu anderen Cysteinproteasen konstitutiv aktiv ist und keine kationeninduzierte Konformationsänderung zur Aktivierung benötigt (Nicastro *et al.*, 2005). ATXN3 spaltet *in vitro* präferenziell an Lysin 63 (K63) Bindungen in hochmolekularen Polyubiquitinketten oder polyubiquitinierten Substraten, wobei Ubiquitinkettendimere oder andere Arten von Ubiquitinkomplexen kein Problem darstellen. Die Mindestanzahl

an Ubiquitinen einer Kette, die von ATXN3 gebunden werden kann, sind vier, wobei die katalytische Aktivität ab einer Länge von fünf bis sechs Ubiquitinen beginnt. Ubiquitinketten werden über zwei aneinander angrenzende aber distinkte Ubiquitinbindungsstellen in der JD und den zwei oder drei UIM im C-Terminus von ATXN3 gebunden (Burnett *et al.*, 2003; Chai *et al.*, 2004; Nicastro *et al.*, 2009). Obwohl die UIM die katalytische Spezifität zu K63-Ubiquitinbindungen vermitteln, können dennoch K48-Ubiquitinbindungen mit geringerer Spezifität gespalten werden. Die katalytische Aktivität selbst wiederum ist UIM-unabhängig und kann durch Ubiquitinierung von ATXN3 verstärkt werden (Todi *et al.*, 2009). Darüber hinaus wird die deubiquitinierende Funktion von ATXN3 nicht von seinem PolyQ-Abschnitt beeinflusst (Masino *et al.*, 2004; Tzvetkov *et al.*, 2007). Eine katalytisch inaktive Form wird langsamer degradiert, ist im höheren Masse ubiquitiniert und hat höhere Proteinlevels in der Zelle als aktives ATXN3, während aktives ATXN3 eher im Nukleus nahe des Proteasoms lokalisiert (Todi *et al.*, 2007).

Insgesamt führen all diese Beobachtungen zur Annahme, dass ATXN3 eine Ubiquitinketten editierende Funktion besitzt und zum proteasomalen Abbau beiträgt, da polyubiquitinierte Proteine mit K48-vernetzten Tetraubiquitinketten dem proteasomalen Abbau zugeführt werden (Thrower *et al.*, 2000). ATXN3 könnte jedoch auch die Qualitätskontrolle bei der Bildung spezifisch verbundener Ubiquitinketten beeinflussen, z. B. durch Interaktion mit der ER-spezifischen E3-Ubiquitinligase Hrd1 (Wang *et al.*, 2006; Winborn *et al.*, 2008). Eine solche Bindung könnte jedoch auch zur Erhöhung der DUB-Aktivität von ATXN3 durch dessen eigene Ubiquitinierung führen (Todi *et al.*, 2009). Welche dieser Möglichkeiten der physiologischen Funktion am nächsten kommt, ist nicht geklärt. Dennoch scheint die Ubiquitineditierung wichtig für die PolyQ-Krankheiten zu sein. In *Drosophila* konnte gezeigt werden, dass die aktive UIM-abhängige, spezifische deubiquitinierende Funktion von ATXN3 nicht nur bei der SCA3, sondern auch bei der SCA1 und HD neuroprotektiv ist, solange das Ubiquitin-Proteasom-System funktioniert (Warrick *et al.*, 2005).

1.3.3.2. ATXN3 reguliert mit VCP und Rad23 die Retrotranslokation von ERAD-Substraten

Eine weitere Funktion von ATXN3 ergibt sich durch seine Bindung an das „valosin-containing“ Protein (VCP) (Kobayashi *et al.*, 2002; Doss-Pepe *et al.*, 2003). VCP ist das humane Homolog von p97 in *Xenopus laevis* und Mitglied einer konservierten AAA-ATPase Familie. Durch seine ATPase-Aktivität bindet es polyubiquitinierte Proteine. Die Bindung an ATXN3 ist ATP-unabhängig und verringert die Toxizität von expandiertem ATXN3 in *Drosophila* (Boeddrich *et al.*, 2006). Umgekehrt ist nicht eindeutig geklärt, ob die katalytische Aktivität von ATXN3 die Interaktion mit VCP/ p97 beeinflusst (Zhong & Pittman, 2006; Todi *et al.*, 2007). Eine Schlüsselfunktion von VCP ist es, Teil der Endoplasmatischen Retikulum-assoziierten Degradation (ERAD) zu sein, einem in Eukaryoten konservierten Qualitätskontrollmechanismus zur Erhaltung des Gleichgewichts im ER. Hierbei retrotransloziert VCP fehlgefaltete Proteine aus dem ER ins Zytoplasma zum dortigen proteasomalen Abbau. VCP scheint jedoch keinen stabilen Komplex mit dem Ubiquitin-Proteasom-System aufzubauen (Dai *et al.*, 2001). ATXN3 greift bei diesem Prozess durch die Bindung an VCP regulierend ein. In welche Richtung ATXN3 die retrograde Translokation von Substraten aus dem ER reguliert, wird unterschiedlich dargestellt. Zhong und Pittman (2006) beschrieben bereits, dass die Überexpression von ATXN3 zur Erhöhung der zellulären Levels von CD3 δ und TCR α , zweier membrangebundener Substrate der ERAD, führt. Die Bindung von ATXN3 an VCP, soll dessen Bindung an Ufd1 (ubiquitin fusion degradation protein 1) destabilisieren. Ufd1 ist Teil eines Komplexes, der zur Extraktion von Substraten aus dem ER notwendig ist. Auf diese Weise soll ATXN3 die vermittelte ERAD vermindern. Die Arbeit von Wójcik *et al.* (2006) zeigt jedoch, dass eine durch RNA-Interferenz verringerte Expression von VCP die Degradation von TCR α inhibiert, nicht aber die von CD3 δ . Das lässt vermuten, dass die von Zhong und Pittman (2006) gezeigten, hauptsächlich auf CD3 δ basierenden Daten eventuell ein alleiniger Effekt der Überexpression von ATXN3 sein könnten. Im gleichen Jahr wurde von Wang *et al.* (2006) publiziert, dass ATXN3 die ERAD fördert, indem es von VCP gebundene polyubiquitinierte Proteine deubiquitiniert. Die Polyubiquitinketten der fehlgefalteten ERAD-Substrate könnten von ATXN3 auf Tetraubiquitine gekürzt werden und so dem Proteasom zugänglich gemacht werden. Es

wurde gezeigt, dass die Degradation von TCR α und fehlgefaltetem BACE (Beta Sekretase), einem luminalen ER-Substrat, durch die Mutation des katalytischen Zentrums von ATXN3 gehemmt wird und zu ER-Stress führt (Wang *et al.*, 2006). Demnach könnte ATXN3 bei der ERAD eine wichtige Verbindung zwischen dem VCP-assoziierten ubiquitinierten Substrat an der ER-Membran und dem zytoplasmatischen proteasomalen Abbau darstellen (s. Abbildung 1.2).

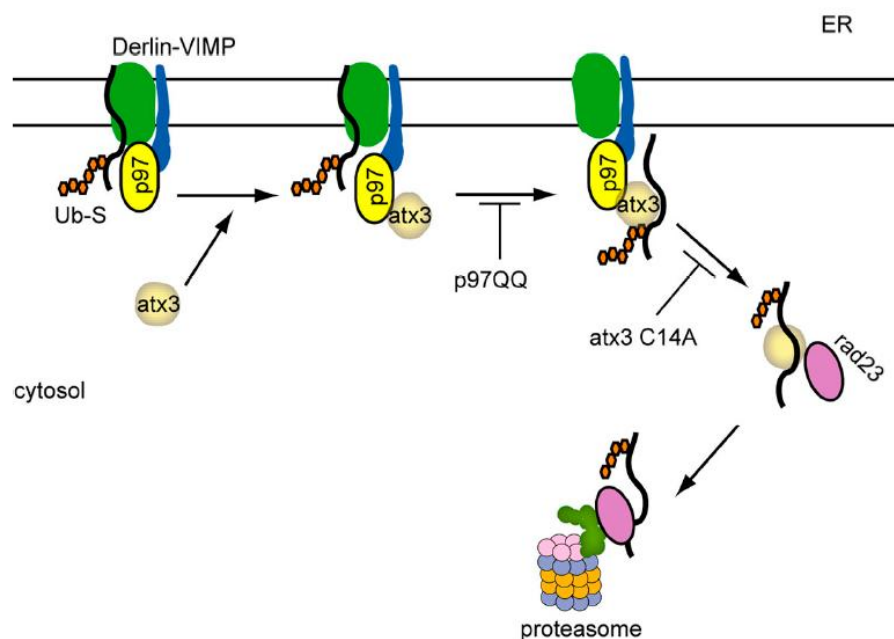


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Funktionsmodells von ATXN3 in der ERAD. ATXN3 assoziiert transient an VCP (p97). Dieses wiederum ist mit ubiquitiniertem Substrat (Ub-S) an den Derlin-VIMP-Komplex an der ER-Membran verbunden. Das ubiquitinierte Substrat bindet an ATXN3 (atx3) und wird editiert. Im Anschluss daran wird das editierte, ubiquitinierte Substrat über einen Ubiquitinrezeptor wie Rad23 an das Proteasom weitergegeben. Sowohl die Mutation der ATPase-Funktion von VCP (p97QQ) als auch die Mutation der DUB-Funktion von ATXN3 (atx3C14A) verhindern das Zuführen von Substraten an das Proteasom (Wang *et al.*, 2006).

Es bindet an VCP, übernimmt das zuvor an VCP gekoppelte ubiquitinierte Substrat und editiert dessen Ubiquitinkette. Im Anschluss daran wird das Substrat zum Proteasom gebracht. An dieser Stelle kommt ein weiterer Interaktionspartner von ATXN3 als Ubiquitinrezeptor ins Spiel, Rad23. Dieses Protein ist das Hefe-Homolog der humanen HR23A und HR23B. Sie interagieren über ihre ubiquitinähnliche Domäne mit der JD von ATXN3 (Wang *et al.*, 2000; Nicastro *et al.*, 2005). Rad23 stabilisiert transient das polyubiquitinierte Protein und verhindert auf diese Weise die Verlängerung der

Ubiquitinkette (Ryu *et al.*, 2003). Es scheint eine dynamische Rolle bei der Bindung von ubiquitinierten Proteinen zu spielen. So wird spekuliert, dass Rad23 den Proteinabbau über das Proteasom beschleunigt (Doss-Pepe *et al.*, 2003). Da Rad23 außerdem ein DNA-Reparaturprotein ist, das an der Nukleotid-Exzisionsreparatur beteiligt ist, könnte ATXN3 auch eine Rolle dabei spielen.

1.3.3.3. ATXN3 kontrolliert die Proteinqualität über Aggresome

Die Proteinqualitätskontrolle einer Zelle beinhaltet zum Einen das Proteasom, das fehlgefaltete Proteine abbaut, und zum Anderen Chaperone, die bei der richtigen Faltung der Proteine helfen oder fehlgefaltete Proteine in die richtige Form zurückfalten. Wenn diese beiden Mechanismen nicht ausreichen, um fehlgefaltetes Protein ab- oder umzubauen, lagert es die Zelle in perinukleäre Regionen ab, die sogenannten Aggresome. ATXN3 kolokalisiert mit Aggresomen und präaggresomalen Partikeln, sowie mit Proteinen, die zum Transport der fehlgefalteten Proteine und zur Bildung der Aggresome benötigt werden. Für das fehlgefaltete CFTR (cystische Fibrose-Transmembranregulator) konnte gezeigt werden, dass ATXN3 und seine funktionellen Protein-domänen zur Bildung von CFTR-enthaltenden Aggresomen gebraucht werden. Es wird angenommen, dass ATXN3 eine allgemeine Funktion beim Transport der fehlgefalteten Proteine zu dem an der Kernmembran lokalisierten Mikrotubulus-organisierenden Zentrum hat, wo sich Aggresome bilden (Burnett & Pittman, 2005).

1.3.3.4. Ataxin-3 und seine Rolle bei der Transkription

ATXN3 kann auf drei verschiedene Arten die Gentranskription beeinflussen:

1. Mutiertes ATXN3 ruft eine transkriptionelle Dysregulation hervor, indem die NI Transkriptionsfaktoren abfangen (McCampbell *et al.*, 2000; Chai *et al.*, 2001).
2. ATXN3 inhibiert über seine expandierte PolyQ-Domäne die CBP- und PCAF (p300 und CBP/ p300 assoziierte Faktoren)-vermittelte Transkription durch Interaktion (Li *et al.*, 2002).
3. ATXN3 vermittelt eine transkriptionelle Repression durch Repressor-komplexbildung und Histondeazetylierung (Evert *et al.*, 2006).

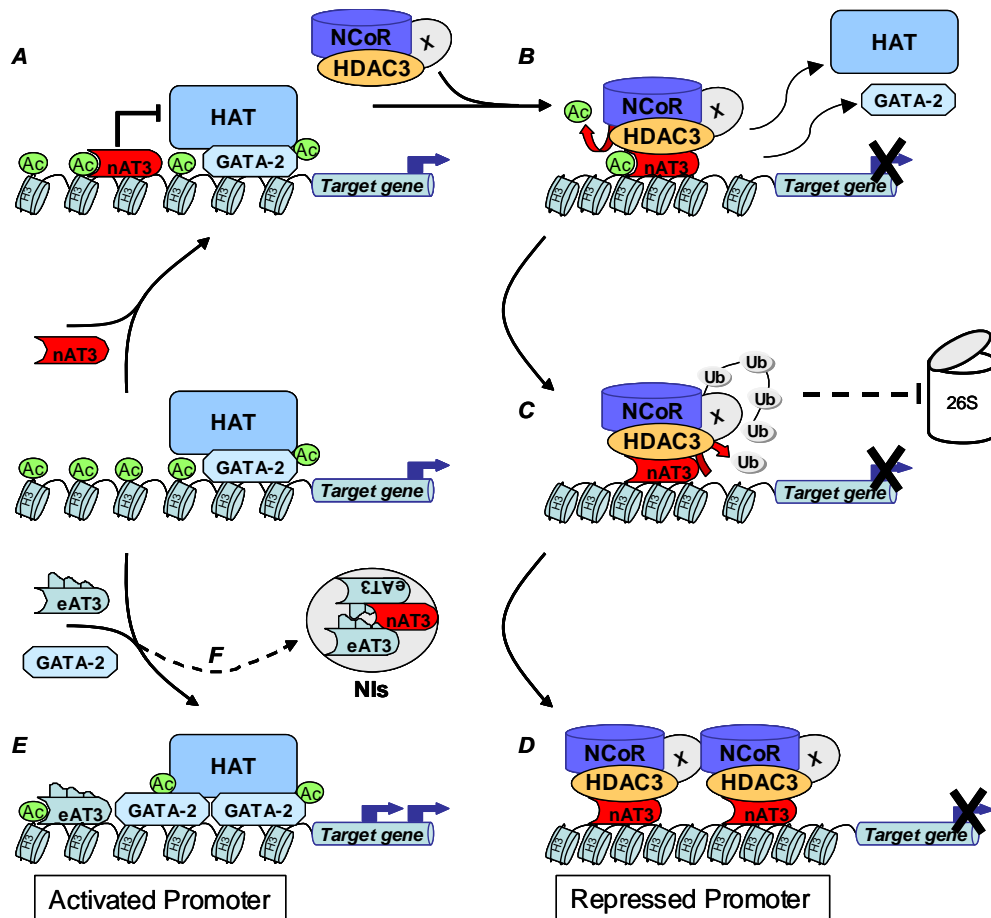


Abbildung 1.3: Modell der transkriptionellen Funktion von ATXN3. **A.** Normales ATXN3 (nAT3) bindet an Chromatin entweder durch Bindung an Histone oder über direkte Bindung an DNA-Sequenzen und inhibiert die Histonacetylierung (HAT). **B.** Es rekrutiert die Histondeazetylase-3 (HDAC3), den Nukleären Rezeptor Korepressor (NCoR) und eventuell andere Korepressoren. Dabei bildet sich ein Repressorkomplex, der zur Deazetylierung der Histone am Promotor führt und eventuell die Ablösung aktivierender Faktoren wie GATA-2 zur Folge hat. **C.** Der Repressorkomplex könnte über ATXN3 stabilisiert werden, indem ATXN3 eine bisher unbekannte Komponente deubiquitiniert und dessen Abbau über das 26S Proteasom (26S) verhindert. **D.** Ein hypoazetylierte Chromatinkonformation des Promotors wird durch Bildung mehrerer Repressorkomplexe erzielt. **E.** Expandiertes ATXN3 (eAT3) zeigt eine veränderte Chromatinbindung und kann keinen Repressorkomplex mit HDAC3 und NCoR aufbauen. Der Promotor bleibt hyperazetyliert und ermöglicht die Bindung von GATA-2 und eine erhöhte Gentranskription. **F.** eATXN3 könnte die Transkription außerdem durch die Aggregation von nATXN3 in NI verstärken. Ac – Acetylierung; Ub – Ubiquitin; NIs – nukleäre Inklusionen.

Auf der Suche nach unterschiedlich regulierten Genen in ATXN3-überexprimierenden Zellen wurde das *Matrix-Metalloprotease-2 (MMP2)*-Gen, das eine Typ IV Collagenase kodiert, identifiziert. Während die Überexpression von mutiertem ATXN3 eine

Aufregulierung der *MMP2* verursacht, führt die Überexpression von normalem ATXN3 zu einer Abregulierung der *MMP2* (Evert *et al.*, 2001, 2003).

Am Beispiel des *MMP2*-Genpromotors konnte gezeigt werden, dass ATXN3 als transkriptioneller Korepressor fungiert (Evert *et al.* 2006). Die Regulation erfolgt über die Bindung von ATXN3 an spezifische DNA-Motive in distinkten Chromatinregionen des *MMP2*-Promotors. ATXN3 rekrutiert den Nukleären Rezeptor Korepressor (NCoR) und die Histondeazetylase-3 (HDAC3) und es bilden sich deazetylierende Komplexe aus, die zur Deazetylierung des Promotors führen und somit zu dessen transkriptionellen Repression. Expandiertes ATXN3 interagiert zwar noch mit HDAC3 und NCoR, führt aber nicht mehr zur Bildung deazetylierender Repressorkomplexe am Chromatin. Auf diese Weise wird die *MMP2*-Transkription nicht inhibiert und kann über GATA-2 aktiviert werden (s. Abbildung 1.3). ATXN3 kontrolliert über diesen Mechanismus epigenetisch die Transkription von Zielgenen durch Veränderung der Chromatinkonformation (Evert *et al.*, 2006).

1.4. FOXO4

1.4.1. FOXO4, ein FOX-Protein der Klasse O

Seit der Entdeckung des Gens „*forkhead*“ (*Gabelkopf*) in der Taufliege *Drosophila melanogaster*, benannt nach der gabelförmigen Kopfverformung die bei der Mutation dieses Gens entsteht, wurden hunderte weitere *forkhead*-Gene gefunden. Darunter sind 19 humane *forkhead*-Genklassen bekannt, die von *FOXA* bis *FOXS* klassifiziert sind, wobei FOX für Forkheadbox und A-S für die verschiedenen Gruppen stehen. Sie bilden die Superfamilie der FOX-Proteine, die alle eine hochkonservierte Forkheadbox (FOX) DNA-Bindungsdomäne enthalten. Die FOX-Domäne besteht aus drei α -Helices, die von zwei charakteristischen Schleifen flankiert werden (winged-helix) (Kaestner *et al.*, 2000; Boura *et al.*, 2007; Carter & Brunet, 2007). Die FOXO-Gruppe beinhaltet klassische Transkriptionsfaktoren mit DNA-Bindungsdomäne und Transaktivierungsdomäne, die bei der Regulation der Zellzyklusprogression, Differenzierung, Apoptose, Resistenz

gegen oxidativen Stress und Alterung involviert sind (Calnan & Brunet, 2008). Des Weiteren enthalten sie eine NLS und eine NES (Biggs *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 2002). Sie können sowohl aktivierend als auch hemmend auf die Transkription von Zielgenen wirken. Bei Invertebraten besteht die FOXO-Klasse aus je einem Mitglied, *Dauer Formation (Daf)-16* in *Caenorhabditis elegans* und *drosophilaFOXO (dFOXO)* in *Drosophila melanogaster*. In Säugern hingegen existieren *FOXO1 (Forkhead in rhabdomyosarcoma, FKHR)*, *FOXO3 (FKHR-like1, FKHL1)*, *FOXO4 (acute-lymphocytic-leukaemia-1, Afx1)* und *FOXO6*. Die ersten drei humanen Mitglieder wurden bei chromosomalen Translokationen humaner Krebserkrankungen in Rhabdomyosarkomen und akuter myeloider Leukämie gefunden (Galili *et al.*, 1993; Davis *et al.*, 1994; Parry *et al.*, 1994; Borkhardt *et al.*, 1997; Hillion *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 1998). Die erste Funktion der FOX-Proteine wurde in *Caenorhabditis elegans* beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass Daf-16 eine entscheidende Rolle bei der Lebensdauer der Organismen spielt. Daf-16 wird negativ durch den Insulin/PI3K/AKT Signalweg reguliert (Lin *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1997).

Inzwischen wurden viele verschiedene Zielgene der FOXO-Transkriptionsfaktoren beschrieben. Eine Grundvoraussetzung zur Regulation von Zielgenen ist jedoch die nukleäre Lokalisation. Die subzelluläre Lokalisation der FOXO-Proteine wird vor allem durch signalwegvermittelte, posttranslationale Modifikationen beeinflusst.

1.4.2. Signalwege zur Regulation von FOXO4

Es ist bekannt, dass die FOXO-Proteine ein sehr weites Expressionsmuster besitzen und mit einer Vielzahl von Interaktionspartnern zelltypspezifisch interagieren, um die Transkription zu regulieren (van der Vos & Coffey, 2008). Hierfür kommen verschiedene Signalwege und posttranslationale Modifikationen zum Einsatz. Die zuletzt publizierte FOXO-regulierende posttranslationale Modifikation ist die O-Glykosylierung von FOXO4 nach oxidativem Stress. Sie führt zu einer erhöhten transkriptionellen Aktivität von FOXO4 und wirkt zytoprotektiv (Ho *et al.*, 2010). Des Weiteren führt oxidativer Stress zur Translokation und Aktivierung von FOXO4 über Monoubiquitinierung durch Mdm2 (Brenkman *et al.*, 2008). Der antagonistische, deubiquitinierende Prozess wird von USP7/HAUSP vermittelt (van der Horst *et al.*, 2006). Als E3-Ligase, die für den

proteasomalen Abbau zuständig ist, ist bisher nur Skp2 bekannt. Für Skp2 wurde jedoch bisher nur eine Interaktion mit FOXO1 nachgewiesen (Huang *et al.*, 2005). Oxidativer Stress kann jedoch auch über eine CBP-vermittelte Azetylierung von FOXO4 zu einer Reduzierung seiner transkriptionellen Aktivität führen. HSir2 hingegen deazetyliert FOXO4 NAD-abhängig (van der Horst *et al.*, 2004).

Der am längsten bekannte FOXO-Regulationsmechanismus ist der Insulin/PI3K/Akt-Signalweg. Bei Stimulation mit Insulin oder Wachstumsfaktoren wird FOXO4 an drei Stellen (T32, S197 und S262) von der Proteinkinase B phosphoryliert und interagiert mit dem Protein 14-3-3, wodurch beide aus dem Nukleus transportiert werden (Brunet *et al.*, 1999; Kops *et al.*, 1999). Dieser Signalweg gilt gleichermaßen für FOXO1 und FOXO3. Milder oxidativer Stress kann jedoch auch zur Translokation in den Kern führen. In diesem Fall phosphoryliert die JNK-Kinase FOXO4 an zwei anderen Positionen (T447 und T451) (Essers *et al.*, 2004).

FOXO4 ist damit genauso wie FOXO1 und 3 ein sehr vielfältig regulierbarer Transkriptionsfaktor, der auf zellspezifische und kontextspezifische Signale reagiert.

1.5. Zielsetzung

Die transkriptionelle Regulation ist ein essentieller Zellmechanismus, der bei vielen PolyQ-Krankheiten betroffen ist und durch Dysregulation zur Pathogenese dieser Krankheiten beiträgt. Vorgegangene Untersuchungen der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass ATXN3 direkt an spezifische DNA-Motive und Chromatinbereiche von Genen bindet, mit transkriptionellen Koregulatoren interagiert und histondeazetylierende Komplexe bildet, die zur transkriptionellen Repression bestimmter Zielgene führen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren zu identifizieren und eventuelle ATXN3-vermittelte Signalwege aufzuzeigen, die für die physiologische Funktion von ATXN3 als transkriptionellen Regulator und die aberrante Funktion von expandiertem ATXN3 bei der SCA3-Krankheit von Bedeutung sein können. Die identifizierten ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren sollten dazu auf ihre DNA-Bindung zum jeweiligen Transkriptionsfaktor-Konsensusmotiv und auf ihre

physiologische Interaktion mit ATXN3 überprüft werden. Spezifisch interagierende Transkriptionsfaktoren, deren DNA-Bindung durch ATXN3 beeinflusst werden könnte, sollten dann im zweiten Teil der Arbeit näher untersucht werden, um den funktionellen Einfluss von ATXN3 auf die Transkription von Genen zu untersuchen, die über diese Transkriptionsfaktoren reguliert werden.

2. MATERIAL

2.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden von den folgenden Firmen erworben: Carl Roth GmbH und CoKG (Karlsruhe), Invitrogen GmbH (Karlsruhe), Promega GmbH (Mannheim), Roche Diagnostics GmbH Roche Applied Science (Mannheim) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München).

2.2. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Allgemeiner Laborbedarf	Labomedic GmbH (Bonn); Sarstedt AG und Co (Nümbrecht); Greiner-bio-one GmbH (Frickhausen); Nerbe Plus GmbH (Winsen/Luhe); Eppendorf AG (Hamburg)
Micro Amp Fast Optical 96-well Platten	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt)
Intensifier-Screen BAS-MS	Fujifilm Deutschland GmbH (Düsseldorf)
Kodak T-Mat-Plus DG 18x43	BW Plus Röntgen GmbH & CoKG (Kamp-Lintfort)
Protran BA83 Nitrozellulose (0,2µm)	Whatman GmbH (Dassel)
Whatman Papier	Whatman GmbH (Dassel)
X-Tracta	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)

2.3. Geräte

Gerät	Hersteller
Analysen-, Präzisionswaage	Sartorius AG (Göttingen)
Bakterienbrutschrank	Memmert GmbH und CoKG (Schwabach)
CO ₂ -Inkubator	Binder GmbH (Tuttlingen)

Dampfsterilisator Varioklav	H+P Labortechnik AG (Oberschleissheim)
Dewargefäß	Isotherm KGW Schieder GmbH (Karlsruhe)
Drehrad	G. Kisker GbR (Steinfurt)
Elektropipette accu-jet	Brand GmbH und CoKG (Wertheim)
Entwicklungsmaschine X-OMAT 1000	Siemens AG (Erlangen)
Fluorometer SpectroMax Gemini	MDS Analytical Technologies GmbH (Ismaning)
Gel-Dokumentationssystem	Intas Science Imaging Instruments GmbH (Göttingen)
Gelelektrophorese-Apparaturen:	
SE 600 Vertical Slab Gel Unit;	Hoefer Inc. (Holliston, USA)
Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad Laboratories GmbH (München)
Geltrockner Modell 583	Biorad Laboratories GmbH (München)
Homogenisator T8.01	IKA Werke GmbH & CoKG (Staufen)
Inkubationsschüttler Aerotron	Infors GmbH (Einsbach)
Luminometer Centro LB 960	Berthold Technologies GmbH und CoKG (Bad Wildbad)
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH & CoKG (Schwabach)
Mikroskope: Axiovert 25 und 200M	Carl Zeiss Jena GmbH (Göttingen)
Multipette	Eppendorf AG (Hamburg)
PCR-Maschinen: Tprofessional;	Biometra GmbH (Göttingen)
7500 Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt)
pH-Meter	Mettler Toledo GmbH (Giessen)
Photometer: Nanodrop;	PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Optimax microplate reader	MDS Analytical Technologies GmbH (Ismaning)
Sequenzierer ABI Prism 310	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt)
Genetic Analyzer	
Schüttler IKA KS 260 basic	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Spannungsquelle Power Pac 200	Biorad Laboratories GmbH (München)
Sterilisator	WEBECO Hygiene in Medizin und Labor GmbH & CoKG (Selmsdorf)
Sterilwerkbank	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Thermomixer comfort	Eppendorf AG (Hamburg)
Transferkammer Mini-Trans-Blot Cell	Biorad Laboratories GmbH (München)
Vortexer	VWR International GmbH (Darmstadt)
Wasserbad	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
Zentrifugen: Biofuge primoR; Megafuge	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
1.0R; Model J2-21	Beckman Coulter Deutschland GmbH (Krefeld)

2.4. Längenstandards

GeneRuler 100bp (0,1 – 1kb) und 1kb (0,25 – 10kb) DNA Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
Smart Ladder (0,2 – 10kb) und SF (0,1 – 1kb)	Eurogentec Deutschland GmbH (Köln)
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)

2.5. Kits

TOPO TA Cloning Kit (mit pCR2.1 Vektor) (-20°C)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System	Promega GmbH (Mannheim)
Wizard SV Gel and PCR Clean-up System	Promega GmbH (Mannheim)
Zymoclean Gel DNA Recovery Kit	Hiss Diagnostics GmbH (Freiburg)
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (-20°C)	Applied Biosystems Deutschland GmbH (Darmstadt)
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
RNeasy Plus Mini Kit	Qiagen GmbH (Hilden)
Dual Luziferase Reporter 1000 Assay Systems (-80°C)	Promega GmbH (Mannheim)
TranSignal TF-TF Interaction Arrays (4°C)	BioCat (Heidelberg)
Nuclear Complex Co-IP Kit (-20°C)	Active Motif (Rixensart, Belgien)
Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (-20°C)	Agilent Technologies GmbH & CoKG (Waldbronn)
ProbeQuant™ G-50Micro Säulen	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
Simple CHIP Enzymatic Chromatin Kit (Agarose Beads) (-20°C)	New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

2.6. Reagenzien

Bio-Rad Protein Assay (4°C)	Biorad Laboratories GmbH (München)
Complete Mini (CM), EDTA-frei (4°C)	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim)
10000x GelRed™ (dunkel lagern)	BIOTREND Chemikalien GmbH (Köln)
Gluthathion-Sepharose 4B (4°C)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)

Ni-NTA-Agarose (4°C)	Qiagen GmbH (Hilden)
Protein G Sepharose 4 Fast Flow (4°C)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
μMACS Protein G MicroBeads (4°C)	Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach)
μSäulen	Miltenyi Biotech GmbH (Bergisch Gladbach)
Lipofectamine 2000 (4°C)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
ROS Detection Reagents (H ₂ DCF) (-20°C; dunkel lagern)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Alamar Blau (4°C)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (4°C)	Carl Roth GmbH und CoKG (Karlsruhe)
TEMED	Carl Roth GmbH und CoKG (Karlsruhe)
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

2.7. Radioaktive Reagenzien

Redivue γ ³² P ATP 10μCi/μl (4°C)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)
---	--------------------------------------

2.8. Puffer und Lösungen

5x Puffer A	2,5ml 1M HEPES pH 7,9; 3,75ml 100mM MgCl ₂ ; 1,25ml 2M KCl; 0,5% NP-40; 125μl 1M DTT <i>ad</i> 50ml ddH ₂ O; 1mM PMSF; CM
Puffer B	20mM HEPES pH 7,9; 420mM NaCl; 25% Glycerol; 1,5mM MgCl ₂ ; 0,2mM EDTA
Low-Salt-Puffer (4°C)	1% NP-40; 50mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM PMSF; Complete Mini
RIPA-Lysispuffer (4°C)	150mM NaCl; 1% NP-40; 0,5% Natrium Deoxycholat; 0,1% SDS; 50mM Tris-HCl pH 8,0; 1mM PMSF; CM
IP-Waschpuffer (4°C)	50mM Tris-HCl pH 8,0
2x Lämmli-Puffer	200mM Na-Phosphatpuffer pH 7,5; 4% SDS; 20% Glycerol; Krümel Bromphenolblau; je frisch 10% β-Mercaptoethanol
1M K-Phosphatpuffer pH 8,0	1M K ₂ HPO ₄ (94ml) gegen 1M KH ₂ PO ₄ (6ml)
1M Na-Phosphatpuffer pH 7,5	1M Na ₂ HPO ₄ (80ml) gegen 1M NaH ₂ PO ₄ (20ml)
10x T-Puffer	30,3g Trizma-Base; 143g Glycin; <i>ad</i> 1l ddH ₂ O
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,4% SDS; 15,1g Trizma-Base; <i>ad</i> 500ml ddH ₂ O
Trenngelpuffer pH 8,8	0,4% SDS; 90,8g Trizma-Base; <i>ad</i> 500ml ddH ₂ O
10% APS (4°C)	1g in 10ml ddH ₂ O; mehrere Wochen haltbar

PAGE-Puffer	0,1% SDS; 200ml T-Puffer; <i>ad</i> 2l ddH ₂ O
Coomassie-Färbelösung	2,5g/l Coomassie-Brilliant-Blue-R250; 45% Methanol; 10% Essigsäure
Coomassie-Entfärber	30% Methanol; 10% Essigsäure
Blotpuffer	200ml T-Puffer; 1400ml ddH ₂ O; 400ml Methanol
Blocklösung	5% Milchpulver in PBST; immer frisch angesetzt
10x Ponceau S	2g Ponceau S; 30g Trichloressigsäure; 30g 5-Sulfosalicylsäure <i>ad</i> 100ml
ECL1 Lösung (100ml) (4°C)	88,5ml ddH ₂ O; 10ml Tris-HCl pH 8,5; 440µl 90mM p-Cumarsäure; 1ml 250mM Luminol
ECL2 Lösung (100ml) (4°C)	90ml ddH ₂ O; 10ml 1M Tris-HCl pH 8,5; 60µl 30% H ₂ O ₂
250mM Luminol (-20°C)	0,44g in 10ml DMSO; in 1ml Aliquots
90mM p-Kumarsäure (-20°C)	0,15g in 10ml DMSO; in 440µl Aliquots
1 M DTT (-20°C)	in 0,01M Natriumazetat pH 5,2; steril filtriert (0,22µm Filter)
β-Mercaptoethanol (4°C)	1.4M β-Mercaptoethanol
20x PBS pH 7,4	2,6M NaCl; 140mM Na ₂ HPO ₄ ; 60mM NaH ₂ CO ₄ ; autoklavieren
PBST	1x PBS; 0,05% Tween 20
50x TAE-Puffer	2M Trizma-Base; 57,1 ml/l Eisessig; 0,05M EDTA pH 8,0
Agarosegel	1-2% Agarose in 1x TAE
1000x Ampizillin-Lösung (-20°C)	100mg/ml; steril filtriert (0,22µm Filter)
400x Kanamycin-Lösung (-20°C)	10mg/ml; steril filtriert (0,22µm Filter)
6x DNA-Gelladepuffer	0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF; 15% Ficoll 400
6x DNA-Gelladepuffer (4°C)	0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol FF, 40% Sucrose
H ₂ O _{DEPC}	0,1% DEPC; ÜN rühren oder 1h bei 37°C; autoklavieren
IPTG (-20°C)	20mg/ml oder 1M; steril filtriert (0,22µm Filter)
5x TBE	0,45M Tris-borat; 0,01M EDTA pH 8,0
GST-Bakterienlysispuffer (4°C)	50mM Na-Phosphatpuffer pH 8,0; 100mM NaCl; 10% Glycerol; 1mM DTT; 1mM PMSF; CM
GST-Proteinexpression-Waschpuffer (4°C)	50mM Na-Phosphatpuffer pH 8,0; 100mM NaCl; 10% Glycerol; 1mM DTT; 1M NaCl; 1% Triton X100; 1mM PMSF; CM
GST-Proteinexpression-Elutionspuffer (4°C) pH 8,0	50mM Na-Phosphatpuffer pH 8,0; 100mM NaCl; 10% Glycerol; 1mM DTT; 20mM reduziertes Glutathion; 1mM PMSF; CM
Dialysepuffer (4°C)	20mM Tris-HCl pH 8,0; 150mM KCl; 0,1mM EDTA; 10% Glycerol; 0,1mM DTT
His-Bakterienlysispuffer (4°C)	25mM Ka-Phosphatpuffer pH8,0; 500mM KCl; 20mM Imidazol; 1mM PMSF; CM
His-Proteinexpression-Elutionspuffer (4°C) pH 8,0	25mM K-Phosphatpuffer pH 8,0; 500mM KCl; 500mM Imidazol; 1mM PMSF; CM
0,5M Poly-L-Lysin	1:100 verdünnt verwenden; steril filtriert (0,22µmFilter)
Hoechst (4°C; dunkel lagern)	100ng/ml in PBS; 1:2000 verwenden

Mowiol (-20°C)	6g Glycerol; 2,4g Mowiol in 6ml ddH ₂ O; 12ml 0,2M Tris-HCl pH 8,5 bei 53°C lösen; 20min bei 4000UpM; in 500µl Aliquots
TFBI (4°C) pH 5,8	100mM Rubidiumchlorid; 50mM Mangan(II)chlorid; 30mM Ka-Azetat; 10mM Ca ₂ Cl; 15% Glycerol; mit 0,2M Essigsäure titrieren
TFBII (4°C) pH 6,8	10mM MOPS; 10mM Rubidiumchlorid; 75mM Ca ₂ Cl; 15% Glycerol; mit NaOH titrieren

2.9. Enzyme und fertige Puffer

M-MLV-Reverse-Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant (200U/µl) (-20°C)	Promega GmbH (Mannheim)
SYBR Green JumpStart <i>Taq</i> ReadyMix (dunkel lagern) (-20°C)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
Benzonase® Reinheitsgrad II (>90%) für die Biotechnologie (-20°C)	Merck KGaA (Darmstadt)
T4-Polynukleotid-Kinase (-20°C)	New England Biolabs (Ipswich, England)
Gel-Shift-Binding 5X Puffer (-20°C)	Promega GmbH (Mannheim)
Restriktionsendonukleasen (-20°C)	New England Biolabs (Ipswich, England); Fermentas GmbH (St. Leon-Rot)
BioTherm™- <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (-20°C)	Ares Bioscience GmbH (Köln)
Platinum- <i>Pfx</i> -DNA-Polymerase (-20°C)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
Calf-Intestinal-Alkaline-Phosphatase (CIP) (-20°C)	New England Biolabs (Ipswich, England)
T4-DNA-Ligase (-20°C)	New England Biolabs (Ipswich, England)

2.10. Oligonukleotide

2.10.1. EMSA-Oligonukleotide

Bezeichnung	Tm	Sequenz
Afxh (FOXO4) For	39,8°C	5'-CATAAACAACCATAAACAAC-3'
Afxh (FOXO4) Rev	39,8°C	5'-GTTGTTTATGGTTGTTTATG-3'
WT1 (1) For	95,9°C	5'-GGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGAGGGGCGCGGCG-3'
WT1 (1) Rev	95,9°C	5'-CGCCGCGCCCTCCCCGCCCCGCCCCGCCCC-3'
TFIID For	53,1°C	5'-GCAGAGCATATAAAATGAGGTAGGA-3'
TFIID Rev	53,1°C	5'-TCCTACCTCATTTTATATGCTCTGC-3'

2.10.2. Oligonukleotide für RT- und quantitative PCR

Bezeichnung	Tm	Sequenz
Oligo dT30	55,5°C	5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'
beta Actin 3 For	45,6°C	5'-CAGCACAATGAAGATCAAGA-3'
beta Actin 3 Rev	47°C	5'-AAAGGTGTAACGCAACTAA-3'
hGAPDH For	45,6°C	5'-GAAGGTGAAGTCCGGAGT-3'
hGAPDH Rev	48,1°C	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
HPRT For	46,5°C	5'-ATAAGCCAGACTTTGTTGGA-3'
HPRT Rev	46,2°C	5'-AGATGGCCACAGAACTAGAA-3'
MnSOD 2 For	45,6°C	5'-GTAGCACCAGCACTAGCAG-3'
MnSOD 2 Rev	46,9°C	5'-GTTCAGGTTGTTACGTAGG-3'
Cat For	46,3°C	5'-TCTCATCCAGTTGGTAAAC-3'
Cat Rev	46,5°C	5'-AGTGTCAGGATAGGCAAAA-3'
MnSOD -1398 For	49°C	5'-GTCCCAGCCTGAATTTCC-3'
MnSOD -1243 Rev	44,7°C	5'-CTAGGCTTCCGGTAAGTG-3'

2.10.3. Sequenzierungsoligonukleotide

Bezeichnung	Tm	Sequenz
T7	48,7°C	5'-TAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
M13(-40)For	41,7°C	5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'
M13/pUC Rev	33°C	5'-AACAGCTATGACCATG-3'
BGH	45,4°C	5'-TAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
EV4	59,4°C	5'-CCCCAACTTTCAAGGCATTGC-3'
3'-pGEX	64°C	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'
FOXO4 16 Rev	51,3°C	5'-GCCTCTGTGGCTGAATTCTC-3'
FOXO4 160 Rev	51,8°C	5'-TGTGTACCTTTTCCCCAGA-3'
FOXO4 437 For	51,3 °C	5'-GCTCAGCAGGATGGAAGAAC-3'
FOXO4 871 For	51,1 °C	5'-AGTTATGCAGGGGGTGTCC-3'
FOXO4 1355 For	51,4 °C	5'-CTGTGCTCACACCCCTACT-3'

2.10.4. Klonierungsoligonukleotide

Bezeichnung	Tm	Schnittstelle	Sequenz
Josephin For	65,5°C	BamHI	5'-GGATCC GAGTCCATCTTCCACGAGAAAC-3'
Josephin Rev	63°C	BamHI	5'-GGATCC GTTGTGCTAATTCTTCTCCAATAAG-3'
BRLZ (UIMs) Rev	65,7°C	BamHI	5'-GGATCC GATTTGTACCTGATGTCTGTGTCATATC-3'
AT3 Rev	61,9°C	BamHI	5'-GGATCC AAAAATCACATGGAGCTCTTATG-3'
FOXO4 For	61,9°C	KpnI	5'-GGTACC GATCCGGGAATGAGAAT-3'
FOXO4 Rev	63,3°C	KpnI	5'-GGTACC CACCTGTGTGTGACCAGACC-3'
FOXO4 592 Rev	62,5°C	KpnI	5'-GGTACC AGCTTGCTGCTGCTATCCAT-3'
HA epi F	66°C		5'-TATACGCTACTCACTATAGGGCAAATTGCCG-3'
HA epi rev 3	71°C	BamHI	5'-TATACGCGT GGATCCGGATCTCAAGCTAGCGTAGTC-3'
FOXO4 T32A For	74,2°C		5'-CCCCTCTGCGCCTGGCCCTT-3'
FOXO4 S197A For	76,7°C		5'-GCCGGGCCGCCCATGGATAGCA-3'
FOXO4 S262A For	75°C		5'-CGTCCACGAAGCAGTGCAATGCCAGCAGTG-3'

2.11. Antikörper

2.11.1. Primärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
AC-15 (-20°C)	α -beta-Aktin	Maus (monoklonal)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	1:10000 (WB)
Afx1X (H-80) (4°C)	α -FOXO4	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Heidelberg)	1:2000 (WB); 1:50-100 (IF)
1H9 (-20°C)	α -Ataxin-3	Maus (monoklonal)	Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.)	1:2000 (WB); 1:500 (IF)
GST (4°C)	α -GST	Ziege (polyklonal)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)	1:10000 (WB)
HA.11 (16B12) (-20°C)	α -HA	Maus (monoklonal)	(Covance) Hiss Diagnostics GmbH (Freiburg)	1:1000 (WB); 1:750 (IF)
His (G18) (4°C)	α -His	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Heidelberg)	1:200 (IF)
His (-20°C)	α -His	Maus (monoklonal)	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)	1:3000 (WB)
HDAC3 (-20°C)	α -HDAC3	Kaninchen (polyklonal)	Active Motif (Rixensart, Belgien)	1:500 (WB)
Kaninchen-IgG (4°C)	α -Kaninchen-IgG	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Heidelberg)	(IP)
Maus-IgG (4°C)	α -Maus-IgG	Maus	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Heidelberg)	(IP)
MnSOD (-20°C)	α -MnSOD	Kaninchen (polyklonal)	BIOTREND Chemikalien GmbH (Köln)	1:1000 (WB); 1:50 (AP)
NT-ATXN3 (-20°C)	α -NT-ATXN3	Kaninchen (polyklonal)	Troittier <i>et al.</i>	1:1600 (IP)
WT1X (C-19) (4°C)	α - WT1	Kaninchen (polyklonal)	Santa Cruz Biotechnologie, Inc. (Heidelberg)	1:2000 (WB); 1:750 (IF)
CD3-PerCP (4°C)	α -CD3	Maus (monoklonal)	BDBiosciences-Scientific (Heidelberg)	1:40 (FACS)
CD19-PE (4°C)	α -CD19	Maus	BDBiosciences-Scientific (Heidelberg)	1:40 (FACS)
CD56-FITC (4°C)	α -CD56	Maus	BDBiosciences-Scientific (Heidelberg)	1:40 (FACS)

2.11.2. konjugierte Sekundärantikörper

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Hersteller	Verdünnung
Ziege-HRP (-20°C)	α -Ziege-IgG	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	1:2000 (WB)
Maus-HRP (-20°C)	α -Maus-IgG	Ziege	Dianova (Hamburg)	1:2000 (WB)
Kaninchen-HRP (-20°C)	α -Kaninchen-IgG	Ziege	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)	1:3000 (WB)
Kaninchen-Alexa Fluor 488 (grün) (-20°C)	α -Kaninchen-IgG (H+L)	Ziege	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)	1:200 (IF)
Maus-Alexa Fluor 594 (rot) (-20°C)	α -Maus-IgG (H+L)	Ziege	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)	1:200 (IF)
Kaninchen-IgG, biotinyliert (-20°C)	α - Kaninchen-IgG (H+L)	Ziege	Linaris Biologische Produkte GmbH (Wertheim)	1:200 (AP)
0,75U/ μ l Streptavidin-AP-Konjugat (4°C)	α -Biotin	-	Roche Deutschland Holding GmbH (Mannheim)	(AP)

2.12. Vektoren

2.12.1. Leervektoren

Plasmidbezeichnung	Verwendung	Hersteller
pCR2.1TOPO	Shuttel-Vektor für Klonierungen	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pcDNA 3.1 Hygromycin (-)	Expressionsvektor für Säugerzellen	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pGL4.23 (luc2/minP)	Firefly-Luziferase-Reportergenvektor	Promega GmbH (Mannheim)
pGEX6P1	<i>E.coli</i> Expressionsvektor GST-Proteinexpression in Prokaryoten	GE Healthcare Europe GmbH (Freiburg)

pET32+	<i>E. coli</i> Expressionsvektor His-Proteinexpression in Prokaryoten	Merck Chemicals Ltd. (Beeston, UK)
--------	---	------------------------------------

2.12.2. Zur Verfügung gestellte fertige Konstrukte

Plasmidbezeichnung	Insert	Verwendung	Hersteller
ATXN3Q2 pcDNA 3.1	ATXN3Q2	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
ATXN3Q22 pcDNA 3.1	ATXN3Q22	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
ATXN3Q71 pcDNA 3.1	ATXN3Q71	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
ATXN3Q123 pcDNA 3.1	ATXN3Q123	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
His-ATXN3Q23 pcDNA 3.1	ATXN3Q23	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
His-ATXN3Q70 pcDNA 3.1	ATXN3Q70	Expression in Säugerzellen	Haacke <i>et al.</i> 2006
β-Gal pcDNA3.1	β-Galaktosidase	Expression in Säugerzellen	Evert <i>et al.</i>
<i>SOD2</i> Promotor pGL4.23	Humaner <i>SOD2</i> Genpromotor	Firefly-Luziferase-Reporteranalyse	Evert <i>et al.</i>
phRL-CMV	Renilla ORF	Renilla-Luziferase-Reporteranalyse	Promega GmbH (Mannheim)
Hplm scrambled CFTR8	Scrambled Kontroll-shRNA (Palmer <i>et al.</i> , 2006)	Lentivirale scrambled Kontroll-shRNA Expression in Säugerzellen	Kooperation AG Pfeifer
Hplm shRNA ATXN3	ATXN3 shRNA	Lentivirale ATXN3 shRNA Expression in Säugerzellen	Kooperation AG Pfeifer

2.12.3. Hergestellte Konstrukte

Plasmidbezeichnung	Insert	Herkunftsvektor	Schnittstelle
JD pCR2.1TOPO	BamHI JD	ATXN3Q23 pcDNA3	
JD/UIIM pCR2.1TOPO	BamHI JD + 2x UIM	ATXN3Q23 pcDNA3	
ATXN3Q23 pCR2.1TOPO	BamHI ATXN3Q23	ATXN3Q23 pcDNA3	
ATXN3Q70 pCR2.1TOPO	BamHI ATXN3Q70	ATXN3Q70 pcDNA3	
JD pGEX6P1	BamHI JD	JD pCR2.1TOPO	BamHI
JD/UIIM pGEX6P1	BamHI JD + 2x UIM	JD/UIIM pCR2.1TOPO	BamHI
ATXN3Q23 pGEX6P1	BamHI ATXN3Q23	ATXN3Q23 pCR2.1TOPO	BamHI
ATXN3Q70 pGEX6P1	BamHI ATXN3Q70	ATXN3Q70 pCR2.1TOPO	BamHI
FOXO4 592 pCR2.1TOPO	KpnI FOXO4 592	Humane <i>Zerebellum</i> cDNA	
FOXO4 pCR2.1TOPO	KpnI FOXO4	Humane <i>Zerebellum</i> cDNA	
FOXO4 592 pET32b+	KpnI FOXO4 592	FOXO4 592 pCR2.1TOPO	KpnI
FOXO4 pET32b+	KpnI FOXO4	FOXO4 pCR2.1TOPO	KpnI
HA pCR2.1TOPO	HA	pTL3	
HA pcDNA3.1 Hygromyzin (-)	HA	HA pCR2.1TOPO	BamHI + BstXI
HA FOXO4 pcDNA3.1 Hygromyzin (-)	KpnI FOXO4	FOXO4 pCR2.1TOPO	KpnI
HA FOXO4 3x Ala pcDNA3.1 Hygromyzin (-)	FOXO4 T32A; S197A; S262A	HA FOXO4 pcDNA3.1 Hygromyzin (-)	
Afxh pGL4.23 (luc2/minP)	4x FOXO4 DBE	EMSA Dimere	EcoRV

2.13. Organismen und Gewebeproben

2.13.1. *E. coli* Stämme

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
One Shot TOP 10F'	F' {lacI ^q Tn10 (Tet ^R)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
BL21(DE3)	B F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal λ (DE3)	Agilent Technologies GmbH & CoKG (Waldbronn)
XL10 Gold	Tet ^R Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^R)Amy Cam ^R]	Agilent Technologies GmbH & CoKG (Waldbronn)

2.13.2. Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Hersteller
CSM14.1 Ctrl (CSM-Ctrl)	Mesenzepmale Rattenzelllinie, die das Tetrazyklin (Tet)-off-Regulator Plasmid enthält und somit den Tet-kontrollierten Tansaktivator (tTA) konstitutiv exprimiert und bei Tet-Entzug einen Leervektor	Evert <i>et al.</i> , 1999
CSM14.1 ATXN3Q23 (CSM-Q23)	Mesenzepmale Rattenzelllinie, die das Tetrazyklin (Tet)-off-Regulator Plasmid enthält und somit den Tet-kontrollierten Tansaktivator (tTA) konstitutiv exprimiert und bei Tet-Entzug humanes ATXN3Q23	Evert <i>et al.</i> , 1999
CSM14.1 ATXN3Q70 (CSM-Q70)	Mesenzepmale Rattenzelllinie, die das Tetrazyklin (Tet)-off-Regulator Plasmid enthält und somit den Tet-kontrollierten Tansaktivator (tTA) konstitutiv exprimiert und bei Tet-Entzug humanes ATXN3Q70	Evert <i>et al.</i> , 1999

HeLa	Humane, epitheliale Zervix-Karzinomazellen	
B95-8	Lymphoblastoide Grallenaffen Zelllinie	
SCA3-LCLs	Lymphoblastoide B-Zellen aus SCA3-Patienten Blut, die mit Epstein Barr Virus immortalisiert sind	Diese Arbeit
Kontroll-LCLs	Lymphoblastoide B-Zellen aus Kontroll-Patienten Blut, die mit Epstein Barr Virus immortalisiert sind	Diese Arbeit

2.13.3. Gewebeproben

Gewebeprobe	Genotyp
Humane <i>Pons</i> Paraffinschnitte; RNA Proben #1, #2	Kontrolle
Humane <i>Pons</i> Paraffinschnitte; RNA Proben #3, #4	SCA3
Maushirn	Wildtyp

2.14. Medien für die Kultivierung von Bakterien

Die gesamten Medien wurden 20min bei 121°C autoklaviert und nach Abkühlung auf ca. 60°C das gewünschte Antibiotikum in der entsprechenden Konzentration zugefügt.

LB-Medium	10g NaCl; 10g Tryptophan; 5g Hefeextrakt; <i>ad</i> 1l mit ddH ₂ O; pH 7,0 (5M NaOH)
LB-Agar	LB-Medium; 20g Agar

2.15. Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

DMEM high Glucose (4,5g/l) with stable L-Glutamine (4°C)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
RPMI 1640 Medium 5.5g/l NaCl; 5mg/l Phenol red; 2g/l NaHCO ₃ ; 25mM HEPES; stabile Gutamin; low endotoxin (4°C)	Biochrom AG (Berlin)
1x Dulbecco's PBS without Ca & Mg	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Fötales Kälberserum Superior (-80°C)	Biochrom AG (Berlin)
Fötales Kälberserum Gold (-80°C)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
100x Penizillin/Streptomycin (P/S; -20°C)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Trypsin (-20)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
500x Hygromyzin B (4°C)	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
250x Puromyzin (-20°C); 1mg/ml; steril filtriert (0,2µm Filter)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
1000x Tetrazyklin (Tet) (-20°C); 1mg/ml in 70% Ethanol; steril filtriert (0,2µm Filter)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)
500x Neomyzin (G418) (-20°C); 50mg/ml biologische Stärke je Charge beachten; steril filtriert (0,22µm Filter)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
10000x Cyclosporin A (4°C; dunkel lagern) 10mg/ml in Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

2.15.1. Medienzusammensetzung der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Medienzusammensetzung
HeLa	DMEM; 10% FCS inaktiv; 1x P/S
CSM-Ctrl; CSM-Q23; CSM-Q70	DMEM; 10% FCS inaktiv; 1x P/S; 1x G418; 1x Hygromyzin; 1x Puromyzin; 1x Tetrazyklin
LCLs	RPMI 1640 Medium; 10% FCS ; 1x P/S
Einfriermedium für alle Zelllinien	Spezifisches Zellmedium mit 20% FCS inaktiv, 10% DMSO

3. METHODEN

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung und Gefrierlagerung von Bakterien

Transformierte Bakterien wurden über Nacht (ÜN) bei 37°C im Schüttler in der gewünschten Menge LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum inkubiert. Zur Anlage von Glycerinkulturen wurden 750µl dieser Bakterien-ÜN-Kultur mit 250µl Glycerin in ein Kryoröhrchen überführt, gemischt und bei -80°C gelagert.

3.1.2. Plasmid-DNA Isolierung aus *E. coli* im präparativen Maßstab

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA wurden ÜN-Kulturen von den entsprechenden Bakterienkolonien bzw. Kryostocks angeimpft und DNA-Mini-Präparationen (Promega) für kleine Mengen und DNA-Maxi-Präparationen (Qiagen) für große Mengen nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die DNA-Maxi-Präparation erfolgte endotoxinfrei, was das Plasmid für Transfektionen tauglich macht. Maxi-Präparationen wurden vor der Lagerung auf 1µg/µl eingestellt und bei -20°C gelagert.

3.1.3. DNA-Analyse

3.1.3.1. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Größenauftrennung von DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld. Die Agarose wurde in 1x TAE aufgekocht und mit GelRed luftblasenfrei gegossen. Die Agarosekonzentration ist abhängig von der

aufzutrennenden DNA-Fragmentgröße. Die DNA-Proben wurden mit 6x Gelladepuffer versetzt, zusammen mit einem Längenstandard aufgetragen und je nach Gelgröße und Zweck mit einer Spannung zwischen 80-120V in 1x TAE aufgetrennt. Zur anschließenden Auswertung wurde das Gel auf einem UV-Illuminator bei 366nm betrachtet.

3.1.3.2. Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von gereinigter DNA

Die Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA erfolgte mittels Messung der optischen Dichte bei 260nm (OD_{260}). Dazu wurden 1-2 μ l DNA-Probe im Nanodrop gegen einen Nullwert (Puffer der Probe) gemessen. Die DNA-Konzentration, bei der die OD_{260} gleich 1 ist, wird als Multiplikationsfaktor zur Berechnung der Konzentrationsbestimmung verwendet. Das entspricht 50 μ g/ ml bei doppelsträngiger DNA und 33 μ g/ ml bei einzelsträngiger DNA und DNA-Oligonukleotiden, bzw. 40 μ g/ ml bei RNA.

3.1.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

3.1.4.1. Klonierungs-PCR

Die Klonierungs-PCR dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten, die nachfolgend in Vektoren kloniert wurden, um für weitere Analysen zur Verfügung zu stehen. Zur Verringerung der Mutationsrate während der PCR wurde die Platinum-*Pfx*- (*Thermococcus* sp. Strain KOD)-DNA-Polymerase verwendet, da sie eine 3'-5'-Exonuklease Aktivität (Korrekturlesefunktion) besitzt.

PCR-Ansatz		Übersicht über die Phasen und Zyklen		
10x <i>Pfx</i> -Puffer	2,5µl	1. Initiale Denaturierung	94°C	2min
5'-Oligonukleotid	0,3pmol/µl	2. Denaturierung	94°C	15sec
3'-Oligonukleotid	0,3pmol/µl	3. Anlagerungsphase	50-65°C	30sec
10mM dNTPs	0,3mM	4. Synthesephase	68°C	1min/ kb
50mM MgSO ₄	1mM	5. Weitere 24-34 Zyklen beginnend bei 2.		
2,5U/µl <i>Pfx</i>	1-2,5U	6. Finale Synthesephase	68°C	10min
DNA-Matrize	100-200ng	7. Lagerung	4°C	dauerhaft
ddH ₂ O	ad 25µl			

3.1.4.2. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR dient der Identifikation von Bakterienklonen, die einen Vektor mit Insert tragen. Einzelne Bakterienkolonien wurden hierzu in 100µl LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum 15-30min bei 37°C inkubiert.

PCR-Ansatz		Übersicht über die Phasen und Zyklen		
10x <i>Taq</i> -Puffer	2,5µl	1. Initiale Denaturierung	94°C	2min
5'-Oligonukleotid	0,2pmol/ µl	2. Denaturierung	94°C	15sec
3'-Oligonukleotid	0,2pmol/ µl	3. Anlagerungsphase	50-65°C	30sec
10mM dNTPs	0,2mM	4. Synthesephase	72°C	1min/ kb
5U/ µl <i>Taq</i>	1U	5. Weitere 24 Zyklen beginnend bei 2.		
Bakteriensuspension	2µl	6. Finale Synthesephase	72°C	10min
ddH ₂ O	ad 25µl	7. Lagerung	4°C	dauerhaft

3.1.5. Aufreinigung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese

Die Gewinnung sauberer DNA-Fragmente erfolgt mit Hilfe der Auftrennung über ein Agarosegel. Die aufzureinigende DNA-Probe wurde elektrophoretisch aufgetrennt, das gewünschte DNA-Fragment auf einem UV-Illuminator mit einem X-Tracta ausgeschnitten und mit Hilfe eines Gelextraktions-Kits (Promega) aufgereinigt.

3.1.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

Die Klonierung von amplifizierten DNA-Fragmenten erfolgte zunächst mit dem TOPO-TA Cloning Kit nach Herstellerangaben (Invitrogen) als Grundlage zur Umklonierung.

3.1.6.1. Enzymatische Spaltung von Vektor-DNA bzw. DNA-Fragmenten durch Restriktionsendonukleasen

Die enzymatische Spaltung erfolgt nach Herstellerangaben der Restriktionsenzyme entsprechend der Klonierungsstrategie. Für analytische Ansätze wurden 1-2µg Plasmid-DNA gespalten und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (s. 3.1.3.1). Für präparative Ansätze (Klonierung) wurden 5µg Plasmid-DNA oder 3µg DNA-Fragment gespalten, aufgetrennt und aufgereinigt (s. 3.1.5).

3.1.6.2. Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um die Religation eines linearisierten Vektors (s. 3.1.6.1) zu verhindern, wurden die 5' -Phosphatgruppen mit der „calf intestinal“ alkalischen Phosphatase (CIP) entfernt. Dazu wurden 3-5µg linearisierte Plasmid-DNA mit 10U CIP für 1h bei 37° C inkubiert und anschließend bei 65°C für 15min inaktiviert. Auch hierbei erfolgt im Anschluss die Aufreinigung der linearisierten, dephosphorylierten Plasmid-DNA (s. 3.1.5).

3.1.6.3. Ligation eines DNA-Fragments mit einem Vektor

Durch die Ligation eines geschnittenen DNA-Fragments mit einem linearisierten dephosphorylierten Vektor erhält man ein Konstrukt, das für weitere Analysen verwendet werden kann. Bei dieser Reaktion wurden verschiedene molare Verhältnisse des Fragments zum Vektor (3:1 und 1:1) mit 400U T4-DNA-Ligase und frischem Ligationspuffer in 20µl Gesamtvolumen gemischt und ÜN bei 16°C inkubiert. Zur Kontrolle der Ligations- und anschließenden Transformationseffizienz wurde eine Negativkontrolle parallel angesetzt (0:1), die nur den geschnittenen Vektor, jedoch

nicht das DNA-Fragment enthält. Alle Ansätze wurden am nächsten Tag zur Transformation von chemokompetenten Bakterien verwendet (s. 3.1.6.5).

3.1.6.4. Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Bakterien

Es wurden 2ml ÜN-Kultur nicht transformierter Bakterien (s. 3.1.1) in 200ml LB-Medium gegeben und 2h bei 37°C im Schüttler angezogen. Nach der Kultivierung erfolgten alle nachfolgenden Schritte auf Eis. Die Bakterien wurden 10min bei 3000UpM abzentrifugiert, mit 30ml TFBI (s. 2.8) gewaschen und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 4ml TFBI (s. 2.8) gut resuspendiert, und die chemisch kompetenten Bakterien in 100µl Aliquots bei -80°C aufbewahrt.

3.1.6.5. Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Zur Amplifikation von Plasmidvektoren werden diese in Bakterien transformiert. Dazu wurde jeweils ein 100µl Aliquot chemokompetenter TOP10F' bzw. BL21 Bakterien auf Eis aufgetaut (s. 3.1.6.4). Diesem wurde ½ Ligationsansatz zugegeben, gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Es erfolgt ein Hitzeschock bei 42°C für maximal 2min mit sofortiger Abkühlung für 2min in Eiswasser. Den Bakterien wurde 400µl vorgewärmtes LB-Medium zugegeben und für 1h bei 37°C im Schüttler angezogen. Anschließend wurden zwei verschiedene Mengen des Ansatzes auf je eine LB-Agar-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien der Platten durch Kolonie-PCR (s. 3.1.4.2) oder Mini-Präparation und analytische Restriktion (s. 3.1.6.1) auf ein Insert getestet.

3.1.7. Zielgerichtete Mutagenese

Um zielgerichtet Mutationen in das FOXO4-Konstrukt einzufügen, wurde der QuikChange Multi Site-directed Mutagenese Kit (Stratagene) verwendet. Die synthetisierten Oligonukleotide (s. 2.10.4) wurden mit Hilfe der Primerdesign Software von Stratagene ausgewählt (www.stratagene.com/qcprimerdesign). Sie tragen die

gewünschten Mutationen und lagern sich an denselben Strang des Plasmids an. Mittels PCR nach Herstellerangaben wurde das FOXO4-Plasmid vollständig amplifiziert und das Ausgangsplasmid mit Hilfe des methylierungsspezifischen Enzyms DpnI abgebaut. Somit verblieb nur der neusynthetisierte nicht methylierte mutierte zirkuläre Einzelstrang, der in ultrakompetente XL 10-Gold-Zellen transformiert wurde.

3.1.8. DNA-Sequenzierung

Alle in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten DNA-Konstrukte wurden mittels BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben amplifiziert. Dazu wurden 300-400ng Ausgangsplasmid und je ein spezifischer Primer (s. 2.10.3) für die PCR Reaktion verwendet, diese anschließend gefällt, in 4µl ddH₂O + 16µl Formamid gelöst und mit dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer sequenziert.

3.1.9. RNA Isolierung und cDNA Synthese

Zur Isolierung von total RNA wurden die entsprechenden Zellen pelletiert, in 600µl RLT Plus Puffer mit 6µl β-Mercaptoethanol resuspendiert und nach Herstellerangaben mit dem RNeasy Plus Mini Kit und QIAshredder Säulen (Qiagen) präpariert. Die Qualität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.3.1) anhand der 18S und 28S rRNAs sowie mittels Konzentrationsbestimmung am Nanodrop (s. 3.1.3.2) kontrolliert. Zur cDNA Synthese wurden die M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus, Point Mutant (Promega) nach Herstellerangaben verwendet und von jeder RNA Probe 1µg eingesetzt. Als Oligonukleotid wurde der Oligo dT₃₀ benutzt. Auch wurde eine Negativkontrolle für die cDNA Synthese ohne RNA angesetzt (no template control - NTC). Die synthetisierten cDNAs wurden 1:10 verdünnt und je 2µl für eine β-Aktin Test-PCR verwendet.

3.1.10. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Für die Untersuchung der Expression von Zielgenen wurde unter Verwendung des SYBR Green JumpStart *Taq* ReadyMix (Sigma, München) folgende Reaktion angesetzt (s. 2.10.2):

PCR-Ansatz		Übersicht über die Phasen und Zyklen		
2x SYBR Green	6,25µl	1. Initiale Denaturierung	94°C	2min
100x ROX (1:20)	0,125µl	2. Denaturierung	94°C	20sec
5'-Oligonukleotid (10pmol/ µl)	0,375µl	3. Anlagerungsphase	65°C	30sec
3'-Oligonukleotid (10pmol/ µl)	0,375µl	4. Synthesephase	72°C	40sec
ddH ₂ O	3,375µl	5. Weitere 39 Zyklen beginnend bei 2.		
1:10 verdünnte cDNA	2µl	6. Dissoziation	95°C	15sec
Gesamtvolumen	ad 12,5µl		60°C	1min
			95°C	15sec
			60°C	15sec

Der Reaktionsansatz wurde in 96well Platten in Triplikaten angesetzt und die PCR-Reaktion im 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Unspezifische Produkte wurden mit Hilfe der Schmelzanalyse ausgeschlossen. Zur Quantifizierung mittels der $\Delta\Delta Ct$ Methode wurde auf jeder untersuchten Platte ein oder mehrere Haushaltsgene (β -Aktin, GAPDH, HPRT) mitgeführt.

3.2. Zellkultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen im CO₂-Inkubator bei 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%igem CO₂/ Luft-Gemisch.

3.2.1. Isolierung von Lymphozyten aus humanen Blutproben und Immortalisierung mit Epstein Barr Virus (EBV)

Das Patienten-Blut wurde in EDTA-Röhrchen abgenommen, 1:2 mit RPMI Medium resuspendiert und auf Bicolll geschichtet. Nach 1h 1400UpM Zentrifugation wurde der Lymphozytenring oberhalb der Bicolllschicht abgenommen, mit RPMI + 10% FCS gewaschen (10min 1400UpM) und in eine Kulturflasche mit 1:2 gemischtem LCL Medium + Cyclosporin A + EBV-Überstand geben und stehend kultiviert. Sobald das Medium gelb wurde, wurde in Abhängigkeit zur Zellexpansion Medium zugefügt. Nach ca. 6 Wochen waren die B-lymphoblastoiden Zellen (LCLs) selektiert und immortalisiert.

3.2.1.1. Fluoreszente Durchflusszytometrie der lymphoblastoiden B-Zellen

Bevor die LCLs für Experimente verwendet werden konnten, wurden sie auf ihre Lymphozyten Subpopulation getestet. Dazu wurden $0,5-1 \times 10^6$ Zellen abzentrifugiert in 100µl RPMI ohne Phenolrot resuspendiert und mit je 5µl CD56-FITC (Killerzellen), CD3-PerCP (T-Zellen), CD19-PE (B-Zellen) 15min im Dunkeln bei RT gefärbt. Die Färbung wurde mit 2ml PBS + 0,1% BSA gewaschen und in 200µl FACS-Puffer (Cell-Wash von BD) resuspendiert und Durchflusszytometer mit Hilfe einer Kooperation in der Hämatopathologie (AG von Rücker) gemessen.

3.2.2. Kultivierung von Suspensionskulturen

Die Kultivierung von lymphoblastoiden Zellen (LCLs) erfolgte in stehenden 75cm² Zellkulturflaschen in 25-150ml des entsprechenden Mediums bei 37°C. Die LCL-Suspensionskulturen wurden 1x die Woche abzentrifugiert und in frischem Medium aufgenommen. Je nach Dichte wurden Teile der Suspensionskultur abgenommen, gezählt (s. 3.2.4) und für Versuche ausgesät oder kryokonserviert (s. 3.2.5). Alle 4-5 Wochen wurden die LCLs auf einen Bicolldgradienten pipettiert und 1h bei 1400UpM abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde der Lymphoblastoidzellring zurück in die Kulturflaschen übertragen, während die sedimentierten Zelltrümmer verworfen wurden.

3.2.3. Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die Kultivierung adhärenenten Zellen erfolgte in liegenden 175cm² Zellkultur-flaschen in 20ml des entsprechenden Mediums. HeLa-Zellen wurden bei 37°C kultiviert und alle 2-3 Tage 1:20 passagiert. Die CSM14.1-Zelllinien wurden bei 33°C kultiviert und 1x die Woche 1:10 (4×10^6) passagiert. Beim Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin 5min bei 37°C abgelöst. Das entsprechende Volumen wurde in die Zellkulturflasche zurückgegeben und mit frischem Medium aufgefüllt. Die restliche Zellsuspension wurde gezählt (s. 3.2.4) und für Versuche ausgesät oder kryokonserviert (s. 3.2.5).

3.2.4. Bestimmung der Zellzahl

Von einer Zellsuspension wurden 10µl mit 90µl Medium verdünnt und 10µl der Verdünnung auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Es wurden jeweils vier Großquadrate ausgezählt und die Zellzahl berechnet.

3.2.5. Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Die beim Passagieren überzähligen Zellen wurden pelletiert (5min 1400UpM) und in Einfriermedium (s. 2.15.1) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen von -80°C auf Eis gestellt und anschließend in Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und im jeweiligen Zellmedium in einer Zellkulturflasche ausgesät.

3.2.6. Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen wurde mittels Lipofectamine 2000 Transfektionsreagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach 20h wurden die transfizierten Zellen behandelt (s. 3.2.9) und/ oder lysiert (s. 3.3.1).

3.2.7. Infektion von LCLs mit shRNA lentiviralen Partikeln

$2,5-5 \times 10^5$ LCLs wurden in $800\mu\text{l}$ pro 6well ausgesät und mit einer experimentell ermittelten Menge Viruspartikel, die das gewünschte shRNA Konstrukt enthalten, infiziert. Die Viruspartikel wurden von der AG Pfeifer (Life & Brain) präpariert und zur Verfügung gestellt. 24h später wurden 2ml Zellmedium zugefügt und die Zellen nach weiteren 2 Tagen abgeerntet. Die mit PBS gewaschen Zellpellets wurden anschließend zu Präparation von Zelllysaten (s. 3.3.1) verwendet.

3.2.8. Immunfluoreszenz und alkalische Phosphatase (AP) Färbung an HeLa-Zellen und Gewebeschnitten

Zur Immunzytochemie wurden Deckgläschen mit Ethanol sterilisiert, mit PBS gewaschen und 5mM Poly-L-Lysin beschichtet (30min 37°C). $0,1-2 \times 10^6$ HeLa-Zellen wurden auf den Deckgläschen in entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert (s. 3.2.6). Nach 24h wurden die Zellen mit eiskaltem

Methanol/Azeton (1:1) fixiert und dann gefärbt. Zur Färbung von humanem *Pons* Gewebe wurden Paraffinschnitte verwendet. Die Zellen bzw. die Gewebeschnitte wurden mit 1% BSA und 2% Gelatine 1-3h bei 4°C blockiert und anschließend 1-2h mit den gewünschten Primärantikörpern (s. 2.11.1) in derselben Lösung und der jeweiligen Verdünnung inkubiert. Die überschüssigen Primärantikörper wurden mit 3x PBS abgewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (s. 1.1.1) für 2h bei 4°C inkubiert, mit PBS und ddH₂O gewaschen und mit Mowiol eingedeckelt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200M) wurden die Färbungen ausgewertet und dokumentiert.

Zur Alkalischen Phosphatase Färbung wurden ein biotinylierter Sekundärantikörper und Streptavidin-AP Konjugat verwendet um NBT/ BCIP umzusetzen (s. 1.1.1). Die Färbungen wurden mit Hilfe eines Durchsichtmikroskops ausgewertet und aufgenommen.

3.2.9. H₂O₂-Behandlung von Zellen

Ausgesäte Zellen wurden je nach Zelltyp mit 100-500µM H₂O₂ für unterschiedliche Zeiträume behandelt und anschließend RNA (s. 3.1.9) oder Protein (s. 3.3.1) isoliert.

3.2.10. Messung reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) in LCL-Zellen

2,5 x10⁵ Zellen jeder einzelnen LCL-Zelllinie wurden mit frisch angesetzttem 100µM 2',7'Dichlorofluorescein (H₂DCF) für 1h bei 37°C lichtgeschützt in Eppis inkubiert. Die Zellen wurden pelletiert, 2x mit PBS gewaschen und dann in 100µl Triplikaten auf zwei 96well Platte pipettiert. Eine Platte wurde im Fluorometer bei 485nm angeregt und bei 530nm gemessen. Die durch H₂DCF Oxidation entstandene Fluoreszenz ist ein Indikator für reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) in der Zelle. Die zweite 96well Platte wurde mit 10µl Alamar Blau (1:10) versetzt, erneut 1-2h bei 37°C inkubiert und im Fluorometer bei 544nm angeregt und bei 590nm gemessen. Die gemessene Fluoreszenz ist proportional zur Anzahl lebender Zellen. Beide Werte wurden zur

Analyse der relativen ROS-Level in den Kontroll-LCLs im Vergleich zu den SCA3-LCLs miteinander in Verhältnis gesetzt.

3.2.11. Vitalitätstest

Es wurden 1Mio Zellen von jeweils 3 Kontroll- und 3 SCA3-LCLs in einem 6well ausgesät und an 4 nacheinander folgenden Tagen jeweils mit 100 μ M H₂O₂ behandelt (0, 24, 48, 72h). Pro Zelllinie und Zeitpunkt wurden je 100 μ l 1:2 mit Trypanblau Lösung gefärbt, 5min inkubiert und unter dem Mikroskop die lebenden (transparent) und toten Zellen (blau) ausgezählt.

3.2.12. Reporteranalysen

1 x 10⁵ HeLa-Zellen wurden pro 24well einer Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 150ng des angegebenen Firefly-Luziferase-Reportergenkonstruktes, 5ng des Renilla-Luziferase-Reportergenkonstruktes und weiteren Proteinexpressionskonstrukten transfiziert (s. 3.2.6). Nach 24h wurde die Luziferaseaktivität durch das Dual-Luziferase Reporteranalyse System (Promega) nach Angaben des Herstellers im Luminometer (Berthold) gemessen. Von jeder Transfektionsvariante wurden je vier unabhängige Ansätze angefertigt. Die Firefly-Luziferaseaktivität wurde auf die Renilla-Luziferaseaktivität normalisiert. Die Expression der transfizierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (s. 3.3.4) und Western-Blot (s. 3.3.5) überprüft.

3.3. Proteinbiochemische Methoden

3.3.1. Proteinlysate

Zur Gewinnung von Proteinen wurde bei adhärennten Zellen das Medium abgesaugt und mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden die Zellen in Lysispuffer abgeschabt und in ein Eppi auf Eis überführt. Bei Suspensionskulturen wurden die Zellen bei 1000xg 5min abzentrifugiert, das Medium verworfen, in eiskaltem PBS resuspendiert, wieder abzentrifugiert und dann in Lysispuffer resuspendiert. Gewebe wurde sofort mit Lysispuffer versetzt und mit dem Homogenisator zerkleinert. Fertige Proteinlysate wurden bis zur Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

3.3.1.1. Gesamtzelllysate mit RIPA-Lysispuffer

Die Zellsuspension wurde mit RIPA-Lysispuffer (s. 2.8) hergestellt. Die Zellen oder das homogenisierte Gewebe wurden mechanisch durch eine Kanüle der Breite 21Gauge zerkleinert. Die resuspendierten Zellen wurden 15min auf Eis inkubiert und immer wieder gevortext. Die Zellsuspension wurde bei 4°C 12000xg für 10min abzentrifugiert und der Überstand, der dem Zelllysate entspricht, in ein neues Eppi überführt. Das Pellet wurde verworfen.

3.3.1.2. Zytoplasmatische und nukleäre Fraktionierung von Proteinen (nach BioTechniques, 2001)

Die Zellen wurden mit Puffer A (s. 2.8) gewaschen. Zum Aufschluss des Zytoplasmas wurden die Zellpellets mit Puffer A + 0,1% Triton X100 resuspendiert. Bei Gewebeproben wurden diese sofort in Puffer A + 0,1% Triton X100 homogenisiert. Die Suspension wurde 10min auf Eis inkubiert, 5min bei 4°C 2000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt. Er entspricht dem zytoplasmatischen Extrakt. Das übrig gebliebene Pellet wurde in 1-2x Pelletvolumen Puffer B (s. 2.8) gevortext,

30min auf Eis inkubiert und 20min bei 4°C 16000xg zentrifugiert. Der Überstand, das nukleäre Extrakt (NE), wurde in ein neues Eppi überführt und das Pellet verworfen.

3.3.2. Photometrische Proteinkonzentrationsbestimmung (Bradford *et al.*, 1976)

Der Bradford-Test kann Proteinkonzentrationen zwischen 2-200ng/ µl bestimmen. Zur Messung der Proteinkonzentrationen muss eine Standardkurve anhand von Proteinstandards erstellt werden. Hier wurden BSA-Proteinstandards (0,00µg/ µl, 0,02µg/ µl, 0,04µg/ µl, 0,08µg/ µl, 0,12µg/ µl, 0,16µg/ µl, 0,20µg/ µl, 0,24µg/ µl) verwendet. Die zu messenden Proteinproben wurden 1:250 verdünnt und dann jeweils 3x 50µl (entspricht 1:5) in eine 96well-Platte pipettiert. Auch von den Proteinstandards (0µg, 1µg, 2µg, 4µg, 6µg, 8µg, 10µg, 12µg) wurde je 3x 50µl aufgetragen. Zu jeder Probe wurden 150µl 1:5 verdünnter Bio-Rad Protein Assay zugefügt und 5-8min inkubiert. Die Messung erfolgte mit dem Mikrotiterplattenleser Optimax bei 595nm.

3.3.3. Koimmunpräzipitation (IP)

Bei der Koimmunpräzipitation werden mit Hilfe eines Antikörpers ein spezifisches Protein und dessen Interaktionspartner präzipitiert. Dazu wurden 400µg Protein in eiskalten 400µl IP-Puffer mit dem jeweiligen Antikörper bei 4°C 1h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Als IP-Puffer wurde bei stringenter Kondition RIPA-Puffer und bei weniger stringenter Kondition Low-Salt-Puffer verwendet (s. 2.8). Als Negativkontrolle wurde ein IgG-Antikörper der Spezies eingesetzt, in der der spezifische Antikörper hergestellt worden ist. Nach der Inkubation wurden jedem IP-Ansatz 50µl 50% Protein G Sepharose 4 Fast Flow Suspension (Beads) zugefügt und ÜN bei 4°C auf den Überkopfschüttler inkubiert. Die Beads wurden vor der Zugabe durch 3x waschen mit dem jeweiligen IP-Puffer von Ethanol befreit. Am nächsten Tag wurden die IP-Ansätze bei 4°C 12000xg für 20sec abzentrifugiert, mit jeweils 1ml IP-Puffer 3x gewaschen und 1x mit IP-Waschpuffer. Zur Elution der Proteinkomplexe von den Beads wurde jedem IP-Ansatz 30µl 2x Lämmli-Puffer (1x Beadvolumen) zugefügt, gevortext

und 5min bei 95°C aufgeköcht. Die Proben wurden bei 4°C 12000xg für 20sec abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppi überführt.

3.3.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird die SDS-PAGE, ein diskontinuierliches System aus zwei Gelen eingesetzt. Das Sammelgel konzentriert die Proteinproben und das Trenngel trennt sie nach ihrem Molekulargewicht auf. Für die SDS-PAGE wurde ein 10%iges Trenngel und ein 7,5%iges Sammelgel über das Trenngel gegossen. Den Abschluss bildete ein Kamm, der die Taschenanzahl und -größe bestimmt. Je 50µg Protein wurden mit 2x oder 4x Lämmli-Puffer (s. 2.8) und Wasser auf ein Volumen von 20-40µl aufgefüllt und 5min bei 95°C aufgeköcht. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Proben neben einem Längenstandard auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Die SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine im PAGE-Puffer (s. 2.8) erfolgte zuerst bei 80V im Sammelgel und bei 120V im Trenngel. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront am Gelende angekommen war.

3.3.5. Coomassie-Brilliant-Blau Färbung

Zum Nachweis von Proteinen im SDS-Gel wurde mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Der Farbstoff legt sich in die basischen Seitenketten der Aminosäuren und färbt Proteine unspezifisch bei einer Nachweisgrenze von ca. 100ng pro Bande. Das Gel wurde in der Coomassie-Färbelösung (s. 2.8) kurz in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und auf dem Schüttler bei RT inkubiert. Durch anschließende Entfärbung in Coomassie-Entfärber (s. 2.8) wurden die Proteinbanden sichtbar.

3.3.6. Western-Blot

Der Western-Blot ist ein Verfahren zur elektrischen Übertragung von negativ geladenen Proteinen (s. 3.3.4.) auf eine Nitrozellulose- oder PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran. Die Übertragung macht im Anschluss den Nachweis von spezifischen Proteinen mit Hilfe von markierten Antikörpern möglich. Die aufgetrennten Proteine wurden in der Western-Blot Kammer Mini-Trans-Blot Cell (Biorad Laboratories GmbH, München) bei 110V (400mA) 1h unter Kühlung des Blotpuffers (s. 2.8) auf eine 0,2µm Nitrozellulosemembran transferiert. Alle für den Blot notwendigen Bestandteile wurden im Voraus in Blotpuffer eingelegt.

3.3.7. Ponceau S Färbung

Nach dem Blotten können Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung (s. 1.8) sichtbar gemacht werden. Dafür wurde die Membran für ca. 1min in 1x Ponceau S-Lösung getaucht und die überschüssige Farbe mit ddH₂O ausgewaschen. Die Ponceau S-Färbung ist eine reversible Färbung und der Blot kann für den immunologischen Nachweis weiterverwendet werden.

3.3.8. Immundetektion mittels Chemilumineszenz

Die Nitrozellulosemembran wurde 1h bei RT in Blocklösung (s. 2.8) inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Es folgte die ÜN Inkubation mit dem gewünschten Primärantikörper in der entsprechenden Konzentration verdünnt. Am nächsten Tag wurde die Nitrozellulosemembran 3x 5min mit PBST gewaschen, um den überschüssigen, ungebundenen Antikörper auszuwaschen. Danach wurde die Membran 1h bei RT mit dem Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundärantikörper in der entsprechenden Konzentration inkubiert. Nachfolgend wurde erneut 3x 5min PBST abgewaschen und mit dem ECL System detektiert. Dazu wurden gleiche Volumina von ECL1 und ECL2 mit einander vermischt, gleichmäßig auf

der Membran verteilt, 1min zwischen zwei Klarsichtfolien inkubiert und die Membranen mit Röntgenfilmen exponiert. Die Belichtungszeit lag zwischen 1sec und 1h. Die Quantifizierung immundetektierter Proteinbanden erfolgte nach Scannen der belichteten Filme mit der QuantityOne Software (Biorad).

3.3.9. Rekombinante Proteinexpression

3.3.9.1. Expression und Aufreinigung von GST-ATXN3-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von Gluthation-S-Transferase (GST)-ATXN3-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie wurden verschiedene Expressionskonstrukte in BL21 Bakterien transformiert. Verschiedene Klone wurden auf ihre Expression getestet und der beste Klon zur Expression verwendet. Es wurde 1l LB-Ampizillin-Medium im Schikanekolben mit 50ml ÜN Kultur des gewünschten Expressionskonstruktes angeimpft. Zur Kultivierung erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Schüttler bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7. Durch Zugabe von 0,1-1mM IPTG (je nach Konstrukt) wurde die Expression induziert und die Zellen für weitere 2-4h bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation bei 4000rpm 4°C 1h geerntet, in 5x Volumen des Pelletgewichts [g] in GST-Bakterienlysispuffer resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von Benzonase (150000U), Lysozym (2,5mg/ ml) sowie 1% Triton X100 mit anschließender Inkubation von 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler. Zur vollständigen Lyse wurde 10x 30sec im Eisbad sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden bei 30000g 30min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 2ml 50% gewaschenen GST-Sepharose-Beads 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Säule überführt, mit je 10ml GST-Proteinexpression-Waschpuffer sowie GST-Bakterienlysispuffer gewaschen und mit 10ml GST-Proteinexpression-Elutionspuffer in 10 Fraktionen eluiert. Mittels SDS-PAGE (s. 3.3.4) und Coomassie (s. 3.3.5) bzw. Western-Blot (s. 3.3.6) wurden die Elutionsfraktionen analysiert und entsprechend des enthaltenen Proteins vereinigt.

3.3.9.2. Expression und Aufreinigung von His-FOXO4-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von 6x Histidin (His)-FOXO4-Fusionsproteinen wurden auch hier verschiedene Expressionskonstrukte in BL21 Bakterien transformiert. Nach dem Expressionstest der verschiedenen Klone wurde 1l LB-Ampizillin-Medium im Schikanekolben mit 50ml ÜN-Kultur des gewünschten Klons des Expressionskonstruktes angeimpft. Bei einer OD_{600} von ca. 0,6 wurde durch Zugabe von 1mM IPTG die Expression induziert und die Zellen für weitere 4h bei 37°C kultiviert. Die Bakterien wurden geerntet, in 5x Volumen des Pelletgewichts [g] in His-Bakterienlysispuffer resuspendiert. Nach der Lyse mit Benzoase (150000U), Lysozym (2,5mg/ml) sowie 1% Triton X100 für 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler, wurde die Suspension 10x 30sec im Eisbad sonifiziert. Die Zelltrümmer wurden bei 30000xg 30min bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit 2ml 50% gewaschenen Nickel-NTA-Agarose-Beads 30min bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Säule überführt, mit je 2x 10ml His-Bakterienlysispuffer gewaschen und mit 10ml His-Proteinexpression-Elutionspuffer in 10 Fraktionen eluiert, analysiert (s. 3.3.4, 3.3.5, 3.3.6) und vereinigt.

3.3.9.3. Dialyse von aufgereinigtem rekombinatem Protein

Die Dialyse von rekombinatem Protein erfolgte in Dialyseschläuchen eine Nacht und einen Tag lang bei 4°C unter zweimaligem Austausch des Dialysepuffers (s. 2.8). Die dialysierten Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

3.3.9.4. Proteinkonzentrationsbestimmung für rekombinante Proteine

Neben der groben Abschätzung der Proteinkonzentrationen durch die Proteinbestimmung nach Bradford (s. 3.3.2), wurden die rekombinaten Proteine photometrisch mittels UV-Absorptionsmessung bei 280nm unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Extinktion $E = \epsilon \cdot c \cdot d$) bestimmt. Der jeweilige theoretische molare Extinktionskoeffizient ϵ wurde mit Hilfe des Programmes

ProtParam vom ExPASy Proteomics Server ermittelt (www.expasy.org/tools/protparam.html). Anhand einer Coomassie-Färbung (s. 3.3.5) wurde der Anteil an degradiertem Protein abgeschätzt und die Proteinkonzentration entsprechend angepasst.

3.3.9.5. Proteinpräzipitation über GST-Epitope (GST-Pulldown)

Zum Nachweis der Protein-Protein-Interaktion wurden interagierende Proteine aus Proteinlysaten über rekombinantes GST-ATXN3-Fusionsprotein präzipitiert (GST-Pulldown - PD). Dazu wurden 0,05µM GST-ATXN3-Fusionsprotein in 400µl RIPA-Puffer mit 50µl gewaschene 50% GST-Sepharose-Beads 1h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler präinkubiert. Das gebundene GST-Fusionsprotein wurde mit den Beads abzentrifugiert (2min 500xg) und in 400µl RIPA-Puffer ÜN bei 4°C mit 400µg nukleärem Extrakt inkubiert. Am nächsten Tag wurden die PD-Ansätze bei 4°C 2min 500xg abzentrifugiert, mit jeweils 1ml RIPA-Puffer 3x gewaschen und 1x mit IP-Waschpuffer. Zur Elution der Proteinkomplexe von den Beads wurde jedem PD-Ansatz 30µl 2x Lämmli-Puffer (1x Beadvolumen) zugefügt, gevortext und 5min bei 95°C aufgekocht. Die Proben wurden bei 4°C 12000xg für 20sec abzentrifugiert und der Überstand, die eluierten Proteine, in ein neues Eppi überführt.

3.3.9.6. Protein *in vitro* Interaktion

Zur Feststellung der direkten Protein-Protein-Interaktion wurden die beiden Proteine mit verschiedenen Tag-Epitopen rekombinant exprimiert. Das jeweilige GST-ATXN3-Fusionsprotein wurde mit einer Konzentration von 0,05µM wie beim GST-PD an die GST-Sepharose-Beads gebunden und ÜN mit 0,05µM His-FOXO4-Fusionsprotein in Puffer mit 1mg/ml Ovalbumin inkubiert. Am zweiten Tag wurde wie beim GST-PD verfahren.

3.4. Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor Interaktionsarray

3.4.1. Nukleäre Extraktion

Zur Identifizierung von interagierenden Transkriptionsfaktoren wurde zuerst nukleäres Extrakt (NE) aus CSM-Q23 und CSM-Q70-Zellen präpariert. Dazu wurden je Zelllinie eine 10cm Schale ausgesät und die Zellen nach ca. 3 Tage Expression der stabil transfizierten Konstrukte durch Tetrazyklin Entzug geerntet. Das Medium wurde abgesaugt, die Schalen mit je 5ml eiskaltem PBS/ Phosphatase Inhibitoren/ CM gewaschen, abgeschabt, abzentrifugiert und in 500µl hypotonischem Puffer resuspendiert. Die Präparation des nukleären Extraktes erfolgt mittels Nuclear Co-IP Kit nach Herstellerangaben.

3.4.2. Sondenbindung an die Proteinkomplexe (nach TF-TF TranSignal™ Interaction Arrays von Panomics)

Nach der Proteinkonzentrationsbestimmung (s. 3.3.2) wurden 400µg nukleäres Extrakt von CSM-Q23, CSM-Q70 und das HeLa-Kontrolllysat nach Herstellerangaben mit biotinmarkierten Sonden (TranSignal TF-TF Sonden Mix) inkubiert.

3.4.3. Immunpräzipitation (IP) von DNA/ Proteinkomplexen (nach TF-TF TranSignal™ Interaction Arrays von Panomics)

Die an nukleäres ATXN3 gebundenen Sonden wurden nun mittels Immunpräzipitation (IP) isoliert. Dazu wurden die verschiedenen Antikörper (3µl 1:10 verdünnter NT-ATXN3 bzw. 1µg Kaninchen-IgG-Antikörper) mit 75µl von den verschiedenen nukleären Extrakten pro Sonde ad 500µl IP-Inkubationspuffer gelöst. Die Proben wurden 1h bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Währenddessen wurden die Protein G MicroBeads vorbereitet. 50µl 50% Beads wurden je angesetzt IP 3x mit 200µl IP-

Waschpuffer gewaschen, in 40µl IP-Waschpuffer resuspendiert und nach Ablauf der Inkubationszeit zu den IPs zugefügt. Die Suspensionen wurden ÜN bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 2sec bei 4°C und 2000UpM abzentrifugiert, in µSäulen überführt und dreimal mit je 500µl IP-Waschpuffer/ 3% BSA sowie dreimal mit je 500µl IP-Waschpuffer bei 4°C gewaschen. Zur Elution der Sonden wurden 60µl vorgewärmter Elutionspuffer zu den Beads zugegeben und bei 100°C für 5min eluiert, 2min auf Eis inkubiert und dann 5sec bei 2000UpM abzentrifugiert. Im Überstand waren nun die eluierten biotinmarkierten Sonden, die an den ATXN3-Komplex bzw. Kaninchen-IgG-Komplex gebunden hatten.

3.4.4. Hybridisierung mit den Arraymembranen

Zur Identifikation der interagierenden Transkriptionsfaktoren wurden die Arraymembranen mit den eluierten biotinmarkierten Sonden hybridisiert. Jede Membran repräsentiert 345 „antisense“ Konsensusmotive von verschiedenen Transkriptionsfaktoren. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte nach Herstellerangaben (Panomics).

3.4.5. Analyse der Dotblots

Die Ergebnisse der Dotblots wurden mit der QuantityOne Software densitometrisch auf ihre Signalintensität ausgewertet und anschließend auf das Signal der Kaninchen-IgG Negativkontroll-IP entsprechend der verwendeten Lysate normiert (Signal wurde subtrahiert). Da der Array nur 5 Ansätze umfasste, wurde auf die Negativkontrolle (Kaninchen-IgG) des HeLa-Lysats (Positivkontrolle) verzichtet und auf die Negativkontroll-IP von CSM-Q23 normiert. Die resultierenden Signale wurden mit Hilfe einer Schablone dem Konsensusmotiv eines Transkriptionsfaktors zugeordnet. Um die Signifikanz der Ergebnisse zu erhöhen, wurde ein Grenzwert festgelegt, der die geringste Signalintensität auf >5 setzte.

3.5. "Electrophoretic Mobility Shift Assay" (EMSA)

Die Methode des EMSA dient dem Nachweis von DNA bindenden Proteinen. Hierbei werden Proteine mit doppelsträngigen DNA-Fragmenten bekannter Sequenz inkubiert. Die DNA/ Proteinkomplexe werden nativ in einen Polyacrylamidgel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Durch vorherige Markierung der DNA über radioaktive Isotope oder Fluoreszenzfarbstoffe können die DNA enthaltenen Komplexe im Gel sichtbar gemacht werden.

3.5.1. Radioaktive Sondenherstellung

Zur Herstellung von doppelsträngiger DNA wurden „sense“ und „antisense“ Oligonukleotide (s. 2.10.1) des gewünschten Transkriptionsfaktor-Konsensusmotivs dimerisiert. Der Ansatz bestand jeweils aus 5µl „sense“, „antisense“ Oligonukleotid (100pmol/ µl) und 40µl Tris pH 8,0, wurde 1min bei 65°C im Wasserbad inkubiert, das Wasserbad ausgeschaltet und der Ansatz ÜN im Wasserbad auf RT abkühlen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Dimere radioaktiv markiert, indem die T4-Polynukleotid-Kinase einen radioaktiven Phosphatrest jeweils an das 5'-hydroxyl-Ende der Dimere anhing. Der Ansatz (1µl 10pmol/ µl Oligodimer, 2µl 10x Kinase-Puffer, 2,5µl (~25µCi) $\gamma^{32}\text{P}$ ATP, 1µl T4-Polynukelotid-Kinase (10U) ad 20µl ddH₂O) wurde auf Eis pipettiert und 30min bei RT inkubiert und 10min bei 65°C im Heizblock erhitzt. Zur Aufreinigung der Sonde wurde eine Probe Quant G-50Micro Säule nach Herstellerangaben verwendet. Der Elutionsschritt wurde mit 30µl ddH₂O wiederholt. 1µl der aufgereinigten Sonde wurde in einem Messgerät gemessen. Die radioaktive Sonde konnte bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

3.5.2. Native Gelelektrophorese (colourless native – PAGE)

Für ein 8%iges natives Polyacrylamidgel wurden 7ml 5x TBE, 18,7ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid, 43,7ml ddH₂O, 525µl 10% APS, 52,5µl TEMED gemischt und das Gel gegossen. Nach Polymerisation des Gels (eventuell ÜN), wurde es 30min bei 350V mit 0,5x TBE Laufpuffer ohne Proben laufen gelassen. Je Probenansatz wurden 20µg Protein mit Kompetitorsonde (nicht radioaktiv) oder Antikörper zusammen mit ddH₂O auf 10µl Gesamtvolumen (2µl 5x Bindungspuffer und radioaktiv markierte Sonde mit einberechnet) auf Eis zusammenpipettiert und 1h präinkubiert. Dann wurden 2µl 5x Bindungspuffer und die radioaktiv markierte Sonde zu den Ansätzen beigefügt und weitere 20min auf Eis inkubiert. Zur optimalen Kontrolle unspezifischer Komplexe wurden folgende Ansätze gefahren:

Probe	ddH ₂ O	5x Puffer	Protein	Kompetitor	Antikörper	³² P markierte Sonde
1	x	x				x
2	x	x	x			x
3	x	x	x	x		x
4	x	x	x		x	x

Die einzelnen Proben wurden auf das Gel aufgetragen und ca. 90min bei 350V und RT elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 90-120min im Geltrockner auf ein Whatmanpapier getrocknet und Röntgenfilmen für verschiedene Zeitspannen ausgesetzt. Um die Expositionszeit zu verkürzen konnte zusätzlich ein Intensifier-Screen auf die Röntgenfilme gelegt werden und die Filmkassette bei –80°C während der Exposition gelagert werden.

3.6. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zur Untersuchung ob ATXN3 auf dem SOD2 Promotor bindet wurden Chromatin-Immunpräzipitationen mittels SimpleChIP Enzymatic IP Kit (NEB) durchgeführt.

3.6.1. Chromatinpräparation aus LCL-Zelllinien

Zur Präparation von Chromatin aus LCLs wurden für die Kontrollen 80Mio und für die SCA3-Linien 160Mio Zellen verwendet. Da die Zellen in Suspensionskultur kultiviert werden, wurden die Herstellerangaben des Präparationsprotokolls auf 2x 50ml Falcons je Ansatz angepasst und durchgeführt. Die optimale Menge von 1µl *Micrococcal* Nuklease pro Ansatz wurde in Testansätzen experimentell festgestellt. Die erhaltene Chromatinkonzentration wurde nach Herstellerangaben bestimmt und dessen optimale Fragmentierung über Agarosegelelektrophorese (s. 3.1.3.1) untersucht.

3.6.2. Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Zur ChIP wurden jeweils 20µg Chromatin pro IP verwendet. Zur Präzipitation wurden je Chromatinprobe 4-10µg ATXN3-Antikörper, 4-10µl H3-Antikörper als Positivkontrolle und 1µg Kaninchen-IgG-Antikörper als Negativkontrolle benutzt. Die ChIP wurde nach Herstellerangaben ausgeführt und aufgereinigt.

3.6.3. Quantitative PCR zur Analyse der ATXN3 Proteinbindung am SOD2-Promotor

Das präzipitierte Chromatin wurde 1:10 verdünnt und mit Hilfe von qPCR (s. 1.1.1) analysiert, die auf die Kontroll-ChIP bezogen wurden.

4. ERGEBNISSE

4.1. Suche nach ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren

4.1.1. Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarray

Um die transkriptionelle Funktion von ATXN3 näher zu untersuchen, wurde nach Transkriptionsfaktoren gesucht, die mit ATXN3 im Zellkern interagieren und einen DNA/ Proteinkomplex bilden. Zur Identifikation solcher Transkriptionsfaktoren wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarray durchgeführt. Hierfür wurden nukleäre Extrakte mit biotinmarkierten Oligonukleotiden inkubiert, die 345 verschiedene Konsensusmotive unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren repräsentieren. Die gebundenen Oligonukleotide wurden mittels ATXN3-spezifischen Antikörpers als ATXN3-enthaltende DNA/ Proteinkomplexe immunpräzipitiert und nach Elution mit einer Arraymembran hybridisiert. Die Arraymembranen sind so genannte Dotblotmembranen, auf denen die „antisense“ Konsensusmotive der 345 Transkriptionsfaktoren gebunden sind. Nach Entwicklung der Membranen könnten die positiven Signale den entsprechenden Transkriptionsfaktoren zugeordnet werden.

4.1.1.1. Überprüfen und Herstellen geeigneter nukleärer Extrakte für den Interaktionsarray

Die transgenen mesenzephalen Rattenzelllinien CSM14.1-ATXN3Q23 (CSM-Q23) und CSM14.1-ATXN3Q70 (CSM-Q70) (Evert *et al.*, 1999) wurden verwendet, um nukleäre Extrakte herzustellen. Die Zelllinien weisen eine stabile Expression des normalen und expandierten, humanen Vollängen-ATXN3 auf. Vor der Inkubation mit den Oligonukleotiden wurden die nukleären Extrakte auf ihre Eignung für den

Interaktionsarray überprüft. Dazu wurden Immunpräzipitationen mit den nukleären Extrakten und NT-ATXN3-Antikörper durchgeführt und anschließend mittels SDS-PAGE sowie Western-Blot analysiert (s. Abbildung 4.1). Als Negativkontrolle wurde dabei Kaninchen-IgG-Antikörper verwendet, da der NT-ATXN3-Antikörper aus Kaninchen-Serum gewonnen wurde. Mit den nukleären Extrakten aus CSM-Q23- und CSM-Q70-Zellen konnte sowohl überexprimiertes humanes ATXN3Q23 und ATXN3Q70, als auch endogenes ATXN3 der Ratte mit dem NT-ATXN3-Antikörper präzipitiert werden. Dagegen wurde mit der Negativkontroll-Immunpräzipitation (IgG) kein immunreaktives ATXN3 im Western-Blot nachgewiesen. Darüber hinaus konnte in den nukleären Extrakten bei diesen Immunpräzipitationen auch der bereits bekannte Interaktionspartner die Histondeazetylase-3 (HDAC3) kopräzipitiert werden, so dass sich die ATXN3-enhaltenden Proteinkomplexe grundsätzlich zur Analyse interagierender Faktoren eignen.

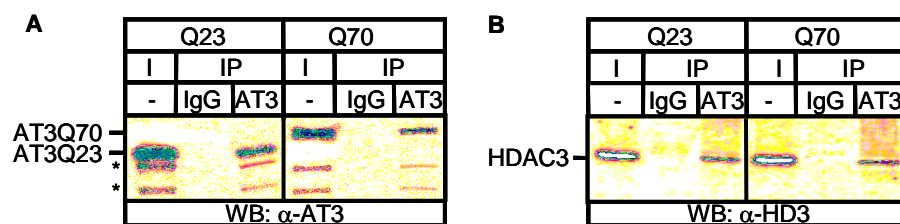


Abbildung 4.1: ATXN3-spezifische Immunpräzipitationen mit nukleären Extrakten aus CSM-Q23 und -Q70-Zellen. **A.** In beiden CSM14.1-Zelllysaten ließen sich sowohl überexprimiertes humanes als auch endogenes Ratten-ATXN3 immunpräzipitieren. **B.** In denselben Immunpräzipitationen wurde außerdem der bekannte Interaktionspartner HDAC3 mit ATXN3 kopräzipitiert (Evert *et al.* 2006). Sterne (*) bezeichnen endogenes Ratten-ATXN3, während Striche (-) die überexprimierten Varianten von ATXN3 kennzeichnen. Q23 – CSM-Q23; Q70 – CSM-Q70; I – Input; IP – Immunpräzipitation; IgG – IgG-Antikörper; AT3 – ATXN3; WB – Western-Blot; AT3Q23 – ATXN3Q23; AT3Q70 – ATXN3Q70; HD3 – HDAC3; α- Antikörper.

4.1.1.2. Dotblotanalyse

Die überprüften nukleären Extrakte wurden anschließend für den Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarray verwendet. Als Positivkontrolle für die CSM14.1-Zellysate wurde ein im Kit enthaltenes nukleäres Extrakt aus HeLa-Zellen eingesetzt. Nach Inkubation der Zellysate mit den biotinmarkierten spezifischen DNA-Sonden, wurden die einzelnen Ansätze jeweils mit Kaninchen-IgG- und NT-ATXN3-Antikörpern immunpräzipitiert. Anschließend wurden die eluierten Sonden mit den Arraymembranen hybridisiert, mit streptavidingekoppelter Meerrettrich-Peroxidase entwickelt und über die positiven Signale auf der Dotblotmembran die interagierenden Transkriptionsfaktoren identifiziert. Am unteren und rechten Rand jeder Membran befanden sich dabei so genannte Positivkontrollpunkte, um die Entwicklung der Membranen zu überprüfen und die Zuordnung der Signale zu ermöglichen. Alle hybridisierten Membranen zeigten eine gleichmäßige Entwicklung der Positivkontrollpunkte und wiesen darüber hinaus auch spezifische Signale auf, die potenzielle ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren darstellten (s. Abbildung 4.2).

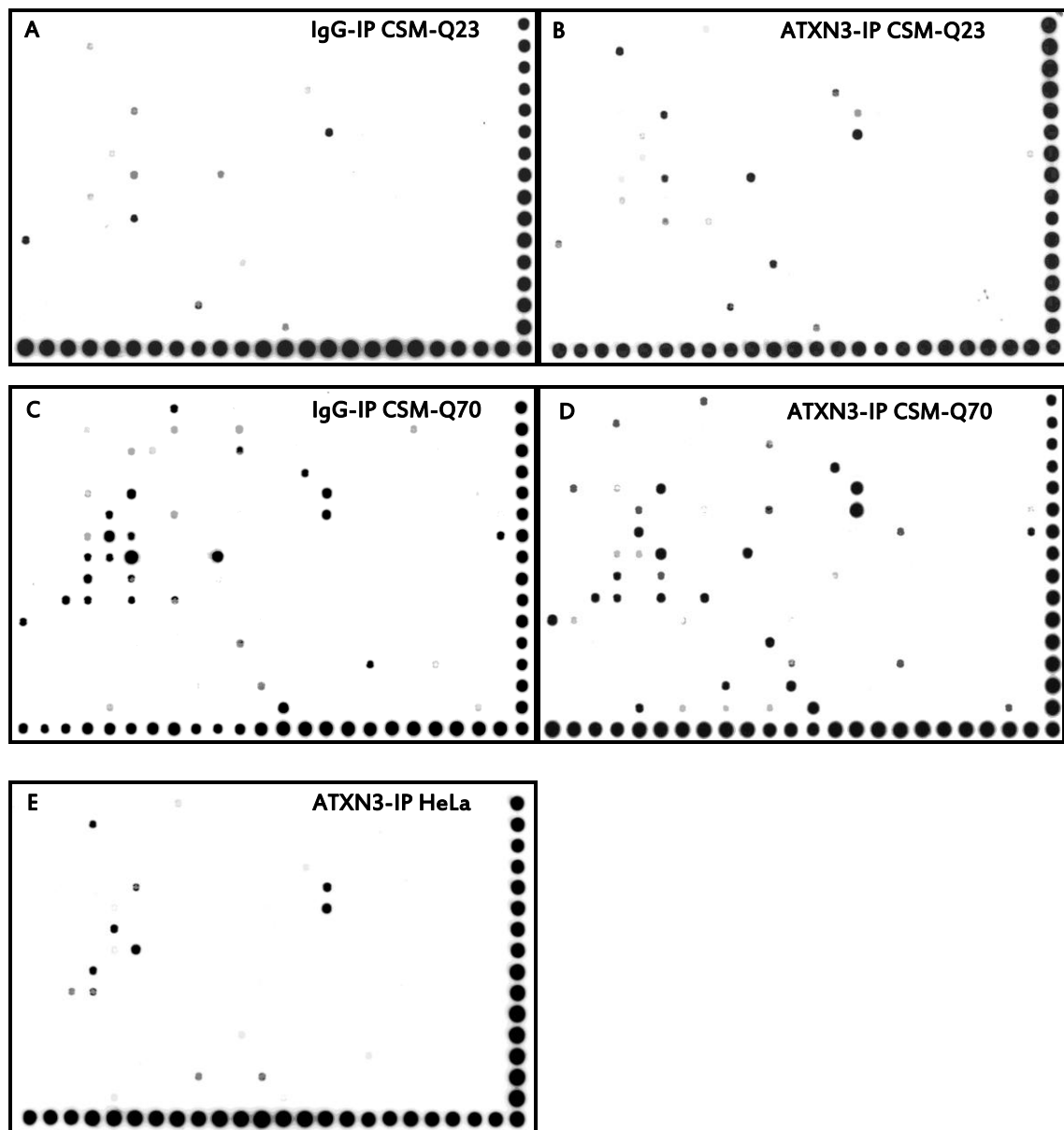


Abbildung 4.2: Hybridisierte Arraymembranen der immunpräzipitierten DNA-Sonden aus CSM-Q23, CSM-Q70 und HeLa. **A+C.** Signale der mit dem Kaninchen-IgG-Kontrollantikörper präzipitierten DNA-Sonden aus CSM-Q23 und CSM-Q70 nukleärem Extrakt. **B+D+E.** Signale der mit dem NT-ATXN3-Antikörper präzipitierten DNA-Sonden aus CSM-Q23, CSM-Q70 und der HeLa-Positivkontrolle. Die in der NT-ATXN3-Immunpräzipitation erhaltenen Signale wurden mit denen der entsprechenden IgG-Immunpräzipitationen normiert. Die unteren und rechten Ränder jeder Membran stellen Positivkontrollpunkte für die Detektion dar. IgG-IP – Negativkontrolle für die Immunpräzipitation mit einem IgG-Antikörper; ATXN3-IP – ATXN3-spezifische Immunpräzipitation.

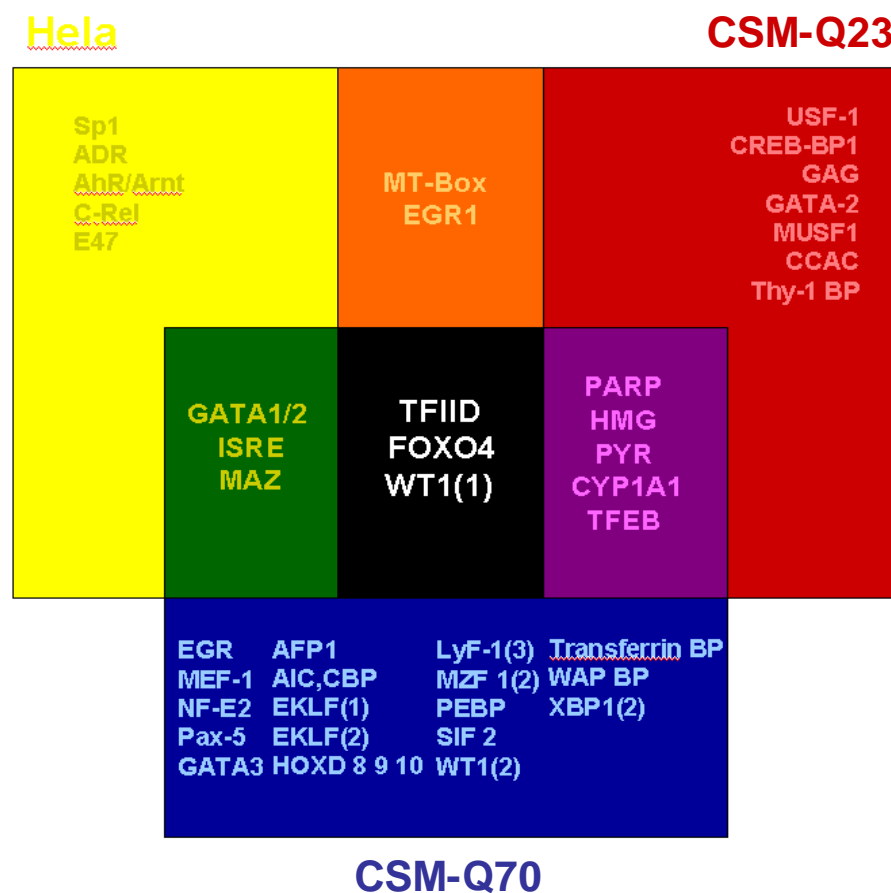


Abbildung 4.3: Übersicht der identifizierten Transkriptionsfaktoren, die aus der Analyse des Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarrays resultierten. Das Bild zeigt drei Großquadrate, die den jeweiligen Zelllysaten entsprechen, gelb für HeLa-Zellen, rot für CSM-Q23-Zellen und blau für CSM-Q70-Zellen. Die Überlappungen der drei Großquadrate sind in den Mischfarben der jeweiligen Großquadrate dargestellt (orange, lila, grün und schwarz) und zeigen die Transkriptionsfaktoren, die in jeweils zwei oder allen drei Zelllinien mit ATXN3 gefunden wurden. Im schwarzen Kleinquadrat sind die Transkriptionsfaktoren dargestellt, deren Konsensusmotive in allen drei Zelllinien mit ATXN3 immunpräzipitiert werden konnten.

Die einzelnen Intensitäten der spezifischen positiven Signale wurden densitometrisch vermessen und ausgewertet. Dabei wurden jeweils die Signale der ATXN3-spezifischen Membran (NT-ATXN3-IP) eines nukleären Extraktes mit denen der Negativkontrollmembran (IgG-IP) normiert und ein Minimalwert von 5 [Signalintensität/ mm²] festgelegt. Es konnten 42 potenzielle ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren identifiziert werden (s. Abbildung 4.3). Dabei ergaben sich sowohl Kandidaten, die nur in einer der drei Zelllinien vorkamen (s. Großquadrate in gelb, rot und blau), als auch Kandidaten, die in zwei (s. Kleinquadrate in orange, lila und

grün) oder in allen drei Zelllinien (s. Kleinquadrat in schwarz) immunpräzipitiert werden konnten.

Im Weiteren wurde auf den Transkriptionsfaktor IID (TFIID), das Forkheadbox Protein-O4 (FOXO4) und das Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1) fokussiert, da diese Transkriptionsfaktoren in allen drei Zelllinien vorkamen und unabhängig vom Zelltyp und der PolyQ-Länge mit ATXN3 interagierten.

4.1.2. Überprüfen der DNA/ Proteinkomplexbildung mittels EMSA

Die identifizierten Transkriptionsfaktoren und/ oder ihre DNA-Bindungsmotive lassen vermuten, dass sie mit ATXN3 einen DNA/ Proteinkomplex in nukleären Extrakten ausbilden. Zur Überprüfung der Arrayergebnisse wurden „Electrophoretic Mobility Shift Assays“ (EMSAs) mit Konsensusmotiv-Sonden der drei Transkriptionsfaktoren TFIID, FOXO4 und WT1 durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen doppelsträngigen DNA-Sequenzen radioaktiv markiert (Sonde) und mit nukleären Extrakten aus CSM-Q23, CSM-Q70 und HeLa-Zellen inkubiert. Um spezifische DNA/ Proteinkomplexe von unspezifischen beim EMSA zu unterscheiden, wurde zusätzlich jeweils eine Kompetitionsreaktion mit nicht-radioaktiv markierter Sonde angesetzt. Um zu überprüfen, ob ATXN3 in den gebildeten DNA/ Proteinkomplexen enthalten war, wurde pro nukleärem Extrakt jeweils ein Ansatz mit NT-ATXN3-Antikörper durchgeführt. Die Zugabe des ATXN3-Antikörpers kann dabei bewirken, dass der DNA/ Proteinkomplex durch die Bindung des Antikörpers größer wird und langsamer durch das Gel migriert (Supershift) oder dass ATXN3 aus dem DNA/ Proteinkomplex entzogen wird und die Bildung des spezifischen „Gelshifts“ verringert wird und eventuell kleinere Komplexe auftreten die schneller durch das Gel wandern.

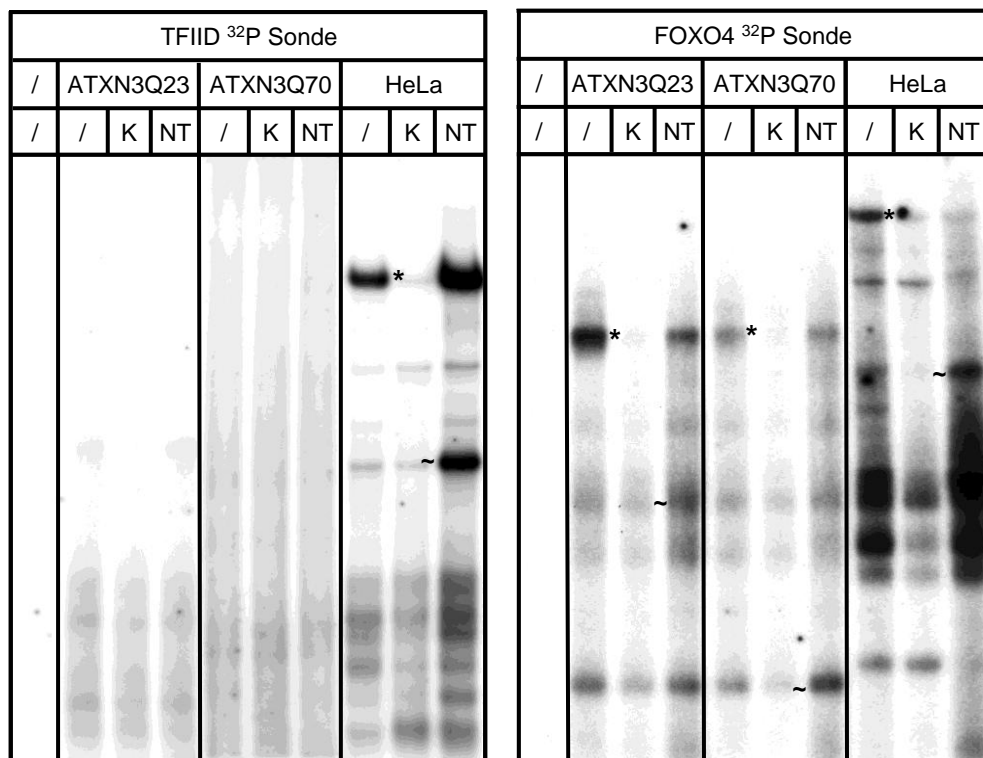


Abbildung 4.4: EMSA mit TFIID- (links) bzw. FOXO4-Sonde (rechts) und nukleären Extrakten aus CSM-Q23, CSM-Q70 und HeLa-Zellen. (links) Beide CSM14.1-Zelllinien bildeten keine spezifischen DNA/ Proteinkomplexe mit der TFIID-Konsensusmotiv-Sonde. Dagegen kam es mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen zur Ausbildung eines spezifischen Komplexes, der sich durch Zugabe des NT-ATXN3-Antikörpers verstärkte und die Bildung eines weiteren, kleineren Komplexes zur Folge hatte. (rechts) In allen drei Zelllysaten bildeten sich spezifische DNA/ Proteinkomplexe, die sich durch die Zugabe des NT-ATXN3-Antikörpers in geringer molekulare Komplexe aufspalten ließen. K – Kompetition; NT – NT-ATXN3-Antikörper; die spezifischen Banden sind mit einem Stern (*) und einer Welle (~) markiert, wobei Sterne die spezifische Bande vor der Zugabe des Antikörpers markieren und Wellen neue Banden, die nach der Zugabe entstanden.

Für den Transkriptionsfaktor TFIID ließ sich das Ergebnis des Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarrays nicht bestätigen (s. Abbildung 4.4). Mit dem beim Array verwendeten TFIID-Konsensusmotiv konnten im EMSA keine DNA/ Proteinkomplexe mit CSM14.1-Kernextrakten nachgewiesen werden, wohl aber mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen. Diese wurden jedoch nicht durch Zugabe des ATXN3-spezifischen Antikörpers „geschiftet“. Es bildete sich zwar durch die Antikörperzugabe eine weitere, geringer molekulare Bande, doch blieb die spezifische, höher molekulare TFIID-DNA/ Proteinkomplex-Bande bestehen. Dies lässt darauf

schließen, dass der gebildete DNA/ Proteinkomplex nicht ATXN3 enthält und der Antikörper eventuell mit der DNA unspezifisch einen Komplex bildet.

Mit der Konsensusmotiv-Sonde des Transkriptionsfaktors FOXO4 konnte dagegen mit allen drei nukleären Extrakten FOXO4-spezifische DNA/ Proteinkomplexe nachgewiesen werden, die ATXN3 enthielten (s. Abbildung 4.4). Durch Zugabe des ATXN3-Antikörpers wurde die Ausbildung der spezifischen DNA/ Proteinkomplexe bei allen verschiedenen Zelllysaten verringert und es wurden niedermolekulare Banden sichtbar, die für den Verlust des ATXN3-Proteins aus dem DNA/ Proteinkomplex durch die Antikörperbindung sprechen. Außerdem fiel auf, dass der bei CSM-Q23 gebildete DNA/ Proteinkomplex eine stärkere Intensität aufwies als der mit CSM-Q70. Der mit nukleärem Extrakt aus HeLa-Zellen gebildete DNA/ Proteinkomplex zeigte eine höher molekulare Größe als der Komplex in CSM14.1-Zellen.

Die spezifisch mit der WT1-Konsensusmotiv-Sonde gebildeten DNA/ Proteinkomplexe wiesen bei allen drei Zelllysaten ungefähr dieselbe Größe auf, wobei die Intensität der Bande mit CSM-Q23 stärker erschien als mit CSM-Q70 (s. Abbildung 4.5). Bei allen nukleären Extrakten entstanden durch die Zugabe des ATXN3-Antikörpers, wie bei FOXO, DNA/ Proteinkomplexe mit stärkerer Intensität. In nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen wurde durch die Zugabe des ATXN3-spezifischen Antikörpers die eigentliche Bande verstärkt und eine weitere, geringer molekulare Bande sichtbar. Auch dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass der mit nukleären Extrakt aus HeLa-Zellen gebildete DNA/ Proteinkomplex nicht ATXN3 enthält und der NT-ATXN3-Antikörper mit der DNA unspezifisch einen Komplex bildet.

Die Bildung von ATXN3-enthaltenden DNA/ Proteinkomplexen konnte somit für FOXO4 in allen Zellen und für WT1 in CSM14.1-Zellen bestätigt werden. Diese Komplexe enthalten offenbar ATXN3, da sich die Komplexgröße und Intensitäten durch Zugabe des ATXN3-spezifischen Antikörpers verringern oder erhöhen ließen. Für TFIID konnte das Ergebnis des Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarrays nicht bestätigt werden, so dass dieser Kandidat in der weiteren Arbeit nicht mehr berücksichtigt wurde.

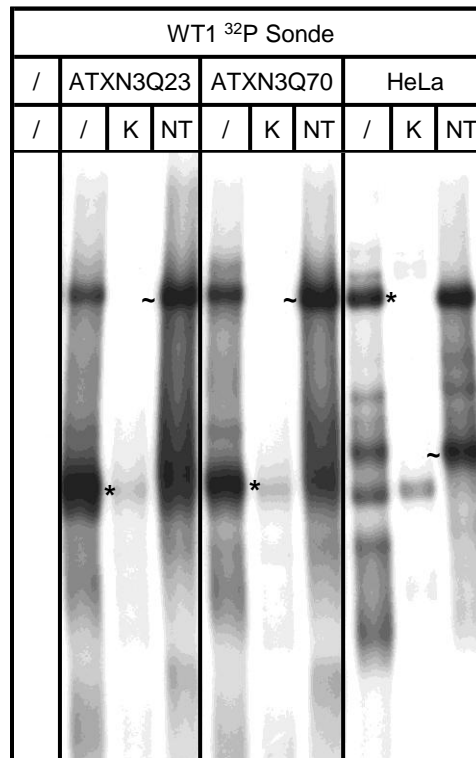


Abbildung 4.5: EMSA mit WT1-Sonde und nukleären Extrakten aus CSM-Q23, CSM-70 und HeLa-Zellen. Bei nukleären Extrakten aus CSM14.1- und HeLa-Zellen entstanden durch Zugabe des NT-ATXN3-Antikörpers Komplexe, die an Intensität zunahmten und zur Entstehung weiterer niedermolekularer Banden führten. K – Kompetition; NT – NT-ATXN3-Antikörper; die spezifischen Banden sind mit einem Stern (*) und einer Welle (~) markiert, wobei Sterne die spezifische Bande vor der Zugabe des Antikörpers markieren und Wellen neue Banden, die nach der Zugabe entstanden.

4.1.3. Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1

4.1.3.1. Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1 in CSM14.1- und HeLa-Zellen

Um die Interaktion von FOXO4 bzw. WT1 mit ATXN3 weiter zu überprüfen, wurde die Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1 in den verschiedenen Zelltypen untersucht. Dazu wurden aus HeLa-Zellen, CSM-Ctrl-, CSM-Q23- und CSM-Q70-Zellen zytoplasmatische und nukleäre Fraktionen hergestellt und mittels SDS-PAGE und Western-Blot analysiert (s. Abbildung 4.6). FOXO4 fand sich bei allen vier Zelllinien gleichermaßen exprimiert. Das Protein wies sowohl im Zytoplasma

als auch im Nukleus eine molekulare Größe von 70kDa auf und zeigte in HeLa-Zellen in beiden Zellfraktionen eine weitere Bande bei ca. 100kDa. Des Weiteren konnten keine wesentlichen Expressionsunterschiede bei den unterschiedlichen Zelllinien festgestellt werden. Die Überexpression von ATXN3Q23 und ATXN3Q70 bewirkte außerdem in CSM14.1-Zellen keine Veränderung der endogenen FOXO4-Expression.

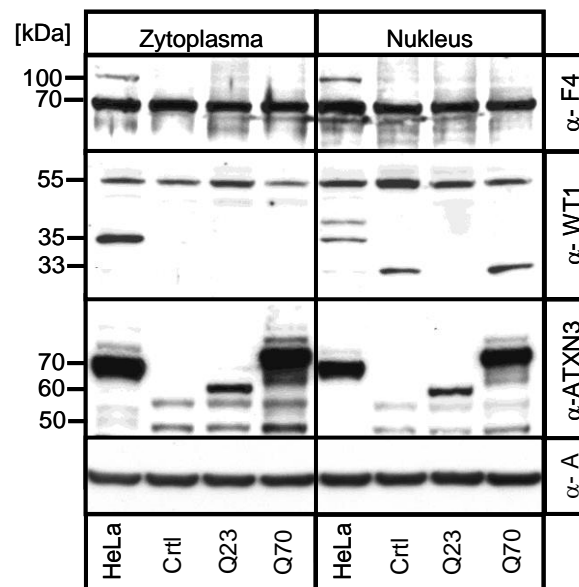


Abbildung 4.6: Zytoplasmatische und nukleäre Expression von endogenem FOXO4 und WT1 in HeLa-, CSM-Ctrl-, CSM-Q23- und CSM-Q70-Zellen. Sowohl FOXO4, als auch WT1 wurden im Zytoplasma und Nukleus aller Zelllinien endogen nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde Aktin verwendet. Die Intensität der detektierten Aktin-Banden zeigt, dass vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden. Ctrl – CSM-Ctrl; Q23 – CSM-Q23; Q70 – CSM-Q70; A – Aktin; F4 – FOXO4; α- Antikörper; kDa - Kilodalton.

Das WT1-Protein wies in allen Fraktionen der Zelllysate eine molekulare Größe von 55kDa auf. Im Zytoplasma von ATXN3Q23 überexprimierenden CSM14.1-Zellen war das Expressionslevel im Vergleich zu CSM-Ctrl und CSM-Q70 leicht erhöht. Im Nukleus hingegen zeigte sich eine weitere WT1-Bande auf der Höhe von 33kDa in CSM-Ctrl und -Q70, die jedoch nicht bei CSM-Q23 vorkam. Außerdem war bei CSM-Ctrl die 55kDa-Bande im Kern am stärksten. Die Überexpression von ATXN3 könnte somit eine Auswirkung auf die Expression von WT1 gehabt haben. Des Weiteren unterschieden sich bei WT1, genauso wie bei FOXO4, die HeLa-Fraktionen von den CSM14.1-Zelllysaten. Es fanden sich eine bzw. zwei weitere immunreaktive Banden. Im Zytoplasma zeigte sich eine weitere Bande auf der Höhe von ca. 35kDa, während in der

nukleären Fraktion neben dieser noch eine weitere bei ca. 45kDa sichtbar wurde. Für WT1 existieren daher offenbar speziesspezifische oder zelltypspezifische Expressionsunterschiede.

Bei allen Zelllinien wurde außerdem die Expression von ATXN3 überprüft. Ratten-ATXN3 zeigte ein Molekulargewicht von 50 bzw. 55kDa, die überexprimierte humane ATXN3Q23-Variante etwa 60kDa und ATXN3Q70 ca. 70kDa. Normales, endogenes HeLa-ATXN3 wurde hingegen bei 70kDa nachgewiesen. ATXN3 kam in allen Fraktionen vor, wobei im Zytoplasma mehr exprimiert wurde als im Nukleus. Die Detektion der Aktinlevel diente als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge. Der Western-Blot zeigte, dass in allen Spuren vergleichbare Proteinmengen aufgetragen wurden.

4.1.3.2. Proteinexpression und subzelluläre Lokalisierung von FOXO4 und WT1 in humanem *Pons* eines Kontroll- und SCA3-Patienten

Um die subzelluläre Lokalisierung der beiden Transkriptionsfaktoren in humanem Gehirn-Gewebe zu analysieren und mögliche Unterschiede in gesundem und kranken Gewebe zu untersuchen, wurden humane *Pons*-Paraffinschnitte mit FOXO4- (s. Afx1X in 2.11.1) und ATXN3- (s. 1H9 in 2.11.1) Antikörper bzw. mit WT1- und ATXN3-Antikörper mittels Doppelfluoreszenz gefärbt und mit dem Fluoreszenz-Mikroskop untersucht.

Im Kontroll-*Pons* fand sich FOXO4 ausschließlich punktförmig zytoplasmatisch lokalisiert, während ATXN3 außer der punktförmigen zytoplasmatischen Färbung auch eine leichte Färbung des Nukleus zeigte (s. Abbildung 4.7). Das Übereinanderlegen beider Fluoreszenzfärbungen zeigte eine fast vollständige zytoplasmatische Kolo-kalisierung beider Proteine, während sich FOXO4 nicht im Nukleus fand. Das pontine Neuron des SCA3-Patienten zeigte eine ATXN3-positive nukleäre Inklusion, die kein FOXO4 enthielt. FOXO4 und ATXN3 wurden auch beim SCA3-Patienten punktförmig im Zytoplasma angefärbt. Die deutlich geringere Färbung von FOXO4 und ATXN3 im Zytoplasma im Vergleich zum Kontroll-Patienten ist auf die starke Verringerung der Belichtung zur Aufnahme der nukleären Inklusionen zurückzuführen. FOXO4 und ATXN3 kolo-kalisieren demnach auch im SCA3-Patienten nur schwächer.

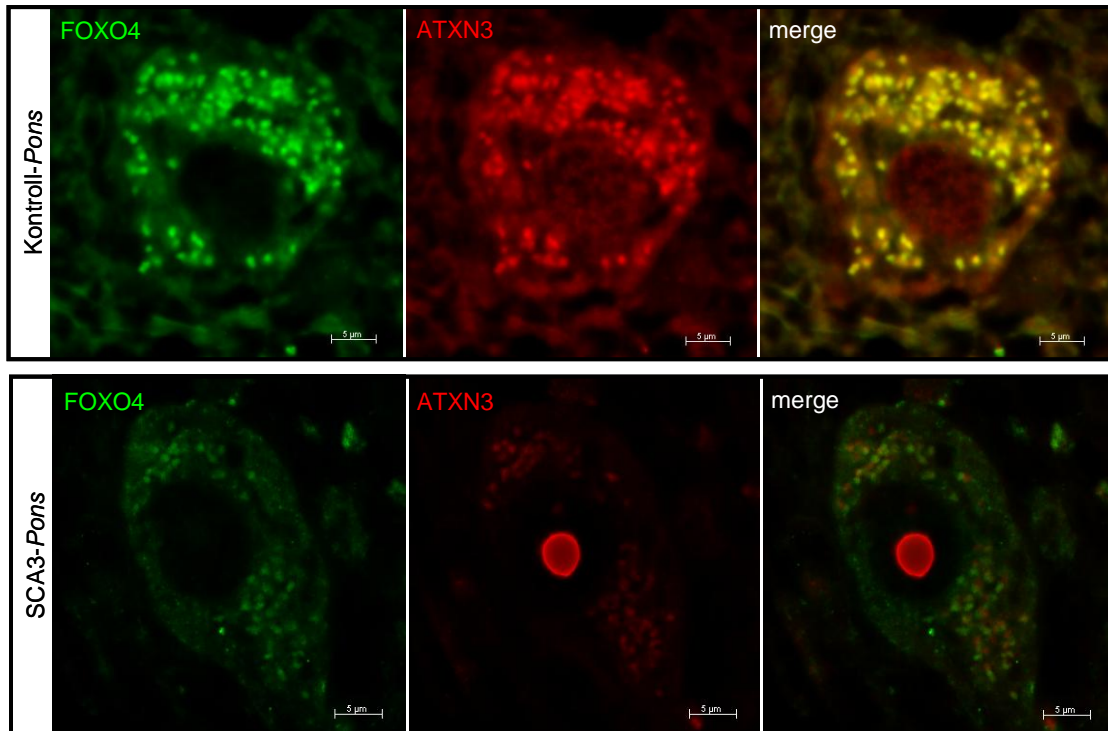


Abbildung 4.7: Immunfluoreszenzfärbung eines pontinen Neurons eines Kontroll-Patienten (obere Reihe) und eines SCA3-Patienten (untere Reihe). Die Färbung erfolgte mit FOXO4- (grün) und ATXN3- (rot) Antikörpern. FOXO4 war sowohl im Kontroll- als auch SCA3-*Pons* ausschließlich zytoplasmatisch zu finden und kolokalisierte bei der Kontrolle mit der zytoplasmatischen ATXN3-Färbung. FOXO4 konnte nicht in der ATXN3-positiven nukleären Inklusion im SCA3-*Pons* nachgewiesen werden. Der Maßstab entspricht 5µm; merge – kombiniertes Bild beider Fluoreszenzfärbungen.

Bei der Kontrolle fand sich eine diffuse zytoplasmatische Lokalisierung von WT1, sowie vereinzelt eine perinukleäre und punktförmige Färbung im Nukleus (s. Abbildung 4.8). WT1 kolokalisierte mit ATXN3 im Zytoplasma, wobei ATXN3 eine diffuse Färbung aufwies und die nukleäre Färbung etwas stärker war. Im pontinen Neuron des SCA3-Patienten war WT1 nicht in der nukleären Inklusion nachzuweisen. Eine perinukleäre Färbung war nicht mehr zu erkennen und die zytoplasmatische Färbung von WT1 war weder für WT1 noch für ATXN3 diffus. Beide kolokalisierten punktförmig im Zytoplasma, ähnlich wie bei der FOXO4-ATXN3-Färbung.

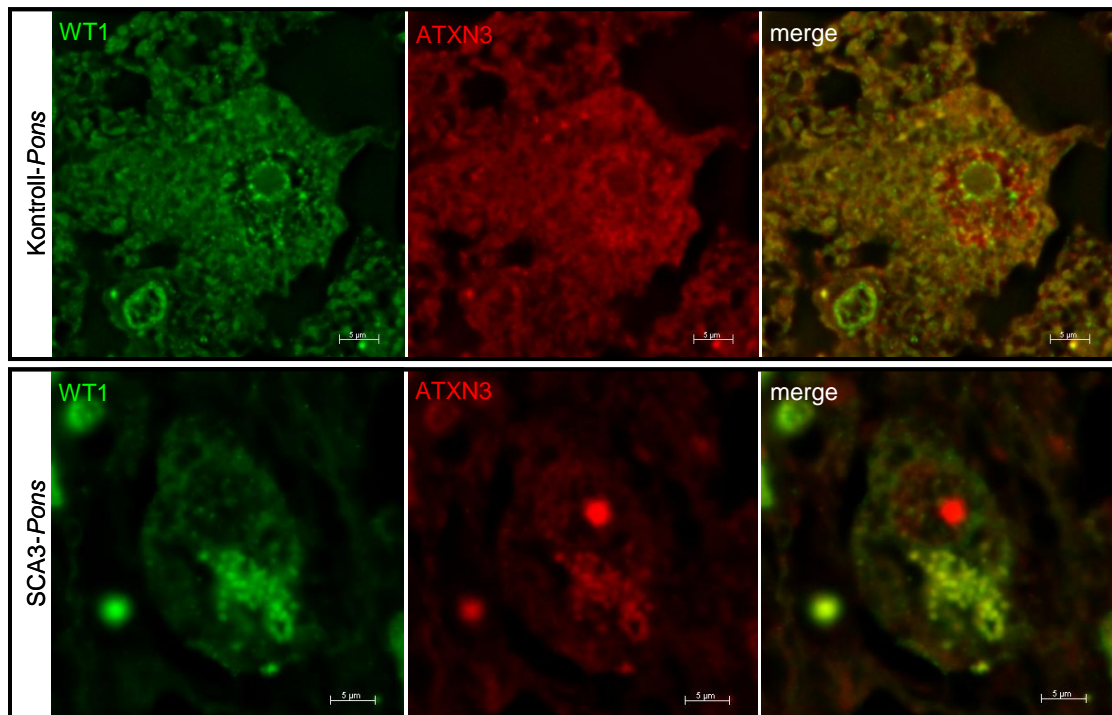


Abbildung 4.8: Immunfluoreszenzfärbung eines pontinen Neurons eines Kontroll-Patienten (obere Reihe) und eines SCA3-Patienten (untere Reihe). Die Färbung erfolgte mit WT1- (grün) und ATXN3- (rot) Antikörpern. WT1 war im Kontroll-Pons diffus zytoplasmatisch sowie distinkt punktförmig perinukleär verteilt und kolokalisierte schwach mit ATXN3 im Zytoplasma. Im pontinen Neuron des SCA3-Patienten hingegen war es nicht mehr diffus, sondern wie bei FOXO4 punktförmig im Zytoplasma verteilt und zeigte keine perinukleäre Färbung. WT1 kolokalisierte nicht mit der ATXN3-positiven nukleären Inklusion. Der Maßstab entspricht 5µm; merge – kombiniertes Bild beider Fluoreszenzfärbungen.

Somit fand sich sowohl für FOXO4 als auch für WT1 eine Kolokalisierung mit ATXN3 ausschließlich im Zytoplasma und nicht im Kern pontiner Neurone von Kontroll- und SCA3-Patienten. Eine Kolokalisierung von FOXO4 und WT1 mit den ATXN3-positiven nukleären Inklusionen konnte nicht festgestellt werden.

4.1.4. Analyse der Proteininteraktion durch GST-Pulldown-Experimente

Um die Proteininteraktion von ATXN3 mit den Transkriptionsfaktoren WT1 und FOXO4 genauer zu untersuchen, wurden verschiedene GST-ATXN3 Konstrukte hergestellt und GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Die GST-Konstrukte GST-JD, GST-UIM, GST-

Q23 und GST-Q70 (s. Abbildung 4.9A) ermöglichten nicht nur die Interaktion mit ATXN3 zu überprüfen, sondern gleichzeitig die Bindungsregion in ATXN3 einzugrenzen.

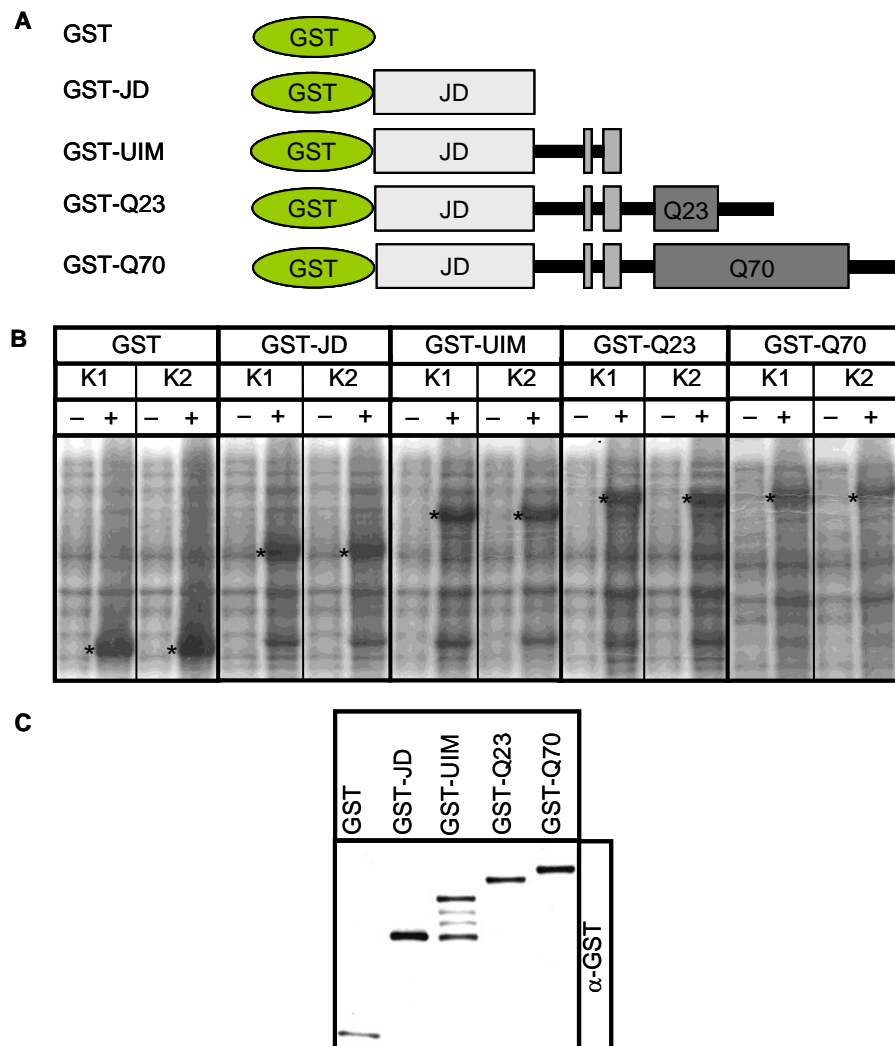


Abbildung 4.9: GST-ATXN3-Proteinvarianten. **A.** Schematische Darstellung der klonierten und in *E. coli* BL21 exprimierten GST-ATXN3-Konstrukte mit den entsprechenden Proteindomänen. **B.** Coomassie-Blau-Färbung der exprimierten GST-Fusionsproteine jeweils zweier Klone einer ATXN3-Proteinvariante. Die Sterne (*) markieren die nach Induktion mit IPTG erhaltenen Proteinbanden. **C.** Western-Blot-Analyse der aufgereinigten, dialysierten GST-ATXN3-Proteinvarianten. GST – Glutathion-S-Transferase; JD – Josephin-Domäne; UIM - Josephin-Domäne + zwei Ubiquitin-Interaktionsmotive; Q23 – ATXN3Q23; Q70 – ATXN3Q70; K1 – Klon 1; K2 – Klon 2; - vor IPTG Zugabe; + nach IPTG Zugabe; α - Antikörper.

Zunächst wurden die verschiedenen ATXN3-Varianten in den pCR2.1TOPO-Vektor kloniert und anschließend in den prokaryotischen GST-Expressionsvektor pGEX6P1 umklont. Die ATXN3-pGEX6P1-Konstrukte wurden danach in den *E. coli*-BL21-Stamm transformiert und jeweils mehrere Klone pro Konstrukt auf ihre Expression vor und

nach Induktion mit IPTG mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft (s. Abbildung 4.9B). Die getesteten Klone aller Konstrukte zeigten nach Induktion mit IPTG die Expression der jeweiligen Glutathion-S-Transferase-(GST)-ATXN3-Proteinvariante. Der jeweils am stärksten exprimierende Klon pro ATXN3-Variante wurde weiterverwendet. Die Expressionsbedingungen wurden für alle GST-ATXN3-Varianten durch Variieren der IPTG-Konzentrationen und Inkubationszeiten optimiert (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurden die GST-, GST-JD-, GST-UIM-, GST-Q23- und GSTQ70-Proteine in *E. coli*-BL21 exprimiert, aufgereinigt und dialysiert. Die rekombinanten GST-Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot mit GST-Antikörper auf Degradationen untersucht (s. Abbildung 4.9C). Alle rekombinanten GST-ATXN3-Proteine entsprachen der erwarteten Molekülgröße, ließen sich mit GST-Antikörper detektieren und wiesen keine weiteren Banden auf. Nur das rekombinante GST-UIM-Protein zeigte einige niedermolekulare Abbaufragmente – das kleinste zeigte eine Größe wie das GST-JD-Protein.

Die rekombinanten GST-Proteine wurden für GST-Pulldowns mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen, CSM-Ctrl und Wildtyp-Maushirn eingesetzt. Nach Präzipitation der GST-ATXN3-Fusionsproteine wurden WT1 und FOXO4 mittels SDS-PAGE und Western-Blot zu untersucht. In keinem der nukleären Extrakte konnte eine Interaktion von WT1 mit einer der GST-ATXN3-Varianten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für FOXO4 hingegen konnte eine klare Interaktion mit ATXN3 gezeigt werden (s. Abbildung 4.10). Sowohl das nukleäre FOXO4 der humanen HeLa- und Ratten-CSM-Ctrl-Zelllinien, als auch das nukleäre FOXO4 eines Maushirnlisates interagierte mit GST-JD, GST-UIM, GST-Q23 und GST-Q70. Eine unspezifische Bindung über das GST-Tag konnte durch die Negativkontrolle mit rekombinantem GST allein ausgeschlossen werden. Da FOXO4 mit allen GST-ATXN3-Varianten interagieren konnte, kann von einer Bindung von FOXO4 über die JD an ATXN3 ausgegangen werden.

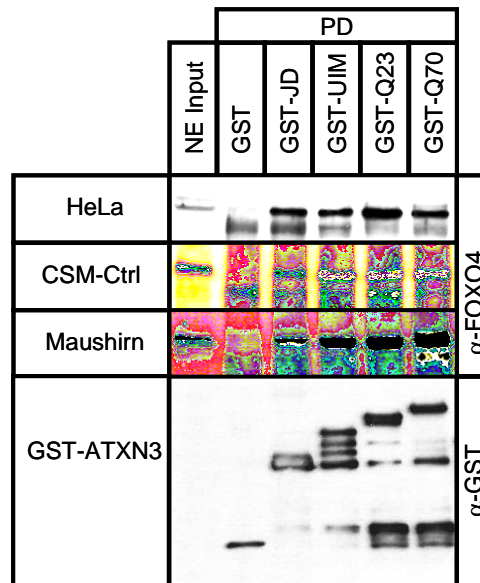


Abbildung 4.10: GST-Pulldown (PD) mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen, CSM-Ctrl-Zellen und Wildtyp-Maushirn. Endogenes FOXO4 ließ sich aus allen drei nukleären Extrakten (HeLa, CSM-Ctrl, Maushirn) mit den GST-ATXN3-Varianten präzipitieren. NE – nukleäres Extrakt; GST – Glutathion-S-Transferase; JD – Josephin-Domäne; UIM - Josephin-Domäne + zwei Ubiquitin-Interaktionsmotive; Q23 – ATXN3Q23; Q70 – ATXN3Q70; α - Antikörper.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde aufgrund der fehlenden Interaktion von WT1 und ATXN3 auf die weitere Analyse von WT1 verzichtet. Daher konzentrierten sich alle weiteren Arbeiten auf FOXO4 als ATXN3-interagierender Transkriptionsfaktor.

4.1.5. Physiologische und PolyQ-unabhängige Interaktion von FOXO4 und ATXN3

Nachdem die Interaktion von FOXO4 und ATXN3 über die Josephin-Domäne mit rekombinanten GST-ATXN3-Proteinvarianten bestätigt werden konnte, wurde die physiologische Interaktion der beide Proteine durch transiente Kofransfektionen und anschließenden Immunpräzipitationen in Säugerzellen überprüft. Dazu wurde eine FOXO4 cDNA aus humanem *Zerebellum* in den pCR2.1TOPO-Vektor kloniert und anschließend zusammen mit einem N-terminalen Hämagglutinin-Tag (HA) in den Expressionsvektor pcDNA3.1 Hygromycin (-) umklontiert. Das HA-FOXO4-Konstrukt wurde dann mit ATXN3-Konstrukten verschiedener PolyQ-Länge (Q2, Q22, Q71, Q123) in HeLa-Zellen kofransfiziert, RIPA-Lysate hergestellt und FOXO4 mit einem HA-

Antikörper immunpräzipitiert. Die Analyse der immunpräzipitierten Komplexe mittels SDS-PAGE und Western-Blot zeigte, dass alle ATXN3-Varianten einschließlich des endogenen ATXN3s mit HA-FOXO4 koimmunpräzipitierten. Somit interagiert FOXO4 mit ATXN3 unabhängig von der PolyQ-Länge (s. Abbildung 4.11).

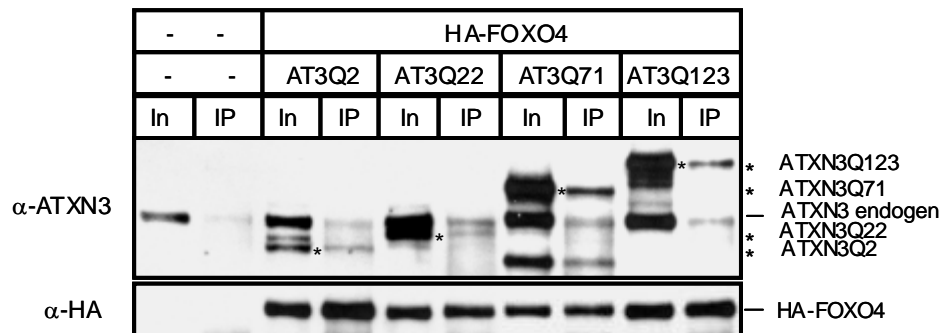


Abbildung 4.11: HA-FOXO4-Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse von HeLa-Zellen, die mit überexprimiertem HA-FOXO4 und ATXN3Q2, -Q22, -Q71 und -Q123 kotransfiziert wurden. HA-FOXO4 interagiert mit allen vier ATXN3-Varianten unabhängig von der PolyQ-Länge. Die überexprimierten ATXN3-Varianten mit verschiedenen PolyQ-Längen wurden mit einem Stern (*) markiert, während das endogene HeLa-ATXN3 mit einem Strich (-) kenntlich gemacht wurde. In – Input; IP – Immunpräzipitation; HA – Hämagglutinin; α - Antikörper.

Um die physiologische Interaktion von ATXN3 und FOXO4 in humanem Hirngewebe zu überprüfen, wurde nukleäres Extrakt aus humanem Kontroll-Pons hergestellt und Immunpräzipitationen mit einem ATXN3- bzw. FOXO4-spezifischen Antikörper durchgeführt (s. Abbildung 4.12). Mit beiden Antikörpern ließen sich jeweils endogenes ATXN3 und FOXO4 koimmunpräzipitieren. Damit konnte gezeigt werden, dass endogenes FOXO4 auch physiologisch in nukleärem Extrakt eines humanen Pongewebes mit endogenem ATXN3 interagiert.

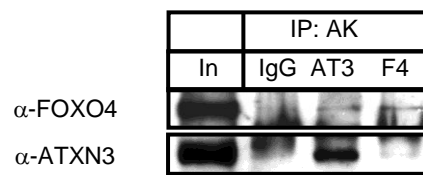


Abbildung 4.12: Western-Blot-Analyse immunpräzipitierten endogenen ATXN3 und FOXO4 aus nukleärem Extrakt eines humanen Ponsgewebes. Sowohl die Immunpräzipitation mit dem ATXN3- als auch die Immunpräzipitation mit dem FOXO4-spezifischen Antikörper zeigten, dass die beiden Proteine im humanen *Pons* miteinander interagieren. In – Input; IgG – IgG-Antikörper; AT3 – ATXN3; F4 – FOXO4; AK oder α - – Antikörper.

4.1.6. *In vitro* Interaktion von GST-ATXN3 und N-terminalem His-FOXO4

Nach der Bestätigung der PolyQ-unabhängigen, physiologischen Interaktion wurde untersucht, ob es sich um eine direkte Interaktion zwischen FOXO4 und ATXN3 handelt. Dazu wurde ein Histidin-(His)-markiertes FOXO4-Konstrukt mit dem N-terminalen (NT) Bereich von FOXO4 sowie ein Konstrukt mit der vollständigen FOXO4 cDNA in den pCR2.1TOPO-Vektor hergestellt und anschließend in den pET32b+-Vektor umklontiert. Nach Transformation und Expression der Konstrukte in *E. coli* BL21 ließ sich das Volllängenprotein von FOXO4 nicht in ausreichender Menge und Qualität aufreinigen. Trotz unterschiedlicher, methodischer Ansätze und verschiedener weiterer „Tags“ zur Stabilisierung, degradierte das FOXO4-Volllängenprotein (Daten nicht gezeigt). Dagegen konnte das N-terminale (NT) His-FOXO4 erfolgreich aufgereinigt, dialysiert und für die Analyse der *in vitro* Interaktion mit den verschiedenen GST-ATXN3-Proteinvarianten verwendet werden. Dafür wurden die rekombinanten Proteine zusammen inkubiert und nach GST-Pulldown über SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot mit GST- bzw. His-Antikörpern detektiert (s. Abbildung 4.13). Die Analyse zeigte, dass der N-terminale Bereich von FOXO4, der die Forkheadbox enthält, mit allen Proteinvarianten von ATXN3 direkt interagieren konnte. Da die Josephin-Domäne als einzige Domäne in allen vier GST-ATXN3-Proteinvarianten enthalten ist, bindet sie an den N-Terminus von FOXO4. Die direkte Interaktion von His-NT-FOXO4 mit GST-ATXN3Q70 fiel dagegen sehr viel geringer aus im Vergleich zu den anderen ATXN3-Proteinvarianten.

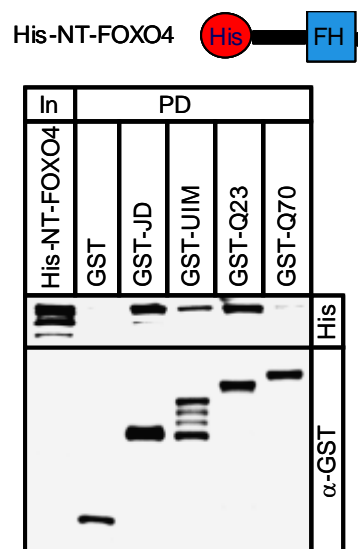


Abbildung 4.13: *In vitro* Interaktion von His-NT-FOXO4 mit den verschiedenen GST-ATXN3-Varianten. Alle Varianten außer GST selbst interagierten direkt mit NT-FOXO4, wobei GST-Q70 eine deutlich geringere Interaktion im Vergleich zu den anderen Varianten aufwies. His – Histidin; NT - N-Terminus; FH – Forkheadbox; In – Input; PD – Pulldown; GST – Glutathion-S-Transferase; JD – Josephin-Domäne; UIM - Josephin-Domäne + zwei Ubiquitin-Interaktionsmotive; Q23 – ATXN3Q23; Q70 – ATXN3Q70; α- Antikörper.

4.1.7. Nukleär lokalisiertes FOXO4 kolokalisiert mit ATXN3

In *post mortem* humanen Ponschnitten konnte mittels Immunfluoreszenz-Färbung keine nukleäre Kolokalisation von ATXN3 und FOXO4 festgestellt werden, obwohl die Interaktionsexperimente, einschließlich der Immunpräzipitationen mit humanem Pongewebe, eine Interaktion in nukleären Extrakten bestätigten. In der Immunfluoreszenzfärbung konnte jedoch auch kein nukleäres FOXO4 in pontinen Neuronen nachgewiesen werden. Brunet *et al.* (1999) sowie Kops *et al.* (1999) haben gezeigt, dass die Phosphorylierung von FOXO4 an T32, S197 and S262 über die Bindung an das 14-3-3-Protein zum nukleären Export von FOXO4 ins Zytoplasma führt. Durch Mutagenese der drei Phosphorylierungsstellen zu Alanin kann eine Phosphorylierung von FOXO4 und die Bindung des 14-3-3-Protein verhindert werden, so dass FOXO4 in seiner konstitutiv aktiven Form im Nukleus verbleibt. Um zu sehen, ob die nukleäre Lokalisation von FOXO4 zu einer Kolokalisation mit ATXN3 führt, wurde eine Tripel-

Alanin-Mutante (TM) von FOXO4 durch zielgerichtete Mutagenese hergestellt. Diese HA-FOXO4-TM-Variante sowie normales HA-FOXO4 wurden dann jeweils zusammen mit His-ATXN3Q23 bzw. Q70 in HeLa-Zellen kotransfiziert, die Zellen nach 24h fixiert und in einer Doppelfluoreszenzfärbung dargestellt (s. Abbildung 4.14).

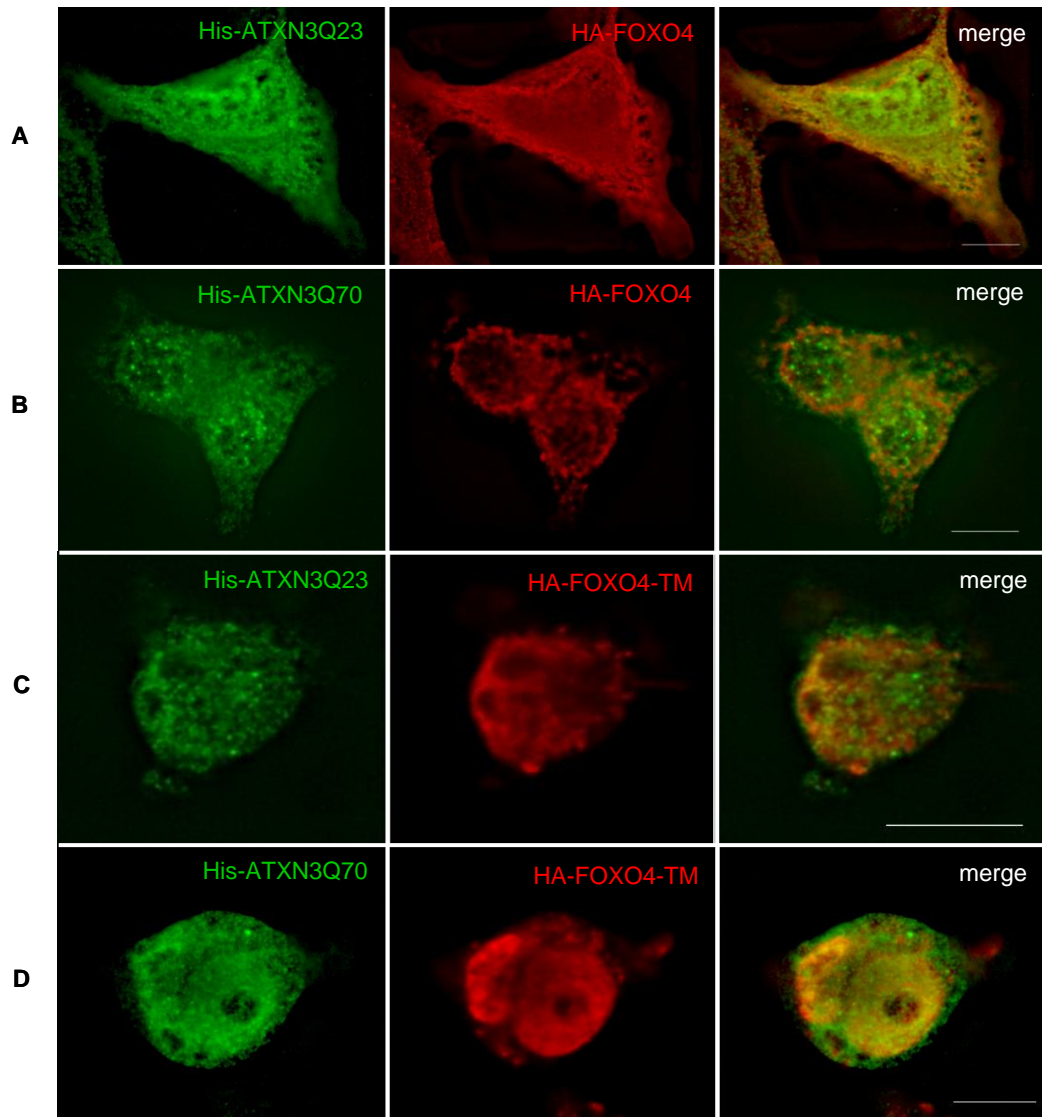


Abbildung 4.14: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von HA-FOXO4 bzw. HA-FOXO4-TM und His-ATXN3Q23 bzw. His-ATXN3Q70 transfizierter HeLa-Zellen. Die Zellen wurden mit His-ATXN3Q23 (grün) bzw. His-ATXN3Q70 (grün) und HA-FOXO4 (rot) (**A, B**) oder mit His-ATXN3Q23 bzw. His-ATXN3Q70 und HA-FOXO4-TM (rot) (**C, D**) kotransfiziert. Der Maßstab entspricht 5µm. TM – Tripel-Alanin-Mutante, His – Histidin; HA – Hämagglutinin; merge – kombiniertes Bild beider Fluoreszenzfärbungen.

Die Färbungen zeigten, dass normales FOXO4 in HeLa-Zellen hauptsächlich diffus im Zytoplasma mit teils punktförmiger, perinukleärer Lokalisation vorkommt (s.

Abbildung 4.14A, B). Die Färbung von His-ATXN3Q23 zeigte eine leichte zytoplasmatische Kolokalisierung mit normalem FOXO4 (s. Abbildung 4.14A), während His-ATXN3Q70 keine Kolokalisierung zu der nukleären und perinukleären punktförmigen FOXO4-Färbung aufwies (s. Abbildung 4.14B). Die HA-FOXO4-TM-Variante befand sich dagegen ausschließlich im Nukleus und zeigte eine partielle perinukleäre Kolokalisation mit His-ATXN3Q23 und His-ATXN3Q70 (s. Abbildung 4.14C, D). Somit scheint nukleäres FOXO4 teilweise mit ATXN3Q23 und ATXN3Q70 zu kolokalisieren.

4.2. Funktionelle Analyse der Interaktion von FOXO4 und ATXN3

4.2.1. Reporteranalysen

Da der Transkriptionsfaktor FOXO4 als direkter Interaktionspartner von normalem und expandiertem ATXN3 identifiziert werden konnte, beide Interaktionspartner im Kern kolokalisieren und einen DNA/ Proteinkomplex mit dem FOXO-Konsensusmotiv bilden können, wurde untersucht, ob die Interaktion eine funktionelle Auswirkung auf die Transkription von FOXO4-Zielgenen besitzt. Dazu wurde das FOXO-Konsensusmotiv in vierfacher Wiederholung (4x DNA Bindungselement, 4x DBE) vor einen CMV-Minimalpromotor und das *Firefly-Luziferase*-Gen in den pGL4.23-Reportervektor kloniert. Das Reportergenkonstrukt enthält somit eine vereinfachte, künstliche Form eines FOXO4-Zielgenpromotors. Für die Reporterstudien wurden HeLa-Zellen mit dem 4x DBE-Reportergenkonstrukt und Expressions-konstrukten für FOXO4, ATXN3Q23 oder ATXN3Q70 kotransfiziert. Nach 24h wurden Luziferase-Proteinlysate hergestellt und die Firefly-Luziferaseaktivität gemessen (s. Abbildung 4.15). Auf diese Weise konnte der Einfluss einzelner Proteine und koexprimierter Proteine auf die Promotoraktivität untersucht werden. Zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde bei jeder Transfektion zusätzlich ein Renilla-Luziferase-Reportergenkonstrukt mit einem konstitutiven CMV-Promotor kotransfiziert und die Renilla-Luziferaseaktivität gemessen. Die Renilla-Luziferase sollte bei den Reporteranalysen nicht reguliert

werden. Um die Expression der kotransfizierten Proteine zu überprüfen, wurden Western-Blots angefertigt (s. Abbildung 4.15 A).

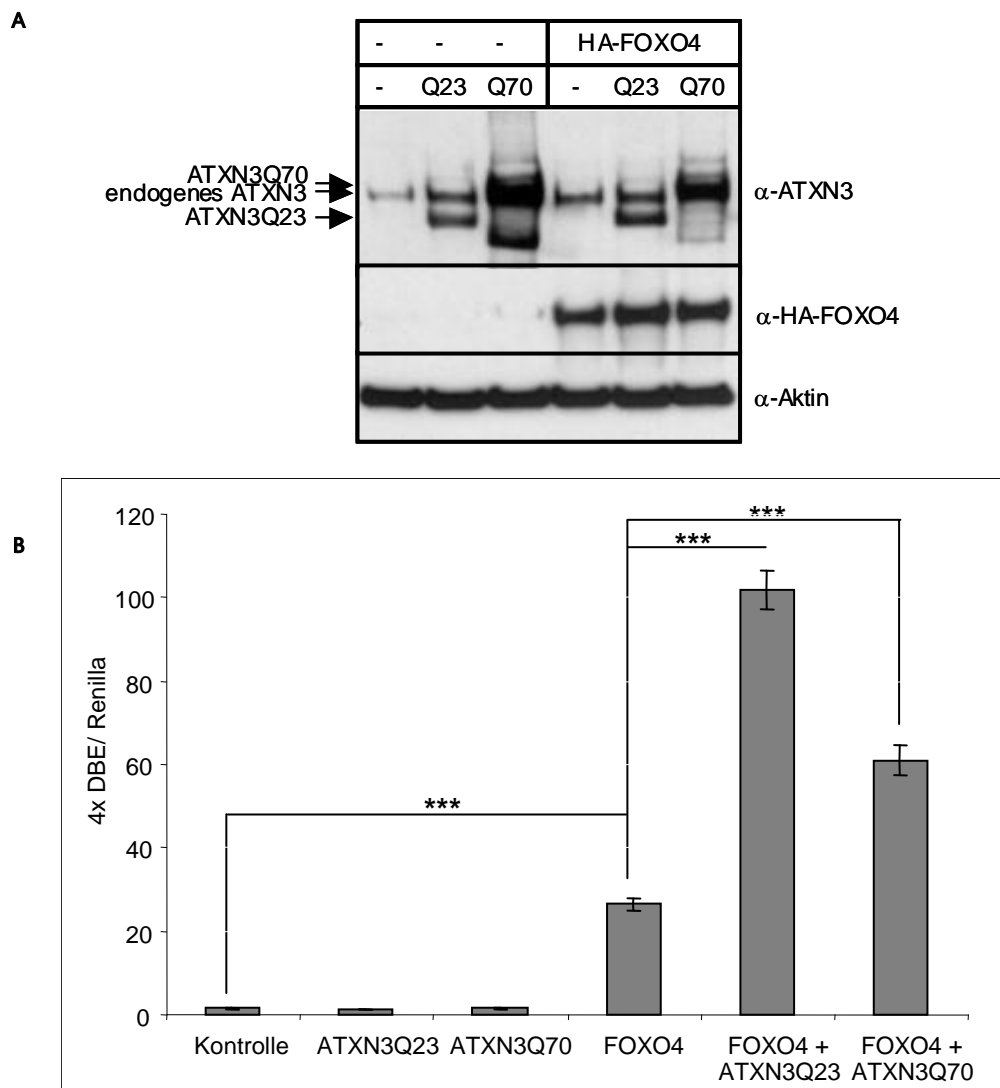


Abbildung 4.15: Promotoraktivität des künstlichen FOXO4-Zielgenpromotors 4x DBE nach Kotransfektion mit FOXO4 und/ oder ATXN3Q23 oder ATXN3Q70. **A.** Western-Blot-Analyse der in HeLa-Zellen transfizierten Proteinkonstrukte ATXN3Q23, ATXN3Q70 und HA-FOXO4. Als Kontrolle wurde mit β -Galaktosidase kotransfiziert. **B.** Dargestellt sind vier unabhängige Experimente der 4x DBE-Aktivitätsmessung mit SEM als Standardabweichung. Als Statistischer Test wurde der T-Test verwendet. $p < 0,001$ ***. Q23 – ATXN3Q23; Q70 – ATXN3Q70; DBE – DNA-Bindungselement; α - Antikörper.

Das 4x DBE-Reportergenkonstrukt konnte durch die Kotransfektion von FOXO4 signifikant aktiviert werden. Die Promotoraktivität wurde um das 18-fache im Vergleich zur Kontrolltransfektion erhöht. Während durch Einzeltransfektion mit ATXN3Q23 oder ATXN3Q70 keine Änderung der Promotoraktivität erreicht wurde, konnten bei

gleichzeitiger Transfektion von FOXO4 und ATXN3 erhebliche Unterschiede festgestellt werden. Die Kotransfektion von FOXO4 mit ATXN3Q23 bewirkte eine signifikante, synergistische Aktivierung des künstlichen Promotorkonstruktes. Die Promotoraktivität erhöhte sich im Vergleich zur FOXO4 Einzeltransfektion um das 3,8-fache. Eine synergistische Aktivierung erfolgte zwar auch bei der Kotransfektion von FOXO4 mit ATXN3Q70, jedoch in geringerem Umfang. Die Promotoraktivität stieg in diesem Fall nur um das 2,3-fache (60%). Somit verstärkt ATXN3Q23 mit FOXO4 synergistisch die Transkription eines künstlichen FOXO4-Zielgenpromotors.

Um die Reporteranalyse mit einem physiologischen FOXO4-Zielgenpromotor durchzuführen, wurden 1,4kb des humanen *Superoxiddismutase 2 (SOD2)* oder auch *Mangan-Superoxiddismutase*-Genpromotors in den Reportervektor pGL4.23 kloniert (Kops *et al.*, 2002; Kuiperij *et al.*, 2005; s. Abbildung 4.16).

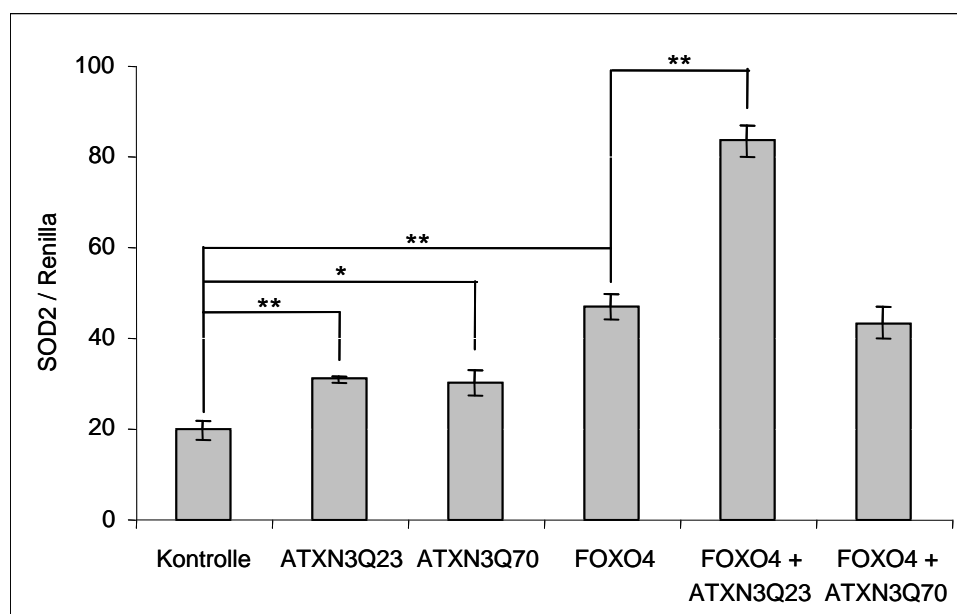


Abbildung 4.16: Promotoraktivität des 1,4kb-SOD2-Promotorkonstruktes nach Kotransfektion mit FOXO4 und/oder ATXN3Q23 oder ATXN3Q70. Als Kontrolle wurde mit β -Galaktosidase kotransfiziert. Dargestellt sind vier unabhängige Experimente mit SEM als Standardabweichung. Als Statistischer Test wurde der T-Test verwendet. $p < 0,05$ *, $p < 0,01$ **.

Das SOD2-Reporterkonstrukt wurde in HeLa-Zellen mit FOXO4 und/ oder ATXN3Q23 oder ATXN3Q70 kotransfiziert, Lysate hergestellt und die beiden Luziferaseaktivitäten gemessen. Die Einzeltransfektionen mit FOXO4, ATXN3Q23 und ATXN3Q70 zeigten

bereits eine signifikante Aktivierung des humanen *SOD2*-Promotorkonstrukts. Dabei wurde die höchste Aktivierung mit 2,4-fach durch FOXO4 bewirkt, während die beiden ATXN3-Varianten eine 1,5-fache Aktivierung hervorriefen. Eine additive Aktivierung von FOXO4 und den beiden ATXN3-Varianten konnte mit dem *SOD2*-Zielgen-promotor jedoch nur mit FOXO4 und ATXN3Q23 erreicht werden. Die Kotransfektion von FOXO4 und ATXN3Q70 wies keinen Unterschied zur Einzeltransfektion mit FOXO4 auf. Somit ließen sich die Ergebnisse des künstlichen 4x DBE-Promotorkonstruktes grundsätzlich mit denen des *SOD2*-Promotorkonstruktes vergleichen. FOXO4 und ATXN3Q23 aktivieren demnach das *SOD2*-Promotorkonstrukt, im Gegensatz zu ATXN3Q70.

4.2.2. *SOD2*-Expression in humanen Ponsgeweben von Kontroll- und SCA3-Patienten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das *SOD2*-Promotorkonstrukt von FOXO4 und ATXN3Q23 additiv aktiviert wird, wurde überprüft, ob die endogene *SOD2* mRNA- und Proteinexpression im humanen SCA3-Pons im Vergleich zu Kontroll-Pons verändert ist. Dazu wurden zunächst quantitative PCRs mit je zwei RNA-Proben aus Kontroll- und SCA3-Ponsgewebe durchgeführt. Da die verwendeten RNA-Proben schon einige Degradationen aufwiesen (Daten nicht gezeigt), wurde die *SOD2*-Expression nur auf die Aktinlevel normiert. Die anderen untersuchten konstitutiv exprimierten Gene, *GAPDH* und *HPRT*, zeigten keine verwertbaren Resultate. Trotz der großen Standardabweichung fand sich eine auf die Hälfte verringerte Expression der *SOD2* in humanem SCA3-Pons (s. Abbildung 4.17A). Aufgrund der geringen Probenqualität und Probenanzahl spiegelt das zwar nur eine Tendenz wider, entspricht aber den in den Reporteranalysen erhaltenen Ergebnissen.

Zur Untersuchung der *SOD2*-Proteinexpression wurden je zwei Kontroll- und SCA3-Ponsschnitte mit *SOD2*-Antikörper und alkalische Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt und mit dem Mikroskop untersucht. Die immunhistochemische Färbung der Paraffinschnitte zeigten, dass in beiden Kontroll-Ponsschnitten mehr *SOD2* exprimiert wurde als in den SCA3-Ponsschnitten (s. Abbildung 4.17B). Somit konnte im humanen Ponsgewebe eine Verringerung der *SOD2*-Expression auf endogenem mRNA- und Proteinniveau gezeigt werden.

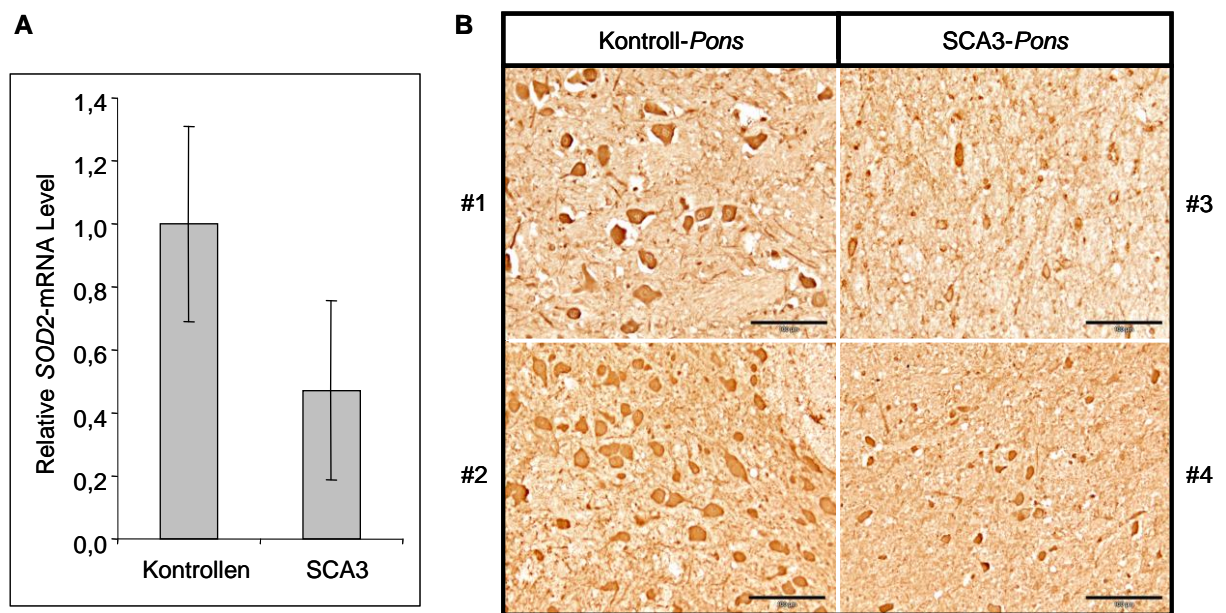


Abbildung 4.17: SOD2 mRNA- (A) und Proteinexpression (B) in Kontroll- und SCA3-Pons. Sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene fand sich eine höhere SOD2-Expression im Kontroll-Pons als im SCA3-Pons. Es wurden jeweils zwei Proben analysiert, die absolute SOD2-mRNA-Expression wurde auf Aktin normalisiert. Der Maßstab in **B** entspricht 10µm. #1, 2 – Kontroll-Patienten; #3, 4 – SCA3-Patienten.

4.2.3. Herstellung von EBV-immortalisierten humanen lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) von Kontroll- und SCA3-Patienten

Aufgrund der geringen Verfügbarkeit und Qualität humanen Gehirnmaterials, wurde eine alternative Möglichkeit gesucht, humane Zellen von SCA3-Patienten zu untersuchen. Daher wurden über die Neurologische Klinik der Universität Bonn Blutproben von Patienten gesammelt, die die Herstellung lymphoblastoider Zelllinien (LCL) von Kontroll- und SCA3-Patienten ermöglichten.

LCLs wurden bereits mehrfach erfolgreich zur Analyse biologischer Zusammenhänge zwischen Genexpression und neurologischen Erkrankungen verwendet (Iwamoto *et al.*, 2004; Horike *et al.*, 2005; Nishimura *et al.*, 2007). Zur Herstellung der Zelllinien wurden zunächst Lymphozyten aus den Blutproben mittels Bicolllgradient isoliert und diese mit dem Epstein Barr Virus (EBV) infiziert (Neitzel *et al.*, 1986). Nach ca. 1 Woche bildeten sich kleine, mit dem Auge sichtbare Zellklumpen, die nach ca. 6 Wochen zu lymphoblastoiden Zelllinien (LCL) immortalisierten. Von den drei

Lymphozytensubpopulationen, B-, T- und Killer-Zellen immortalisiert EBV B-Zellen, so dass hauptsächlich proliferierende, lymphoblastoide B-Zellen verbleiben.

Zur qualitativen Überprüfung der immortalisierten Lymphozytensubpopulation wurden Fluoreszenzfärbungen und Durchflusszytometrien auf spezifische Rezeptoren durchgeführt, CD56 für Killer-Zellen, CD19 für B-Zellen und CD3 für T-Zellen (s. Abbildung 4.18). Sobald die lymphoblastoiden Zelllinien zu 99% B-Zellen enthielten, wurden sie für experimentelle Arbeiten eingesetzt. Insgesamt konnten 8 Kontroll- und 13 SCA3-lymphoblastoide Zelllinien hergestellt werden (s. Abbildung 4.19).

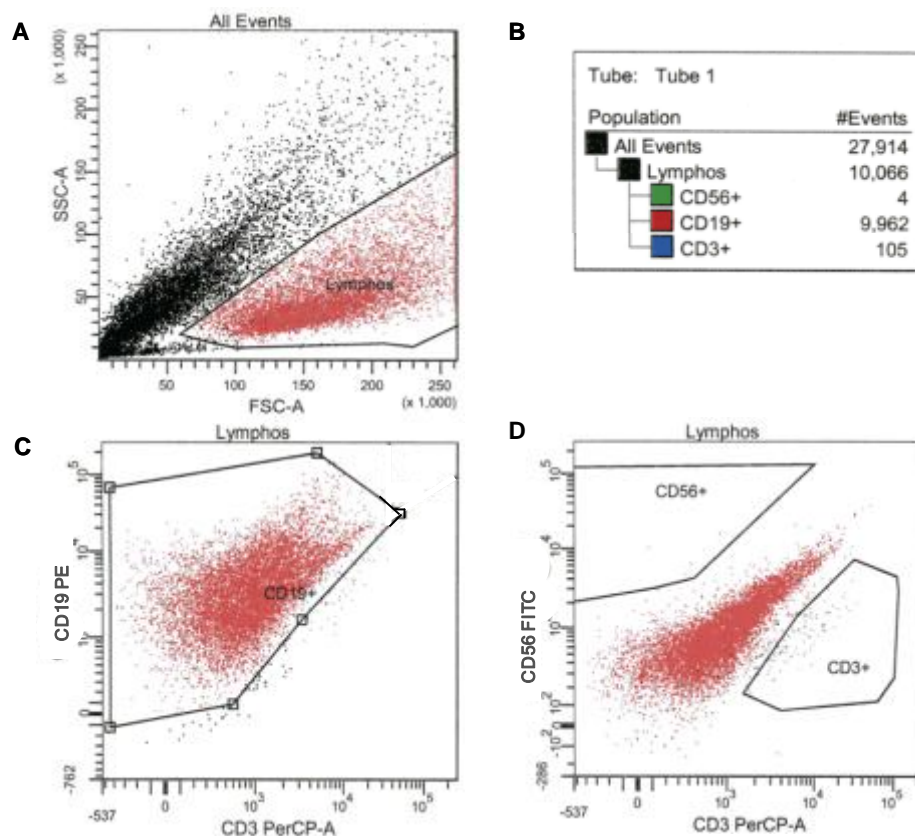


Abbildung 4.18: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse fluoreszenzmarkierter lymphoblastoider Zellen. **A.** Die mittels FACS sortierten Zellen werden nach Größe (SSC) und Granulいた (FSC) in einem Diagramm dargestellt und die zu untersuchende Lymphozytenpopulation mit einem Auswahlfeld (lymphoblastoide Zellen in rot - Lympnos) festgelegt. Alle auf der Diagonalen (links unten nach rechts oben) liegenden gemessenen Ereignisse stellen Salze oder Zelltrümmer dar. In **B** sind die gezählten Ereignisse der Durchflusszytometrie aufgeführt. **C. + D.** Die ausgewählte Lymphozytenpopulation wurde auf CD19-, CD56- und CD3-Färbung untersucht.

Pseudonym	Erkrankung	Geschlecht	Alter
AS	Kontrolle	w	47
HK	Kontrolle	m	42
IS	Kontrolle	w	44
MK	Kontrolle	w	36
PB	Kontrolle	m	44
SCH	Kontrolle	m	47
SPS	Kontrolle	w	49
UW	Kontrolle	m	47
BON-0006-001	SCA3	w	58
BON-0021-001	SCA3	m	55
BON-0029-001	SCA3	w	41
BON-0032-001	SCA3	m	43
BON-0032-002	SCA3	w	44
BON-0042-001	SCA3	m	38
BON-0042-002	SCA3	w	39
BON-0043-001	SCA3	m	42
BON-0049-001	SCA3	m	51
BON-0052-001	SCA3	w	60
BON-0054-001	SCA3	w	32
BON-0062-001	SCA3	m	58
SF	SCA3	m	40

Abbildung 4.19: Liste der hergestellten lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) mit der anonymisierten Angabe des Patienten sowie der Erkrankung, des Geschlechts und des Alters der Spenderperson. m – männlich; w – weiblich.

4.2.4. SOD2-Expression in humanen lymphoblastoiden Zellen (LCLs) von Kontroll- und SCA3-Patienten

Die etablierten humanen LCL-Zelllinien der SCA3-Patienten wurden als nächstes auf ihre SOD2-Expression überprüft. Dazu wurden zunächst mRNA- bzw. cDNA-Proben von acht SCA3- und sieben Kontroll-LCLs hergestellt. Mittels quantitativer PCR konnte auch bei den SCA3-LCLs eine verringerte SOD2-Genexpression im Vergleich zu den Kontroll-LCLs festgestellt werden. Diese war mit einem p-Wert von 0,11 im T-Test gerade nicht mehr signifikant ($p < 0,05$), zeigte jedoch eine deutliche Tendenz (s. Abbildung 4.20A). Zur Analyse der SOD2-Proteinexpression wurden Proteinlysate von vier SCA3- und fünf Kontroll-LCLs hergestellt, jeweils in Triplikaten mittels SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und auf SOD2, FOXO4, ATXN3 und Aktin untersucht (s. Abbildung 4.20C). Die immunreaktiven Banden der SOD2-Proteinexpression wurden densitometrisch ausgemessen und auf die jeweiligen Aktin-Banden normiert (s. Abbildung 4.20B).

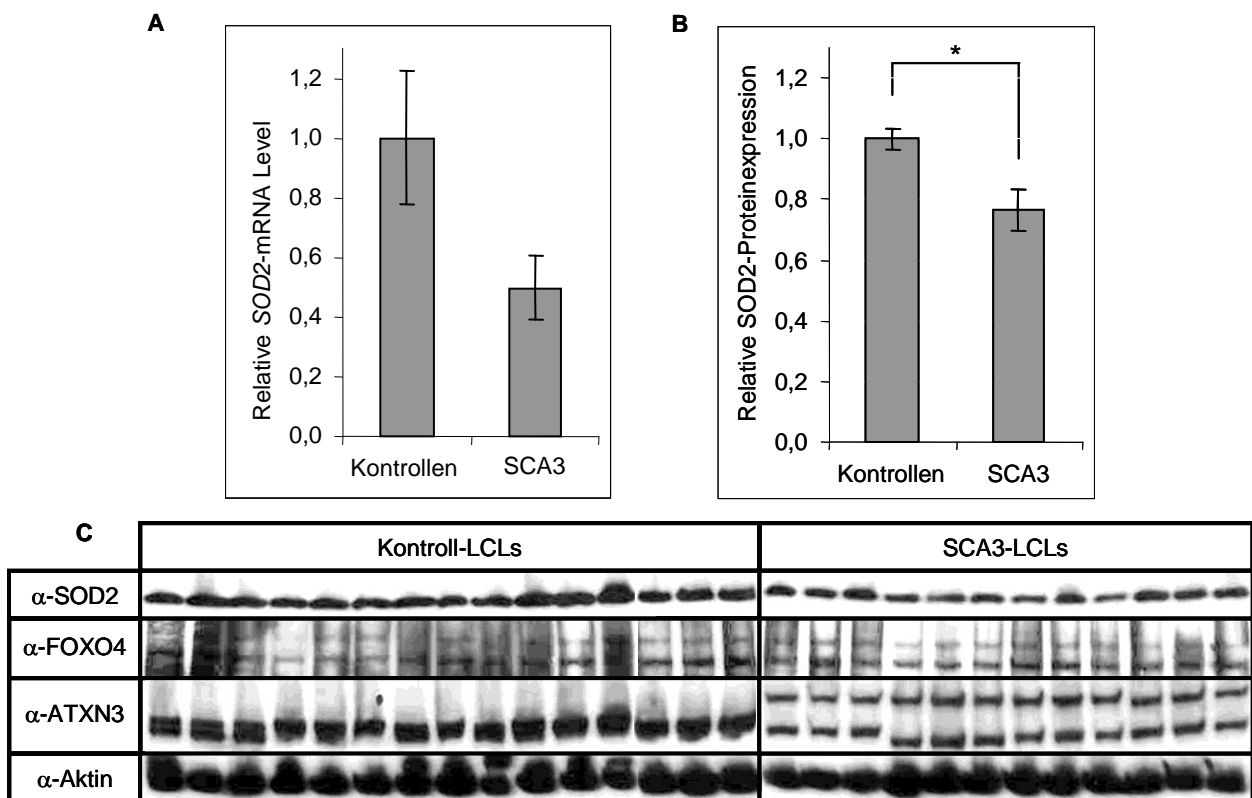


Abbildung 4.20: SOD2-mRNA- und Proteinlevels in Kontroll- und SCA3-LCLs. **A.** Dargestellt wurden zwei unabhängige Experimente von je 8 Kontroll- und 7 SCA3-LCLs, die auf Aktin normiert wurden. **B.** Quantifizierung der SOD2-Proteinexpression der in C. dargestellten Western-Blot-Analysen normiert auf Aktin. **C.** Western-Blot-Analyse der SOD2-, FOXO4-, ATXN3- und Aktin-Proteinexpression von 5 Kontroll- und 4 SCA3-LCLs ($n = 3 \pm \text{SEM}$; $p < 0,05$ *). LCL – lymphoblastoide Zelllinien; α - Antikörper.

Die Auswertung zeigte, dass die SCA3-LCLs eine signifikant geringere SOD2-Proteinexpression aufweisen als die Kontroll-LCLs. Im FOXO4-Western-Blot fanden sich bei allen Proben wie bei HeLa-Extrakten zwei FOXO4-Banden, die je nach Zelllinie unterschiedlich stark im Verhältnis zueinander exprimiert sind. Dabei war die 70kDa-Bande meist stärker als die 100kDa-Bande ausgeprägt. Insgesamt konnte jedoch kein Unterschied bei der FOXO4-Expression zwischen Kontroll- und SCA3-LCLs festgestellt werden. Die ATXN3-Western-Blot-Analyse bestätigte, dass die SCA3-LCLs ein normales und ein expandiertes Allel aufweisen, während die Kontrollen meistens zwei normale ATXN3-positive Banden annähernd gleicher Größe zeigten.

4.2.5. Knockdown von ATXN3 durch RNA-Interferenz in LCLs

Die verringerte SOD2-Expression in SCA3-Pons und -LCLs sowie die synergistische Aktivierung des SOD2-Reportergenkonstruktes durch FOXO4 und ATXN3Q23 lassen vermuten, dass die SOD2-Genexpression von FOXO4 und ATXN3 gemeinsam reguliert wird und möglicherweise durch die PolyQ-Expansion in SCA3-Patienten unterdrückt wird. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Pfeifer (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Life & Brain, Bonn) wurde eine ATXN3-spezifische shRNA (short hairpin RNA; Burnett & Pittman, 2005) in einen lentiviralen Vektor kloniert und lentivirale Partikel hergestellt. Die ATXN3-shRNA soll dabei die Expression sowohl des normalen als auch des expandierten ATXN3 durch RNA-Interferenz unterdrücken. Um unspezifische „off-target“ Effekte dabei auszuschließen, wurde außerdem eine „scrambled“ shRNA als Negativkontrolle eingesetzt. Die optimale Zellzahl und minimale Konzentration zur Transduktion der lentiviralen Partikel wurden durch Vorexperimente ermittelt. Nach Transduktion einer SCA3-LCL-Zelllinie mit aufsteigenden Virus-Konzentrationen der ATXN3-spezifischen und der Kontroll-shRNA wurden nach 3 Tagen Zelllysate hergestellt und diese mittels SDS-PAGE und Western-Blot auf ATXN3-, SOD2-, FOXO4- und Aktin-Expression analysiert (s. Abbildung 4.21). Der Western-Blot zeigte, dass sowohl die Expression des expandierten als auch des normalen ATXN3 durch ansteigende Konzentrationen von ATXN3-spezifischen shRNA-Viren unterdrückt werden kann. Die Expression des ATXN3-Proteins verringerte sich auf 28% des ursprünglich gemessenen Expressionslevels. Die Verringerung der ATXN3-Expression korrelierte gleichzeitig mit einer kontinuierlichen Abnahme der SOD2-Expression (auf 7%), während die FOXO4- und Aktin-Expression unverändert blieb. Die Transduktion der SCA3-LCL mit der Kontroll-shRNA veränderte dagegen die Expression keines der untersuchten Proteine. Damit konnte gezeigt werden, dass normales ATXN3 bei der SOD2-Expression beteiligt ist.

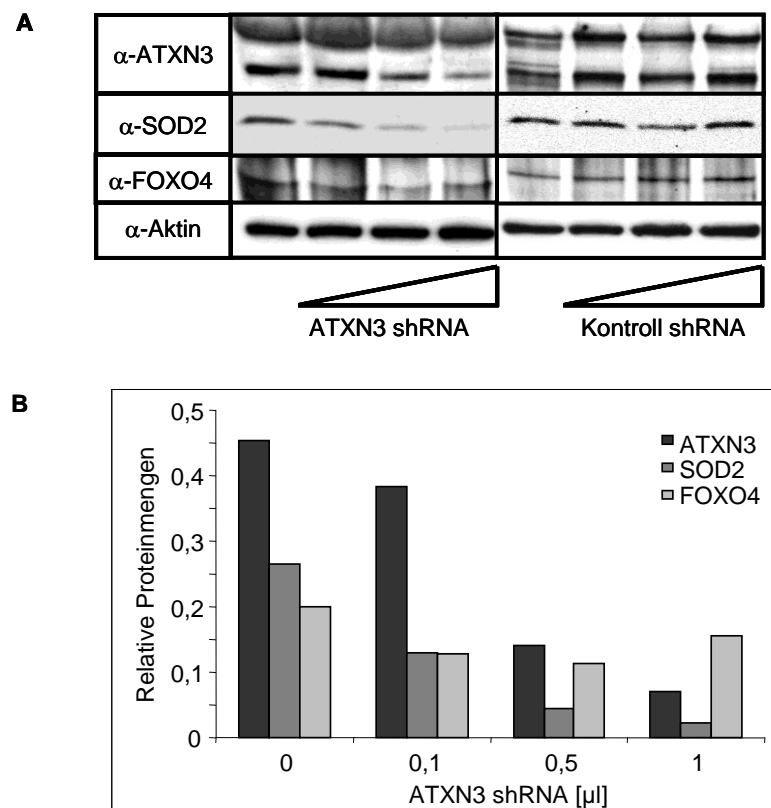


Abbildung 4.21: ATXN3-Knockdown in einer SCA3-LCL durch lentivirale Transduktion einer ATXN3-spezifischen shRNA. A. Die Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen an Viren transduziert und auf die ATXN3-, SOD2-, FOXO4- und Aktin-Proteinexpression mittels SDS-PAGE und Western-Blot untersucht. Während bei der Kontroll-shRNA (rechts) die Expression der untersuchten Proteine unverändert blieb, verringerte sich mit zunehmender Konzentration der ATXN3-spezifischen shRNA-exprimierenden Viren die ATXN3-Expression und gleichzeitig wurde dadurch die SOD2-Expression verringert. **B.** Densitometrische Analyse der mit ATXN3-shRNA transduzierten SCA3-LCLs. shRNA – short hairpin RNA; LCL – lymphoblastoide Zelllinien; α - Antikörper.

4.2.6. ATXN3 bindet an den humanen SOD2-Genpromotor

Das humane *SOD2*-Gen ist ein FOXO-Zielgen, dessen Expression durch FOXO4 und ATXN3 synergistisch aktiviert werden konnte. Um zu überprüfen, ob ATXN3 am *SOD2*-Genpromotor bindet, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIP) durchgeführt. Dazu wurde quervernetztes Chromatin von LCLs hergestellt und mit einer Nuklease enzymatisch fragmentiert. Nach Optimierung der Zellzahl und der Konzentration der

Micrococcal Nuklease wurden von je zwei SCA3- und zwei Kontroll-LCLs Chromatin präpariert (s. Abbildung 4.22).

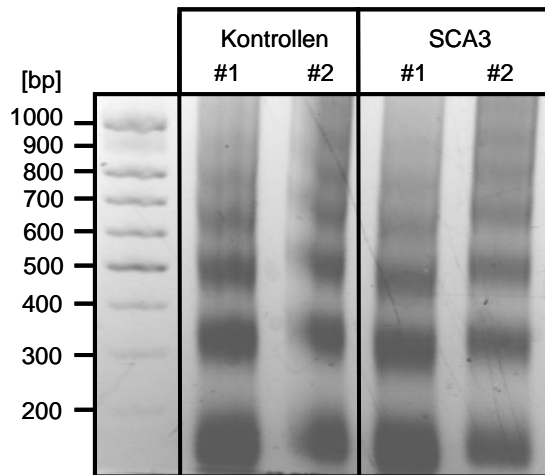


Abbildung 4.22: Elektrophoretische Auftrennung der präparierten Chromatinfragmente aus Kontroll- und SCA3-LCLs. Es wurden jeweils aus zwei Kontroll- und zwei SCA3-LCL-Zelllinien fixiert Chromatin präpariert und auf einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Da die Nuklease zwischen den Nukleosomen schneidet, wurden Fragmente der Größe eines oder bis zu 5 Nukleosomen sichtbar (150-900bp).

Von jeder Chromatinpräparation wurden dann Immunpräzipitationen mit einem ATXN3-, IgG- (als Negativkontrolle) und Histon-3 (H3)-Antikörper (als Positivkontrolle) angesetzt. Das präzipitierte Chromatin wurde aufgereinigt und mittels qPCR in Triplikaten auf die Bindung von ATXN3 am *SOD2*-Promotor analysiert (s. Abbildung 4.23). Für die quantitative PCR wurde ein distaler Bereich vom *SOD2*-Genpromotor amplifiziert, der eine FOXO-Bindungsstelle enthält (Adachi *et al.*, 2007; s. Abbildung 4.23). Der humane *SOD2*-Genpromotor enthält insgesamt zwei FOXO-Bindungsstellen, wobei die hier untersuchte für die Genaktivierung verantwortlich ist (Kops *et al.*, 2002). Die Analyse der ATXN3-präzipitierten Chromatinfragmente ergab, dass sowohl in Kontroll- als auch in SCA3-LCLs eine spezifische Anreicherung bzw. Bindung von ATXN3 am *SOD2*-Genpromotor vorkommt, wobei diese in SCA3-Patienten geringer ausfällt.

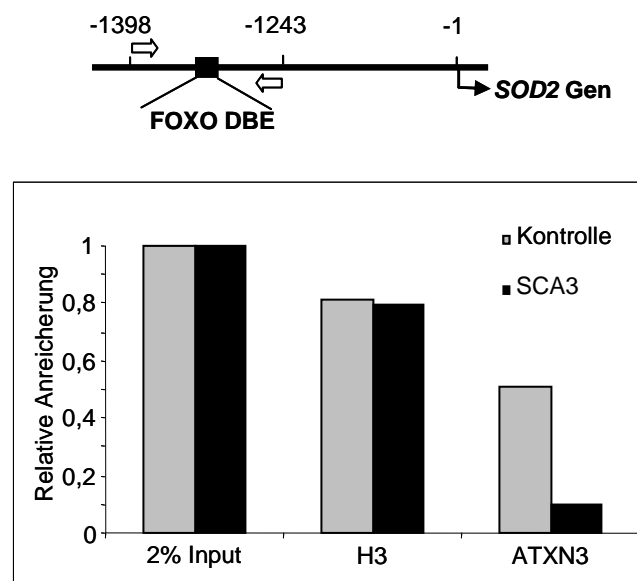


Abbildung 4.23: QPCR-Analyse des humanen *SOD2*-Genpromotorbereichs [-1398 bis -1243] nach ChIP mit ATXN3-, IgG- und H3-Antikörpern. Die schematische Darstellung (oben) skizziert den analysierten *SOD2*-Promotorbereich. Die weißen Pfeile stellen dabei die verwendeten „sense“ und „antisense“ Oligonukleotide dar. Diese amplifizieren einen Promotorbereich, der die distale FOXO-DNA-Bindungsstelle (FOXO DBE) enthält. Der im Diagramm (unten) dargestellte Input entspricht jeweils 2% des für die Immunpräzipitation eingesetzten Chromatins. Alle Proben wurden in Triplikaten angesetzt und auf die jeweilige IgG-Immunpräzipitation normiert. Als Positivkontrolle wurde jeweils eine Histon-3 (H3)-Immunpräzipitation durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei unabhängige experimentelle Ansätze.

4.2.7. SCA3-LCLs besitzen erhöhte Spiegel endogener reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS)

Die SOD2 ist ein manganhaltiges Enzym, das in Mitochondrien oder Peroxisomen vorkommt. Es wirkt antioxidativ, da es in seiner oxidierten Form Hyperoxidanionen (auch Superoxidanionen), eine Art reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS), zu Wasserstoffperoxid umwandelt ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$), das wiederum von einem anderen Enzym, der Katalase, abgebaut wird. ROS entstehen in den Mitochondrien der Zelle als Nebenprodukt der Zellatmung oder bei oxidativem Stress. Sie können für den Organismus schädlich sein, da sie Proteine und Lipide oxidieren. Die verringerte Expression der SOD2 in SCA3-LCLs könnte zu einer erhöhten ROS-Bildung führen, da für den SOD2-Knockdown schon der Zusammenhang mit erhöhten endogenen ROS-Level

gezeigt wurde (Sasabe *et al.*, 2010). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die endogenen ROS-Level der SCA3- und Kontroll-LCLs mittels Messung der intrazellulären Oxidation von 2',7'-Dichlorofluoreszein (H₂DCF) verglichen (s. Abbildung 4.24). Dazu wurden 8 Kontroll- und 13 SCA3-LCLs in Triplikaten mit 100µM H₂DCF inkubiert und die entstehende Fluoreszenz gemessen. Zur Normierung der ROS-Level wurde die Anzahl lebender Zellen in den jeweiligen Ansätzen mit Alamarblau-Färbung bestimmt. Die Auswertung zeigte, dass die SCA3-LCLs signifikant mehr ROS pro lebende Zelle bilden als die Kontroll-LCLs.

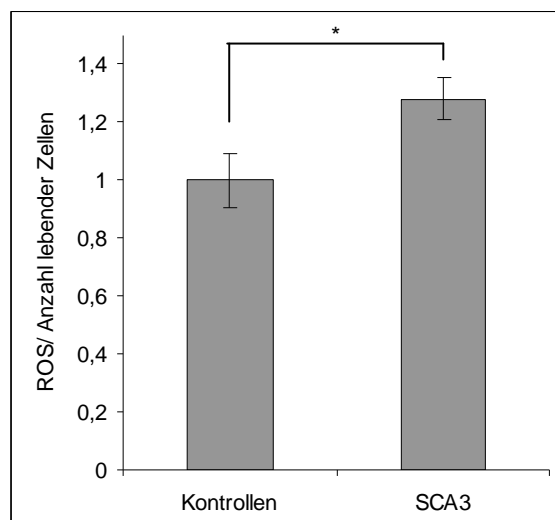


Abbildung 4.24: ROS-Messung der Kontroll- und SCA3-LCLs normiert auf die Anzahl lebender Zellen. Die SCA3-LCLs bilden signifikant mehr ROS als die Kontroll-LCLs. Es wurden 8 Kontroll- und 13 SCA3-LCLs verwendet ($n = 3 \pm \text{SEM}$; $p < 0,05$ *). ROS – reaktive Sauerstoffverbindungen; LCL – lymphoblastoide Zelllinien.

4.2.8. Oxidativer Stress als Stimulus zur Aktivierung der SOD2-Expression über FOXO4 und ATXN3

4.2.8.1. Nukleäre Translokation von FOXO4 und ATXN3 korreliert mit erhöhter SOD2-Expression in HeLa-Zellen nach H₂O₂-Behandlung

Oxidativer Stress kann zur Aktivierung und nukleären Translokation von FOXO4 führen (Brenkman *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2010). Außerdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass ATXN3 unter oxidativem Stress ebenfalls aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert (Reina *et al.*, 2009).

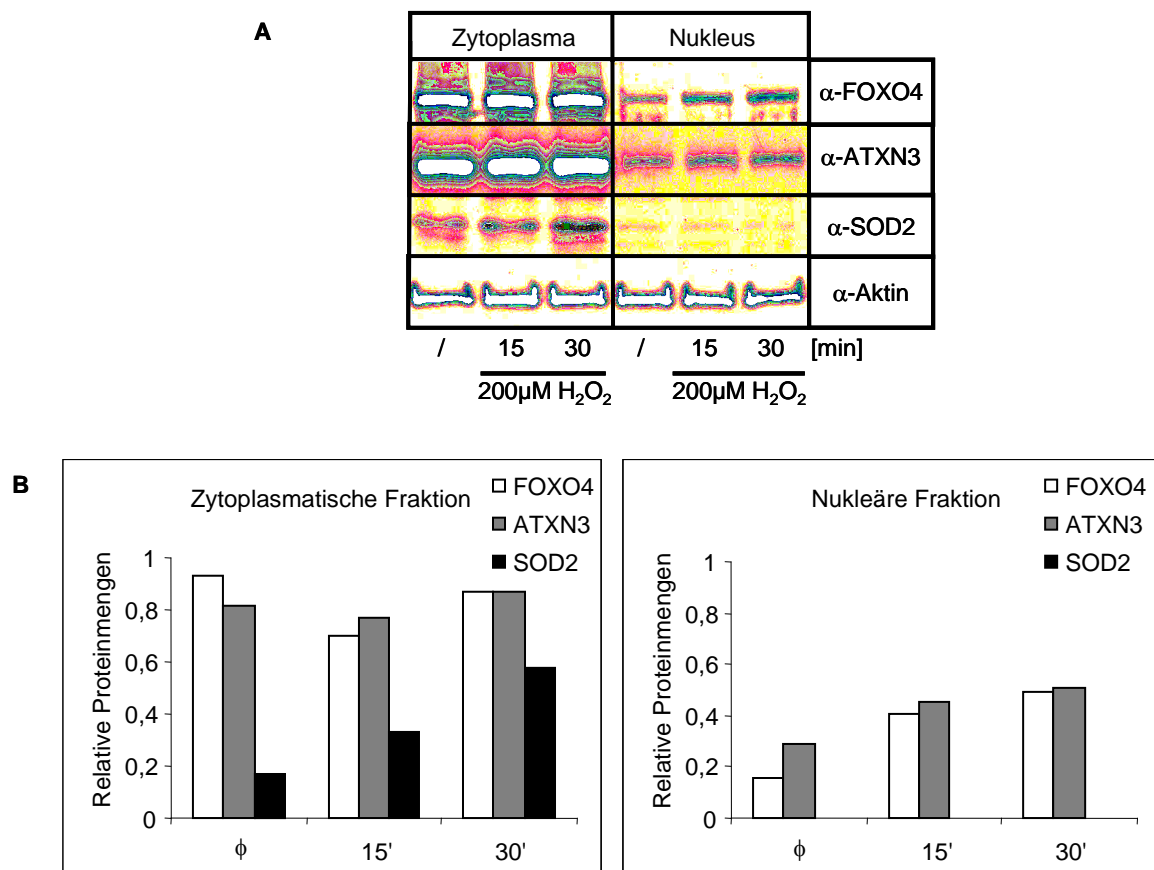


Abbildung 4.25: H₂O₂-Behandlung von HeLa-Zellen im Zeitverlauf und Western-Blot-Analyse der ATXN3-, FOXO4-, SOD2- und Aktin-Expression. A. Nach H₂O₂-Behandlung kam es zu einer erhöhten FOXO4- und ATXN3-Proteinexpression im Nukleus. Gleichzeitig stieg die SOD2-Expression im Zytoplasma an. **B.** Densitometrische Auswertung der FOXO4-, ATXN3- und SOD2-Proteinexpression im Zytoplasma und im Nukleus. ϕ – unbehandelt. α - Antikörper.

Um zu überprüfen, ob durch Behandlung mit H₂O₂ eine Änderung der subzellulären Lokalisierung von ATXN3 und FOXO4 erfolgt, wurden zunächst HeLa-Zellen für verschiedene Zeiträume mit 200µM H₂O₂ behandelt, die Zellen in zytoplasmatische und nukleäre Extrakte fraktioniert und im Western-Blot auf endogenes FOXO4, ATXN3, SOD2 und Aktin untersucht (s. Abbildung 4.25). Die Behandlung bewirkte eine schnelle, zeitabhängige, nukleäre Translokation von FOXO4 und ATXN3. Gleichzeitig konnte eine Erhöhung der SOD2-Expression im Zytoplasma nach 15 und 30min festgestellt werden. Im Nukleus konnte dagegen keine SOD2-Expression nachgewiesen werden, da es sich bei der SOD2 um ein zytoplasmatisches Protein handelt.

Demnach induziert oxidativer Stress eine nukleäre Translokation von FOXO4 und ATXN3, die mit einer erhöhten SOD2-Expression einhergeht.

4.2.8.2. H₂O₂-Behandlung führt zu erhöhter SOD2-Gen- und Proteinexpression in Kontroll-LCLs, nicht aber in SCA3-LCLs

Um die Auswirkungen von oxidativem Stress weiter im Zusammenhang mit der SCA3 zu untersuchen, wurden jeweils vier SCA3-LCLs und vier Kontroll-LCLs mit 0,5mM H₂O₂ behandelt, RNA isoliert und mittels quantitativer PCR die SOD2-Genexpression untersucht. Während die H₂O₂-Behandlung in Kontroll-LCLs bereits nach 5min zu einem signifikanten Anstieg der SOD2-Genexpression führte und nach 15min wieder abnahm, konnte bei den SCA3-LCLs zu keinem der beiden Zeitpunkte eine Änderung der SOD2-Genexpression festgestellt werden (s. Abbildung 4.26A). Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der SOD2-Proteinexpression in den LCL-Zelllinien nach H₂O₂-Behandlung. Abbildung 4.26B zeigt exemplarisch für eine Kontroll- und eine SCA3-Zelllinie, dass es durch die H₂O₂-Behandlung nach 5min zu einer höheren Expression der SOD2 kam, während diese im SCA3-LCL unverändert blieb. Die FOXO4- und ATXN3-Proteinlevels veränderten sich nicht durch die Behandlung. Somit zeigen SCA3-LCLs nicht nur eine geringere endogene SOD2-Expression, sondern können offenbar die SOD2-Expression unter oxidativem Stress nicht steigern.

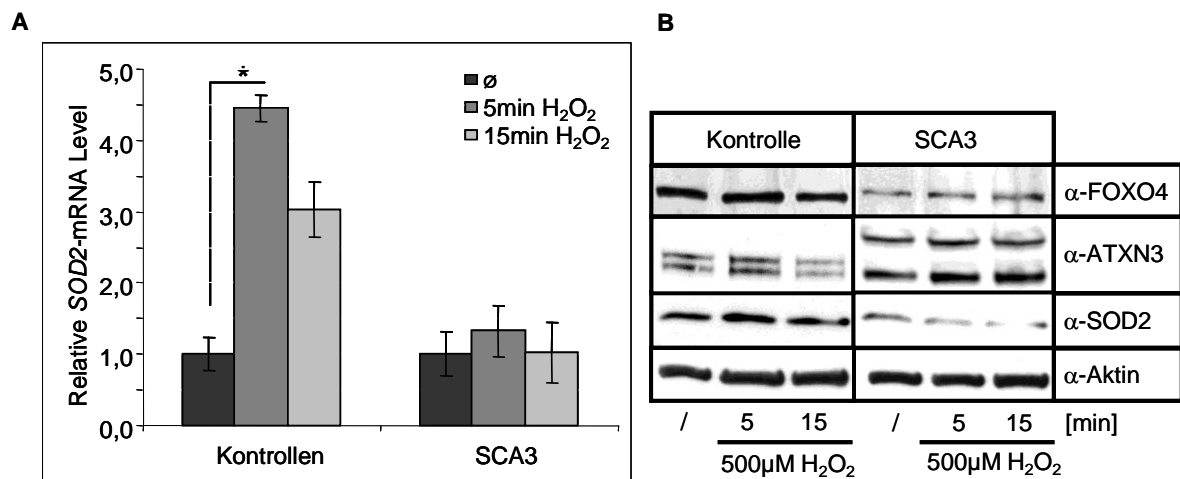


Abbildung 4.26: SOD2-Gen- und -Proteinexpressionsanalyse nach H₂O₂-Behandlung in SCA3- und Kontroll-LCLs. **A.** SOD2-Genexpression von je vier Kontroll- und vier SCA3-LCLs unbehandelt, nach 5min und 15min 500µM H₂O₂-Behandlung. Die SOD2-Genexpression wurde in den Kontroll-LCLs signifikant nach 5min H₂O₂-Behandlung induziert, während diese in den SCA3-LCLs unverändert blieb. Die qPCR wurde auf drei Haushaltsgene normiert (Aktin, GAPDH, HPRT) (n = 3 ± SEM; p < 0,05 *). **B.** Western-Blot-Analyse der FOXO4-, ATXN3-, SOD2- und Aktin-Proteinexpression in jeweils einer Kontroll- und einer SCA3-Zelllinie. Die SOD2-Proteinexpression erhöht sich nach 5min in der Kontroll-Zelllinie, nicht aber in der SCA3-Zelllinie. α- Antikörper.

4.2.9. Verringerte Viabilität von SCA3-LCLs bei oxidativem Stress

Es konnte gezeigt werden, dass SCA3-LCLs grundsätzlich höhere ROS-Spiegel aufweisen und auf oxidativen Stress nicht mit einer Aufregulierung der antioxidativen SOD2 reagieren können. Die verringerte Expression der SOD2 könnte daher auch mit einer erhöhten Vulnerabilität bei oxidativem Stress einhergehen. Um diese Annahme zu untersuchen, wurde jeweils die gleiche Anzahl lebender Zellen von 6 Kontroll- und 6 SCA3-LCLs ausgesät und über einen Zeitraum von 72h täglich mit 100µM H₂O₂ behandelt und die Viabilität mit einer Trypanblau-Färbung bestimmt. Die Wachstumskurven zeigten, dass sich die Anzahl unbehandelter Kontroll- und SCA3-LCL über 72h ungefähr verdoppelt (s. Abbildung 4.27). Die H₂O₂-Behandlung führte dagegen zu einer schnellen Abnahme lebender Zellen. Dabei sterben die SCA3-LCLs bereits nach 24h Behandlung mit 100µM H₂O₂ signifikant schneller als die Kontrollen.

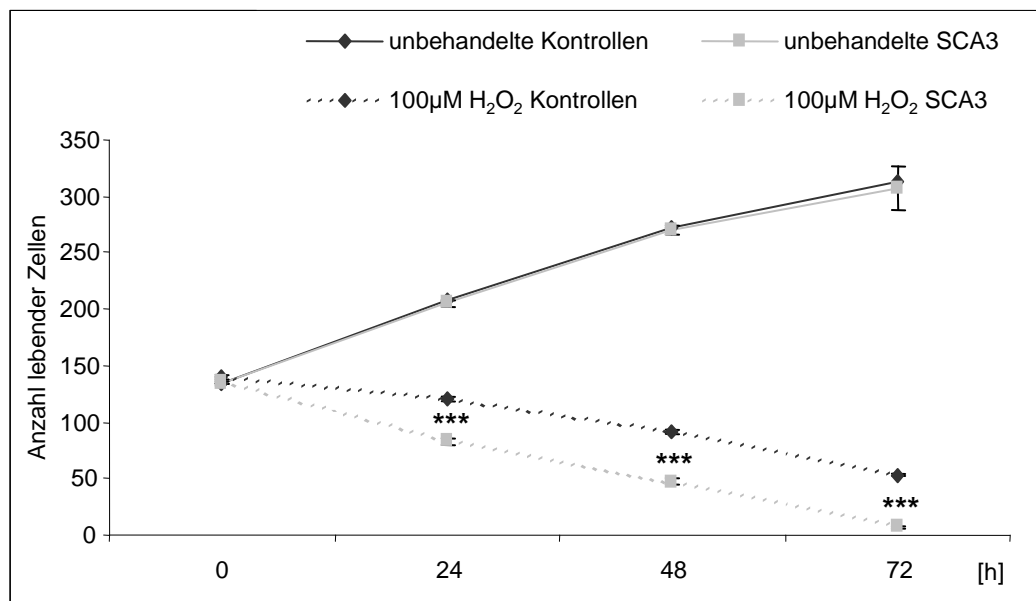


Abbildung 4.27: Wachstum un behandelter und mit 100µM H₂O₂ behandelter Kontroll- und SCA3-LCLs im Zeitverlauf über 72h. Die SCA3-LCL sterben unter oxidativem Stress signifikant schneller als die Kontroll-LCLs. Insgesamt wurden jeweils 6 Zelllinien analysiert ($n = 3 \pm \text{SEM}$; $p < 0,001$ ***).

5. DISKUSSION

Die Transkription ist der erste Schritt zur Genexpression. Sie wird durch epigenetische Modifikationen (DNA-Methylierung oder Histonmodifikation) und Transkriptionsregulatoren beeinflusst. Als Transkriptionsregulatoren gelten Transkriptionsfaktoren und transkriptionelle Koregulatoren, die sowohl aktivierend als auch hemmend in die Transkription eingreifen. Acht Prozent der humanen Gene kodieren Transkriptionsfaktoren (Babu *et al.*, 2004), die sich wiederum in generelle und spezifische Transkriptionsfaktoren aufteilen. Die FOXO-Proteine sind eine Familie spezifischer „winged-helix“-Transkriptionsfaktoren, die weit verbreitet exprimiert werden und wiederum ein breites Spektrum an Bindungspartnern besitzen. Auf diese Weise wird ein noch viel größeres Spektrum verschiedener, zelltypspezifischer transkriptioneller Antworten erzeugt, welche meist aktivierend, aber auch hemmend auf die Genexpression Einfluss nehmen (van der Vos & Coffey, 2008). Eine Funktion der FOXO-Transkriptionsfaktoren ist die Aktivierung der antioxidativen Abwehr der Zelle bei oxidativen Stress. Die *Superoxiddismutase-2 (SOD2)* ist in diesem Zusammenhang ein bekanntes, in verschiedenen Spezies konserviertes Zielgen der FOXO-Transkriptionsfaktorfamilie und essentiell für den Abbau von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) (Kops *et al.*, 2002; Nemoto & Finkel, 2002; Kuiperij *et al.*, 2005; Essers *et al.*, 2005; Adachi *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATXN3 zusammen mit dem Transkriptionsfaktor FOXO4 als transkriptioneller Koaktivator bei der Regulation der *SOD2*-Genexpression beteiligt ist. Dabei interagiert ATXN3 direkt mit FOXO4 und bindet *in vivo* am endogenen *SOD2*-Genpromotor in der Nähe des FOXO-Konsensusmotivs. So verstärkt ATXN3 mit normaler PolyQ-Länge die FOXO4-abhängige Transkription des *SOD2*-Gens, während expandiertes ATXN3 mit einer Verringerung der *SOD2*-Expression assoziiert ist. Bei SCA3-Patienten ist die *SOD2*-Expression sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene reduziert und kann auch unter oxidativem Stress nicht gesteigert werden. Die beobachteten, erhöhten ROS-Mengen in SCA3-LCLs könnten daher auf die verringerte *SOD2*-Expression

zurückzuführen und für die erhöhte Zytotoxizität gegenüber oxidativem Stress verantwortlich sein.

5.1. ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren

ATXN3 kann als transkriptioneller Korepressor fungieren und über Histondeazetylierung bzw. Chromatinmodifikation die Expression von bestimmten Genen wie der des *MMP2*-Gens regulieren. Als Transkriptionsregulator interagiert ATXN3 mit Histonen oder in transkriptionellen Komplexen mit Koregulatoren wie CBP, TBP, NCoR und HDAC3 (Li *et al.*, 2002; Evert *et al.*, 2006). Auf der Suche nach ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren, wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarray durchgeführt. Hierzu wurden nukleäre Extrakte aus verschiedenen CSM14.1-Rattenzelllinien hergestellt, die normales und expandiertes ATXN3 überexprimieren (Evert *et al.*, 1999), und zusammen mit einem nukleären Extrakt aus HeLa-Zellen für die Hybridisierung des Arrays verwendet. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, auf indirektem Wege ATXN3-interagierende Transkriptionsfaktoren über ihre bekannten Konsensusmotive zu identifizieren. Die Spezifität der immunpräzipitierten ATXN3-DNA/ Proteinkomplexe wurde durch verschiedene Kontrollen überprüft. Als Positivkontrolle wurde zum Einen das Vorhandensein von ATXN3 und zum Anderen das des bekannten Interaktionspartners HDAC3 überprüft. Als Negativkontrolle wurden Immunpräzipitationen mit einem IgG-Kontroll-Antikörper durchgeführt, um unspezifische vom ATXN3-Antikörper gebundene Transkriptionsfaktoren und/ oder ihre DNA-Konsensusmotive auszuschließen. Bei der qualitativen Auswertung wurde außerdem ein densitometrischer Mindestgrenzwert festgelegt, um die Zuordnung falschpositiver Hintergrundsignale zu verringern. Von den resultierenden 42 Konsensus-motiven der potenziell mit ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren (s. Abbildung 4.3) wurden anschließend Transkriptionsfaktoren ausgewählt, die in allen drei Zelllinien vorkamen und somit unabhängig vom Zelltyp und von der PolyQ-Länge mit ATXN3 interagierten.

Diese interagierenden Transkriptionsfaktoren könnten grundsätzliche transkriptionelle Signalwege der Zelle aufzeigen, die physiologisch von ATXN3 kontrolliert werden. Durch

das Transkriptionsfaktorprofil ergaben sich die folgenden drei Kandidaten: Transkriptionsfaktor IID (TFIID), Forkheadbox Protein-O4 (FOXO4) und Wilms-Tumor-Protein-1 (WT1). Bei den EMSA-Analysen (s. Abbildung 4.4; Abbildung 4.5) konnten nur FOXO4 und WT1 als ATXN3-interagierende, DNA-bindende Faktoren bestätigt werden, nicht jedoch der generelle Transkriptionsfaktor TFIID. Zwar wurden TFIID-enthaltende DNA-bindende Proteinkomplexe im nukleären Extrakt aus HeLa-Zellen gebildet, jedoch enthielten diese kein ATXN3, wie die Zugabe des ATXN3-Antikörpers und der fehlende „Supershift“ zeigte. Eine mögliche Erklärung für die falschpositive Bindung der TFIID-Sonde an die ATXN3-enthaltenden, DNA-bindenden Proteinkomplexe könnte in einer zu geringen Stringenz bei der Immunpräzipitation der Konsensusmotive begründet liegen. Stringentere Bedingungen könnten bei den nachfolgenden EMSA-Analysen eine Bindung von TFIID verhindert haben. Eine andere Möglichkeit sind zelltyp- und genspezifische Unterschiede bei der Zusammensetzung der TFIID-enthaltenden Transkriptionsinitiationskomplexe, die eine Bindung an die TFIID-Sonde bzw. den ATXN3-spezifischen Proteinkomplex unterdrückt haben könnten (D’Alessio *et al.*, 2009). Die verbleibenden Transkriptionsfaktoren FOXO4 und WT1 bildeten unabhängig von Zelltyp und PolyQ-Länge, ATXN3-enthaltende, DNA-bindende Proteinkomplexe mit ihren jeweiligen Konsensusmotiven in HeLa-Zellen und den untersuchten CSM14.1-Zelllinien. Dabei erzeugten WT1- und FOXO4-DNA-Sonden mit CSMQ23-Extrakten deutlich stärkere, spezifische Komplexe als mit CSMQ70-Extrakten. Dies weist auf eine veränderte Komplexbildung und DNA-Bindung durch das verlängerte PolyQ-Repeat hin (s. 4.2.6).

5.2. Expression und Lokalisation der ATXN3-interagierenden Transkriptionsfaktoren

WT1 ist ein Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, der durch Mutation verschiedene Tumore verursacht, wie den namensgebenden Nierentumor Wilms-Tumor. WT1 wird hauptsächlich in Nieren, Nebennieren, Keimdrüsen, Milz, Retina, Leber und Herz exprimiert (Hartkamp & Roberts, 2008). Bei den zellulären Fraktionierungsanalysen der CSM14.1- und der HeLa-Zellen (s. Abbildung 4.6) konnten verschiedene zelltyp- und

fraktionsspezifische Isoformen des WT1-Proteins dargestellt werden, wobei die vorwiegende Form mit 55kDa der Vollängen WT1-Isoform entspricht. Die kleineren WT1-Isoformen lassen sich über die für WT1 bekannten, alternativen Spleißvarianten durch einen alternativen Translationsstart und RNA-Editierung erklären. Sowohl die Unterschiede in der WT1-Expression bei den ATXN3-überexprimierenden CSM14-1-Zelllinien als auch die zytoplasmatische Kolo-kalisation von WT1 und ATXN3 bei SCA3- und Kontroll-Ponsschnitten (s. Abbildung 4.7; Abbildung 4.8) lassen einen funktionellen Zusammenhang beider Proteine vermuten. Aufgrund der jedoch nicht nachweisbaren Interaktion mit verschiedenen GST-ATXN3-Varianten, wurde WT1 in dieser Arbeit nicht weiter analysiert und auf FOXO4 als Interaktionspartner fokussiert.

FOXO4 ist ein FOX-Protein der Klasse O, das im Herz, im Skelettmuskel, im Fettgewebe, in der Leber und im Gehirn von adulten Mäusen exprimiert wird (Furuyama *et al.*, 2000; Biggs III *et al.*, 2001). Die Untersuchung der subzellulären Lokalisation von FOXO4 mittels Zellfraktionierung und Western-Blot-Analyse der verschiedenen Zelllinien zeigte sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus eine prominente Bande von 70kDa (s. Abbildung 4.6). In HeLa-Zellen fand sich außerdem im Zytoplasma und im Nukleus eine 100kDa-Bande, die spezie- oder zelltypspezifisch sein oder durch posttranslationale Modifikationen von FOXO4 entstehen könnte. Das Expressionsniveau von FOXO4 war bei allen Zelllinien und Fraktionen vergleichbar, so dass eine durch die Überexpression von ATXN3Q23 oder ATXN3Q70 hervorgerufene Veränderung der FOXO4-Expression in CSM14.1-Zellen ausgeschlossen werden kann.

Sowohl die histologischen Lokalisationsstudien als auch die biochemischen Interaktionsstudien zeigten eine physiologische, PolyQ-unabhängige Interaktion von FOXO4 und ATXN3 im Nukleus. Die nukleäre Translokation und Aktivierung von FOXO4 scheint dabei die Voraussetzung für eine Interaktion mit nukleärem ATXN3 zu sein, da erst durch die Verwendung eines konstitutiv im Zellkern exprimierten FOXO4 eine Kolo-kalisation beider Proteine gezeigt werden konnte (s. 4.2.8.1).

Da in der *in vitro* Analyse eine direkte Interaktion von rekombinantem His-FOXO4 mit GST-ATXN3 (s. 4.1.6) über die Josephin-Domäne von ATXN3 und dem N-Terminus von FOXO4 gezeigt werden konnte, sind für die Interaktion der beiden Proteine keine posttranslationalen Modifikationen notwendig. Darüber hinaus zeigten auch die Koimmunpräzipitationen von FOXO4 mit ATXN3 aus Zelllysaten keine zusätzlichen

Banden im Western-Blot, die auf posttranslationale Modifikationen hinweisen könnten (s. 4.1.4; 4.1.5). Die Interaktion erfolgt somit wie beim „valosin-containing“ Protein (VCP) direkt über die Josephin-Domäne und ohne weitere posttranslationale Modifikationen (Boeddrich *et al.*, 2006). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass FOXO4 bei der physiologischen Interaktion mit ATXN3 ubiquitiniert, phosphoryliert, azetyliert oder glykosyliert vorliegt. So könnte azetyliertes bzw. ubiquitiniertes FOXO4 ein Substrat von ATXN3 darstellen und dessen transkriptionelle Aktivität beeinflussen. Der Einfluss dieser posttranslationalen Modifikationen auf die transkriptionelle Aktivität von FOXO4 wurde bereits gezeigt. Sowohl die NAD-abhängige Deazetylierung über hSir2 als auch die Monoubiquitinierung über Mdm2 aktivieren FOXO4 transkriptionell, während die umgekehrten Prozesse, Azetylierung über CBP und Deubiquitinierung über USP7/HAUSP, FOXO4 inaktivieren (van der Horst *et al.*, 2004; van der Horst *et al.*, 2006; Brenkman *et al.*, 2008).

Die *in vitro* Interaktionsanalyse hat ferner eine verringerte Bindung von rekombinantem FOXO4 zu ATXN3Q70 gezeigt. Dieser Befund könnte von pathophysiologischer Bedeutung sein, obwohl die *in vitro* Analyse keinen direkten Rückschluss auf die Bindungsaffinitäten in der Zelle zulässt. Da die Koimmunpräzipitationen und GST-Pulldown-Experimente stets vergleichbare Mengen von ATXN3 bzw. FOXO4 mit den verschiedenen Zelllysaten präzipitierten, könnte die verringerte Bindung von ATXN3Q70 und FOXO4 der *in vitro* Interaktionsanalyse auch ein Artefakt darstellen. Zur genaueren Bestimmung der Bindungsaffinität von FOXO4 und den verschiedenen GST-ATXN3-Varianten könnten in der Zukunft Biacore-Analysen hilfreich sei.

5.3. ATXN3 verstärkt die Transkription FOXO4-abhängiger Gene

Nachdem die Protein-Protein-Interaktion und DNA-Bindung von FOXO4 mit ATXN3 gezeigt werden konnte, stellte sich die Frage, ob durch die Interaktion die Transkription von FOXO4-Zielgenen funktionell beeinflusst wird. Die Reporterstudien zeigten, dass der künstliche FOXO-Promotor (s. 4.2.1), der nur vier aufeinander folgende FOXO-Konsensusmotive ((T/A)(A/T)AACA) enthält (Furuyama *et al.*, 2000; Biggs III *et al.*, 2001),

durch FOXO4 signifikant aktiviert wird. Die Koexpression von FOXO4 mit ATXN3Q23 führte darüber hinaus zu einer massiven, synergistischen Steigerung der Reporteraktivität, die durch die Koexpression von FOXO4 mit ATXN3Q70 nicht erreicht wurde. In ähnlicher Weise konnte auch das humane *SOD2*-Promotorkonstrukt signifikant von FOXO4 und ATXN3Q23 aktiviert werden. Obwohl eine synergistische Aktivierung durch FOXO4 und ATXN3Q23 nicht erzielt werden konnte, wurde durch die Koexpression von FOXO4 und ATXN3Q23 eine signifikante, additive Steigerung der transkriptionellen *SOD2*-Reporteraktivität erreicht. Dagegen konnte eine über die von FOXO4 hinausgehende Aktivierung des *SOD2*-Promotors mit ATXN3Q70 nicht erzielt werden. Die Aktivierung der *SOD2*-Gentranskription kann demzufolge nur mit normalem ATXN3, nicht aber mit expandiertem ATXN3 verstärkt werden.

Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass die synergistische Aktivierung des FOXO4-abhängigen Reporterkonstrukts durch eine funktionelle Interaktion von ATXN3 und FOXO4 entstehen könnte. Eine transkriptionelle Verstärkung von FOXO4 durch eine direkte Interaktion wurde für Beta-Katenin beschrieben. Beta-Katenin bindet direkt an FOXO4 und verstärkt dessen transkriptionelle Aktivität am *Superoxiddismutase-2 (SOD2)*-Genpromotor (Essers *et al.*, 2005). Das *SOD2*-Gen ist ein bekanntes, hoch konserviertes Zielgen der FOXO-Proteinfamilie, das durch FOXO-Proteine aktiviert wird (Kops *et al.*, 2002; Kuiperij *et al.*, 2005; Essers *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006; Adachi *et al.*, 2007).

Obwohl über die Art der FOXO4-ATXN3-Interaktion bislang noch keine Aussage gemacht werden kann und die Aktivität eines Promotors durch *cis*- und *trans*-Elemente sehr komplex reguliert wird, zeigen die Reporteranalysen, dass ATXN3 die FOXO4-abhängige *SOD2*-Expression aktivieren kann. Diese aktivierende Funktion von ATXN3 geht durch die PolyQ-Expansion verloren und könnte mit einer verringerten *SOD2*-Expression bei der SCA3 verbunden sein.

5.4. ATXN3 als Regulator der *SOD2*-Expression

In Übereinstimmung mit einer durch mutantes ATXN3 hervorgerufenen, veränderten *SOD2*-Genexpression konnte in humanem *Pons* und LCL-Zelllinien eine signifikant reduzierte Expression der endogenen *SOD2*-mRNA und des Proteins bei SCA3-Patienten festgestellt werden (s. 4.2.2; 4.2.4). Ferner konnte die Depletion von endogenem ATXN3 durch RNA-Interferenz und die gleichzeitige Verringerung der *SOD2*-Proteinexpression eindeutig zeigen, dass ATXN3 ein wichtiger Regulator der *SOD2*-Expression ist (s. 4.2.5). Der Nachweis von ATXN3 durch Chromatin-Immunpräzipitationen (s. 4.2.6) in der Region des *SOD2*-Promotors, die auch die FOXO-Bindungsstelle enthält, erhärtet weiter die Annahme, dass ATXN3 an der Regulation des *SOD2*-Gens beteiligt ist. Dabei könnte die verringerte Bindung von ATXN3 am *SOD2*-Promotor bei SCA3-LCLs darauf hinweisen, dass die verringerte *SOD2*-Transkription durch einen Gendosiseffekt aufgrund nur eines intakten ATXN3-Allels oder einen dominant negativen Effekt des mutanten ATXN3 hervorgerufen wird. Die reduzierte Komplexbildung mit nukleären Extrakten von CSM-Q70 bei der EMSA-Analyse würde dann mit den Ergebnissen der CHIP-Experimente übereinstimmen. Eine genaue Aussage über die Bindungsunterschiede von ATXN3Q23 und ATXN3Q70 am *SOD2*-Promotor kann daraus jedoch nicht abgeleitet werden, da bei den ATXN3-spezifischen Immunpräzipitationen nicht zwischen den verschiedenen ATXN3-Isoformen bei den CSM14.1- oder den LCL-Zelllinien unterschieden werden konnte. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass beispielsweise nur normales ATXN3 am *SOD2*-Promotor bindet und die verringerte *SOD2*-Expression bei den SCA3-LCL-Zelllinien durch das Immobilisieren von normalem ATXN3 in nukleäre Aggregate entsteht. Eine Verringerung der FOXO4-Spiegel durch Rekrutierung in nukleäre Inklusionen, die von mutantern ATXN3 gebildet werden, kann andererseits ausgeschlossen werden, da FOXO4 nicht in den NI von humanen SCA3-Ponsschnitten nachgewiesen werden konnte (s. 4.1.3.2).

Eine andere Möglichkeit ist, dass die Interaktion mit mutantern ATXN3 die DNA-bindende FOX-Domäne maskiert und so die Bindung von FOXO4 an das FOXO-Konsensusmotiv im *SOD2*-Promotor verhindert. Auf diese Weise interagiert z. B. das

14-3-3 Protein mit FOXO4. Es bindet und maskiert direkt die N-terminale DNA-Bindungsdomäne und verhindert die transkriptionelle Aktivität von FOXO4 (Silhan *et al.*, 2009). Denkbar wäre außerdem, dass mutantes ATXN3 den Aufbau von FOXO4-enthaltenden Transkriptionskomplexen am Zielgenpromotor unterdrückt und dadurch die *SOD2*-Gentranskription verringert.

FOXO-Transkriptionsfaktoren binden an ein inverses FOXO-Bindungselement im *SOD2*-Promotor und erhöhen die *SOD2*-Expression. Interessanterweise enthält diese Region auch einige potenzielle ATXN3-Bindungsmotive, von denen eine direkt neben der distalen FOXO-Bindungsstelle liegt (Evert *et al.*, 2006). Daher ist es möglich, dass ATXN3 neben FOXO4 selbst als Transkriptionsfaktor an ein Konsensusmotiv bindet und die FOXO-abhängige *SOD2*-Genexpression reguliert.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass normales ATXN3 durch die Bildung von histondeazetylierenden Repressorkomplexen als transkriptioneller Korepressor des *MMP2*-Gens fungiert (Evert *et al.*, 2006). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde hingegen herausgefunden, dass ATXN3 die *SOD2*-Gentranskription aktivieren kann. Demnach könnte ATXN3 genauso wie FOXO4 abhängig vom Genpromotor als Repressor und Aktivator funktionieren (Schmidt *et al.*, 2002; Kops *et al.*, 2002). Die transkriptionelle Aktivierung oder Hemmung eines Gens ist vom Promotorkontext und Signalweg abhängig (Lemon & Tjian, 2000). Ein Beispiel dafür ist der Transkriptionsfaktor Sp3. Sp3 aktiviert die Transkription, wenn er über ein einzelnes Konsensusmotiv an einen Promotor bindet und zusammen mit TBP den Aufbau von Transkriptionskomplexen initiiert. Sp3 wirkt aber auch hemmend, wenn es an mehreren Konsensusmotiven bindet und mit Korepressoren wie HDAC2 interagiert (Majello *et al.*, 1997; Itoh *et al.*, 2007).

5.5. Oxidativer Stress induziert die *SOD2*-Transkription über FOXO4 und ATXN3

Als oxidativen Stress bezeichnet man einen Zustand, bei dem die Zelle eine über das physiologische Maß hinausgehende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen (ROS) bildet. Diese ROS entstehen hauptsächlich bei Stoffwechselfvorgängen der mitochondrialen Atmungskette (Turrens *et al.*, 2003). Oxidativer Stress induziert die Translokation von FOXO4 und ATXN3 in den Kern (Brenkman *et al.*, 2008; Reina *et al.*, 2009). Die subzelluläre Fraktionierung H₂O₂-behandelter HeLa-Zellen bestätigte die nukleäre Translokation beider Proteine und ging mit einer gleichzeitigen Erhöhung der SOD2-Proteinexpression einher. In SCA3-LCL-Zelllinien hingegen konnte durch die H₂O₂-Behandlung kein Anschalten der *SOD2*-Genexpression erreicht werden, während die Kontroll-LCL-Zelllinien die *SOD2*-Genexpression auf den oxidativen Stimulus signifikant aufregulierten. Die Aktivierung der *SOD2* bei oxidativem Stress durch die FOXO-Proteinfamilie ist ein bekannter, konservierter und protektiver Mechanismus. Sowohl in Säugerzellen als auch in *C. elegans* wird FOXO4 bzw. DAF-16 durch oxidativen Stress aktiviert, in den Kern transloziert und die Expression des *SOD2*- bzw. das *C. elegans* Homolog *SOD3*-Gens induziert (Esser *et al.*, 2004). Auch transgene FOXO-Mäuse, die konstitutiv aktives FOXO4 exprimieren, weisen eine verstärkte Expression der *SOD2* auf (Wang *et al.*, 2009). In SCA3-LCL-Zelllinien scheint dieser antioxidative Mechanismus über FOXO4 gestört zu sein. Die endogenen *SOD2*-Level sind verringert, die zellulären ROS-Level erhöht und bei oxidativem Stress wird die *SOD2*-Expression nicht aufreguliert. Dieser Verlust steht höchstwahrscheinlich mit dem signifikant schnelleren Sterben der SCA3-LCL-Zelllinien in Zusammenhang, da verringerte *SOD2*-Level mit erhöhten ROS-Level einhergehen (Sasabe *et al.*, 2010). Außerdem zeigen transgene Fliegen mit reduzierter *SOD2*-Expression eine frühzeitige Neurodegeneration und verkürzte Lebensdauer (Paul *et al.*, 2007). Die Überexpression des *SOD2*-Gens bewirkt zwar keine Verlängerung der Lebenszeit bei transgenen Mäusen, jedoch sind die Tiere besser vor oxidativem Stress geschützt (Jang *et al.*, 2009). Normales ATXN3 könnte demnach ähnlich wie Beta-Katenin ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Stresssignalweges sein, der für die protektive Zellantwort bei oxidativem Stress

benötigt wird. Sowohl ATXN3 als auch Beta-Katenin interagieren mit FOXO4 und erhöhen auf oxidativen Stress die *SOD2*-Expression (Essers *et al.*, 2005). Diese zytoprotektive Funktion scheint durch expandiertes ATXN3 beeinträchtigt zu sein. Die verringerte endogene *SOD2*-Expression und die erhöhten zellulären ROS-Level in SCA3-LCL-Zelllinien könnten aber auch für eine durch das expandierte ATXN3 induzierte Proteotoxizität bei der SCA3 sprechen. So wurde in Modellsystemen der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS), eine degenerative Erkrankung des motorischen Nervensystems, gezeigt, dass proteotoxischer Stress, der durch die Expression mutanter humaner Proteine induziert wird, in Neuronen zur Verringerung der *SOD2*-Expression führt (Mojsilovic-Petrovic *et al.*, 2009). Die verringerte *SOD2*-Expression in SCA3-LCL-Zelllinien könnte daher auch durch einen vom expandierten ATXN3 hervorgerufenen proteotoxischen Stress verursacht werden. Dennoch ist es wahrscheinlicher, dass bei der SCA3 ein Gendosiseffekt aufgrund nur eines vorhandenen normalen *ATXN3*-Allels und /oder ein dominant negativer Effekt des expandierten *ATXN3* zu einer verringerten *SOD2*-Expression führt. Obwohl die pathophysiologischen Prozesse noch nicht geklärt sind, könnte durch die verringerte *SOD2*-Expression eine erhöhte Vulnerabilität gegenüber oxidativem Stress hervorgerufen werden, die zum neuronalen Zelltod bei der SCA3 beiträgt.

5.6. Modell der ATXN3-aktivierten, FOXO4-abhängigen *SOD2*-Gentranskription

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich in einem vorläufigen Modell zur transkriptionellen Regulation des *SOD2*-Gens über FOXO4 und ATXN3 zusammenfassen. Dieses Modell zeigt vereinfacht wie die oxidative Stressantwort die Transkription des FOXO4-regulierten *SOD2*-Gens über ATXN3 regulieren und wie diese zu einer veränderten Transkription bei der SCA3 führen könnte (s. Abbildung 5.1). Während FOXO4 die *SOD2*-Expression unter normalen Bedingungen durch die Bindung an das FOXO-DNA-Bindungselement aktiviert (s. Abbildung 5.1A), wird die *SOD2*-Gentranskription bei oxidativem Stress durch die zusätzliche Bindung von normalen ATXN3 an den *SOD2*-Promotor verstärkt. Dabei stellt die in der Abbildung skizzierte,

gemeinsame Bindung von FOXO4 und ATXN3 am *SOD2*-Genpromotor eine mögliche Variante dar. Es könnte jedoch auch sein, dass ATXN3 nicht direkt, sondern über FOXO4 an den Promotor bindet, da der in der CHIP-Analyse untersuchte Promotorbereich das FOXO-DNA-Bindungsselement enthält und die Chromatinbindung von ATXN3 somit auch über die FOXO4-Interaktion zustande kommen könnte.

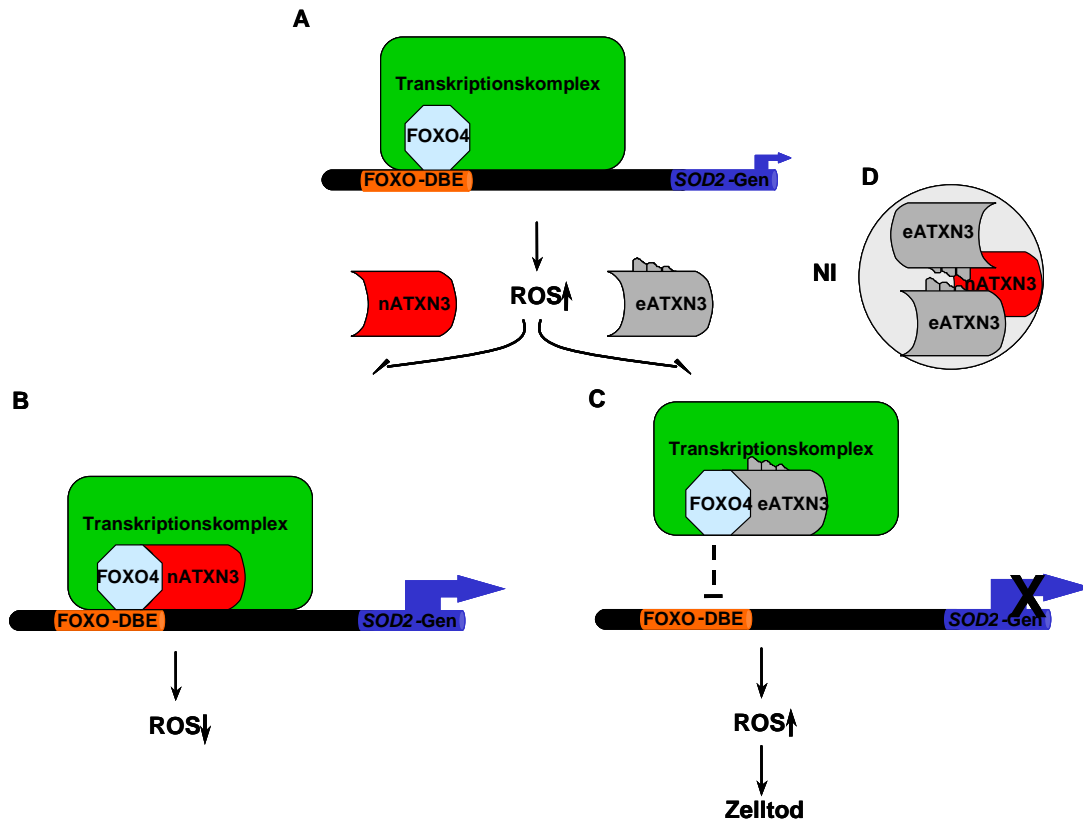


Abbildung 5.1: Modell der ATXN3-aktivierten Stressantwort des FOXO4-abhängigen *SOD2*-Genpromotors. **A.** FOXO4 aktiviert durch Bindung an das FOXO-DBE die *SOD2*-Genexpression. **B.** Bei oxidativem Stress erhöhen sich die endogenen ROS-Level der Zelle. Normales ATXN3 (nATXN3) bindet FOXO4 sowie den *SOD2*-Genpromotor, wodurch die *SOD2*-Expression verstärkt wird und die endogenen ROS-Level abgebaut werden. **C.** Der oxidative Stressestimulus führt bei expandiertem ATXN3 (eATXN3) zu keiner Verstärkung der *SOD2*-Expression. Obwohl eine Interaktion zwischen FOXO4 und eATXN3 zustande kommt, können weniger transkriptionskompetente Komplexe am *SOD2*-Promotor gebildet werden. Die erhöhten ROS-Level in der Zelle können zum Zelltod führen. **D.** eATXN3 aggregiert mit nATXN3 in nukleären Inklusionen (NI) und verhindert auf diese Weise die Bindung von nATXN3 an den *SOD2*-Promotor. FOXO-DBE – FOXO-DNA-Bindungsselement; ROS – reaktive Sauerstoffverbindungen.

Expandiertes ATXN3 interagiert mit aktivem FOXO4 im Kern (s. 4.1.4; 4.1.5; 4.1.6; 4.1.7) und verhindert die Bindung von FOXO4 an den *SOD2*-Promotor. Somit verringert sich einerseits die endogene *SOD2*-Expression und andererseits wird das *SOD2*-Gen bei oxidativem Stress nicht aufreguliert. Sowohl die EMSA- als auch die ChIP-Analysen (s. 4.2.6) zeigten, dass expandiertes ATXN3 mit einer veränderten DNA-Bindung des FOXO-Konsensusmotivs und *SOD2*-Genpromotors einhergeht. Ob dabei expandiertes ATXN3 die Bindung der Transkriptionskomplexe an den Promotor durch Maskierung der FOX-Domäne verhindert, oder die Bildung der Transkriptionskomplexe destabilisiert und dadurch die *SOD2*-Aktivierung unterdrückt wird, ist noch nicht geklärt. Die Tatsache, dass expandiertes ATXN3 normales ATXN3 in nukleäre Inklusionen rekrutiert (s. Abbildung 5.1D) und die verfügbare Menge normalen ATXN3 dadurch reduziert, könnte auf einen dominant negativen Effekt und/ oder einen Gendosiseffekt als Ursache der transkriptionellen Dysregulation vom *SOD2*-Gen hinweisen.

5.7. FOXO-Transkriptionsfaktoren und oxidativer Stress bei neurodegenerativen Krankheiten

Da das Gehirn das Organ mit dem höchsten Sauerstoffverbrauch ist, wurde oxidativer Stress als schädigender Prozess bei neurodegenerativen Erkrankungen schon früh postuliert und als mögliche Ursache bei der Alzheimer-Demenz, dem Parkinson-Syndrom und der Amyotrophen Lateralsklerose diskutiert (Barnham *et al.*, 2004). Bei den PolyQ-Krankheiten konnte dieser Zusammenhang bisher nur für die SCA1 untermauert werden. Oxidativer Stress führt bei mutantern ATXN1 exprimierenden Zellen zu einer erhöhten, nukleären Aggregatbildung und früherem Zelltod (Kim *et al.*, 2003; Ryu *et al.*, 2010). In SBMA-Modellen wurde gezeigt, dass die erhöhten ROS-Level mit der verringerten *SOD2*-Expression korrelieren (Ranganathan *et al.*, 2008). Die in dieser Arbeit aufgezeigte Verbindung zwischen der ATXN3-verstärkten, FOXO4-abhängigen *SOD2*-Genexpression und der verringerten *SOD2*-Genexpression durch expandiertes ATXN3 weisen erstmalig darauf hin, dass oxidativer Stress eine wichtige Komponente bei der SCA3-Pathogenese darstellt. FOXO-Transkriptionsfaktoren werden als mögliche, relevante Faktoren des Alterungsprozesses eingestuft; so führt die

Aktivierung des *C. elegans* Homologs der humanen FOXO-Proteine, DAF-16, zu einer Lebensverlängerung in *C. elegans* (Maiese *et al.*, 2008). Ferner häufen sich die Hinweise, dass FOXO-Transkriptionsfaktoren eine wichtige protektive Rolle bei neurodegenerativen Prozessen spielen. So wurde z. B. eine erhöhte Kollokalisierung von FOXO3a bei Lewy-Körperchen und -Neuriten von Lewy-Körper-Demenz- sowie Parkinson-Patienten gefunden und mit einer Beteiligung von FOXO3a bei der Aggregatbildung in Zusammenhang gebracht (Su *et al.*, 2009). In SBMA verhindert die Expression von nukleärem FOXO3a den neuronalen Zelltod, der durch den mutanten AR induziert wird (Mojsilovic-Petrovic *et al.*, 2009). In primären, neuronalen Zellen korreliert die durch Amyloid-Beta-induzierte Phosphorylierung und Inaktivierung von FOXO-Transkriptionsfaktoren mit der Amyloid-Beta-Toxizität (Smith *et al.*, 2005). Außerdem konnte eine neuroprotektive Rolle für DAF-16 gegenüber Amyloid-Beta vermittelter Toxizität gezeigt werden (Cohen *et al.*, 2006). Und schließlich korreliert die Verschlechterung des Phänotyps bei transgenen Amyloid-Beta-Mäusen mit einer verringerten *SOD2*-Expression (Esposito *et al.*, 2006). Der antioxidative Stresssignalweg über FOXO-Transkriptionsfaktoren und *SOD2* spielt daher offenbar bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen eine wichtige Rolle und konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal für die SCA3-Krankheit nachgewiesen werden.

5.8. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATXN3 eine wichtige Rolle als transkriptioneller Koregulator des *SOD2*-Gens bei der FOXO-abhängigen antioxidativen Stressantwort spielt. ATXN3 ist somit Bestandteil der antioxidativen Abwehr und schützt Zellen vor oxidativem Stress. Diese wichtige physiologische Funktion kann durch mutantes ATXN3 nicht aufrechterhalten werden und führt zu einer beeinträchtigten zellulären Stressantwort. Ein wichtiger Punkt in zukünftigen Studien wird sein, ob Strategien, die zu einer Erhöhung der antioxidativen Kapazität führen, für die Therapie der SCA3-Krankheit eingesetzt werden können. Hierfür eignen sich besonders neuronale SCA3-Zellmodelle, die aus Hautfibroblasten der SCA3-Patienten direkt gewonnen werden können. Die Reprogrammierung von Patienten-Zellen zu

pluripotenten Stammzellen erlaubt die Herstellung neuronal differenzierter Zellen, die zum einen den zellulären Krankheitsverlauf besser widerspiegeln und zum anderen für die Analyse therapeutisch wirksamer Substanzen eingesetzt werden können. So könnte eines Tages die Behandlung der SCA3 und anderer neurodegenerativer Erkrankungen möglich sein.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ataxin-3 (ATXN3), das Krankheitsprotein der spinocerebellären Ataxie Typ 3 (SCA3) ist funktionell an der zellulären Qualitätskontrolle von Proteinen und der transkriptionellen Regulation von verschiedenen Genen beteiligt. In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass ATXN3 mit dem Transkriptionsfaktor FOXO4 (Forkhead box O4) direkt interagiert und bei der zellulären, oxidativen Stressantwort die Transkription von FOXO4-abhängigen Zielgenen aktiviert. Bei oxidativem Stress translozieren FOXO4 und ATXN3 in den Zellkern und erhöhen die Transkription des antioxidativ wirkenden *Superoxiddismutase-2 (SOD2)*-Gens. Dabei bindet ATXN3 an eine spezifische Region im humanen *SOD2*-Genpromotor, die auch die konservierte DNA-Bindungsstelle von FOXO4 enthält. Die koaktivierende Funktion von ATXN3 konnte des weiteren dadurch unterstützt werden, dass eine spezifische Depletion von ATXN3 zu einer gleichzeitigen verringerten *SOD2*-Expression führt. Durch die Etablierung von stabilen lymphoblastoiden Zelllinien verschiedener SCA3-Patienten konnte gezeigt werden, dass gerade diese koaktivierende Funktion durch die CAG-Repeat-Verlängerung verloren geht. In den lymphoblastoiden Zelllinien von SCA3-Patienten fand sich eine signifikant verringerte *SOD2*-Expression, eine erhöhte Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen und eine signifikant verringerte Überlebensrate gegenüber oxidativem Stress. Dabei könnte die verringerte Bindung von ATXN3 am *SOD2*-Genpromotor, die bei den lymphoblastoiden SCA3-Zelllinien festgestellt wurde, die Ursache für die verringerte *SOD2*-Expression sein. Da die *SOD2* für die Beseitigung reaktiver Sauerstoffverbindungen notwendig ist, resultiert aus einer verringerten *SOD2*-Expression eine geringere zelluläre Kapazität oxidativen Stress zu kompensieren. Die verringerte antioxidative Kapazität könnte zum neuronalen Zelltod bei der SCA3 beitragen. Der identifizierte ATXN3-FOXO4-regulierte Signalweg könnte zukünftig für die Entwicklung antioxidativer Strategien zur Therapie der SCA3 hilfreich sein.

7. REFERENZEN

7.1. Literatur

Adachi M, Osawa Y, Uchinami H, Kitamura T, Accili D, Brenner DA (2007). The forkhead transcription factor FoxO1 regulates proliferation and transdifferentiation of hepatic stellate cells. *Gastroenterology*. 132(4):1434-46.

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.

Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC (1998). Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics*. 47(2):187-99.

Antony PM, Mäntele S, Mollenkopf P, Boy J, Kehlenbach RH, Riess O, Schmidt T (2009). Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis*. 36(2):280-92.

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.

Babu MM, Luscombe NM, Aravind L, Gerstein M, Teichmann SA (2004). Structure and evolution of transcriptional regulatory networks. *Curr Opin Struct Biol*. 14(3):283-91. Review.

Barnham KJ, Masters CL, Bush AI (2004). Neurodegenerative diseases and oxidative stress. *Nat Rev Drug Discov*. 3(3):205-14.

Bauer PO, Nukina N (2009). The pathogenic mechanisms of polyglutamine diseases and current therapeutic strategies. *J Neurochem*. 110(6):1737-65. Review.

Becher MW, Ross CA (1998). Intranuclear neuronal inclusions in DRPLA. *Mov Disord*. 13(5):852-3.

-
- Bettencourt C, Santos C, Montiel R, Costa MD, Cruz-Morales P, Santos LR, Simões N, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P, Lima M** (2010). Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph Disease gene (ATXN3). *Neurogenetics*. 11(2):193-202.
- 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.
- Biggs WH 3rd, Meisenhelder J, Hunter T, Cavenee WK, Arden KC** (1999). Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(13):7421-6.
- Biggs WH 3rd, Cavenee WK, Arden KC** (2001). Identification and characterization of members of the FKHR (FOX O) subclass of winged-helix transcription factors in the mouse. *Mamm Genome*. 12(6):416-25.
- Boeddrich A, Gaumer S, Haacke A, Tzvetkov N, Albrecht M, Evert BO, Müller EC, Lurz R, Breuer P, Schugardt N, Plassmann S, Xu K, Warrick JM, Suopanki J, Wüllner U, Frank R, Hartl UF, Bonini NM, Wanker EE** (2006). An arginine/lysine-rich motif is crucial for VCP/p97-mediated modulation of ataxin-3 fibrillogenesis. *EMBO J*. 25(7):1547-58.
- Borkhardt A, Repp R, Haas OA, Leis T, Harbott J, Kreuder J, Hammermann J, Henn T, Lampert F** (1997). Cloning and characterization of AFX, the gene that fuses to MLL in acute leukemias with a t(X;11)(q13;q23). *Oncogene*. 14(2):195-202.
- Boura E, Silhan J, Herman P, Vecer J, Sulc M, Teisinger J, Obsilova V, Obsil T** (2007). Both the N-terminal loop and wing W2 of the forkhead domain of transcription factor Foxo4 are important for DNA binding. *J Biol Chem*. 282(11):8265-75.
- Boy J, Schmidt T, Schumann U, Grasshoff U, Unser S, Holzmann C, Schmitt I, Karl T, Laccone F, Wolburg H, Ibrahim S, Riess O** (2010). A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 resembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis*. 37(2):284-93.
- Bradford MM** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*.
- Brenkman AB, de Keizer PL, van den Broek NJ, Jochemsen AG, Burgering BM** (2008). Mdm2 induces mono-ubiquitination of FOXO4. *PLoS One*. 3(7):e2819.

-
- Brunet A, Bonni A, Zigmund MJ, Lin MZ, Joo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME** (1999). Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96(6):857-68.
- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB** (2002). 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J Cell Biol*. 156(5):817-28.
- Burnett BG, 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 B, Pittman RN** (2005). The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(12):4330-5.
- Calnan DR, Brunet A** (2008). The FoxO code. *Oncogene*. 27(16):2276-88.
- Carter ME, Brunet A** (2007). FOXO transcription factors. *Curr Biol*. 17(4):R113-4.
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU, Speck-Martins CE** (2008). Homozygosity enhances severity in spinocerebellar ataxia type 3. *Pediatr Neurol*. 38(4):296-9.
- Cemal CK, Carroll CJ, Lawrence L, Lowrie MB, Ruddle P, Al-Mahdawi S, King RH, Pook MA, Huxley C, Chamberlain S** (2002). YAC transgenic mice carrying pathological alleles of the MJD1 locus exhibit a mild and slowly progressive cerebellar deficit. *Hum Mol Genet*. 11(9):1075-94.
- Chai Y, Wu L, Griffin JD, Paulson HL** (2001). The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem*. 276(48):44889-97.
- 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 U S A*. 99(14):9310-5.
- 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.
- Cohen E, Bieschke J, Perciavalle RM, Kelly JW, Dillin A** (2006). Opposing activities protect against age-onset proteotoxicity. *Science*. 313(5793):1604-10.

-
- Dai RM, Li CC** (2001). Valosin-containing protein is a multi-ubiquitin chain-targeting factor required in ubiquitin-proteasome degradation. *Nat Cell Biol.* 3(8):740-4.
- D'Alessio JA, Wright KJ, Tjian R** (2009). Shifting players and paradigms in cell-specific transcription. *Mol Cell.* 36(6):924-31.
- Davies SW, Turmaine M, Cozens BA, DiFiglia M, Sharp AH, Ross CA, Scherzinger E, Wanker EE, Mangiarini L, Bates GP** (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell.* 90(3):537-48.
- Davis RJ, D'Cruz CM, Lovell MA, Biegel JA, Barr FG** (1994). Fusion of PAX7 to FKHR by the variant t(1;13)(p36;q14) translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 54(11):2869-72.
- 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.
- Doi H, Okamura K, Bauer PO, Furukawa Y, Shimizu H, Kurosawa M, Machida Y, Miyazaki H, Mitsui K, Kuroiwa Y, Nukina N** (2008). RNA-binding protein TLS is a major nuclear aggregate-interacting protein in huntingtin exon 1 with expanded polyglutamine-expressing cells. *J Biol Chem.* 283(10):6489-500.
- 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 U S A.* 100(15):8892-7.
- 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.
- Dragatsis I, Levine MS, Zeitlin S** (2000). Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat Genet.* 26(3):300-6.
- Dueñas AM, Goold R, Giunti P** (2006). Molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxias. *Brain.* 129(Pt 6):1357-70.
- Essers MA, Weijzen S, de Vries-Smits AM, Saarloos I, de Ruiter ND, Bos JL, Burgering BM** (2004). FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK. *EMBO J.* 23(24):4802-12.

-
- Essers MA, de Vries-Smits LM, Barker N, Polderman PE, Burgering BM, Korswagen HC** (2005). Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling. *Science*. 308(5725):1181-4.
- Esposito L, Raber J, Kekonius L, Yan F, Yu GQ, Bien-Ly N, Puoliväli J, Scearce-Levie K, Masliah E, Mucke L** (2006). Reduction in mitochondrial superoxide dismutase modulates Alzheimer's disease-like pathology and accelerates the onset of behavioral changes in human amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci*. 26(19):5167-79.
- Evert BO, Wüllner U, Schulz JB, Weller M, Groscurth P, Trottier Y, Brice A, Klockgether T** (1999). High level expression of expanded full-length ataxin-3 in vitro causes cell death and formation of intranuclear inclusions in neuronal cells. *Hum Mol Genet*. 8(7):1169-76.
- 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, Vogt IR, Vieira-Saecker AM, Ozimek L, de Vos RA, Brunt ER, Klockgether T, Wüllner U** (2003). Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol*. 62(10):1006-18.
- 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 3beta at serine 256 regulates the aggregation of ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun*. 357(2):487-92.
- Freiman RN, Tjian R** (2002). Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science*. 296(5576):2149-50.
- Furuyama T, Nakazawa T, Nakano I, Mori N** (2000). Identification of the differential distribution patterns of mRNAs and consensus binding sequences for mouse DAF-16 homologues. *Biochem J*. 349(Pt 2):629-34.

-
- Galili N, Davis RJ, Fredericks WJ, Mukhopadhyay S, Rauscher FJ 3rd, Emanuel BS, Rovera G, Barr FG** (1993). Fusion of a fork head domain gene to PAX3 in the solid tumour alveolar rhabdomyosarcoma. *Nat Genet.* 5(3):230-5.
- Goto J, Watanabe M, Ichikawa Y, Yee SB, Ihara N, Endo K, Igarashi S, Takiyama Y, Gaspar C, Maciel P, Tsuji S, Rouleau GA, Kanazawa I** (1997). Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res.* 28(4):373-7.
- 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.
- Hartkamp J, Roberts SG** (2008). The role of the Wilms' tumour-suppressor protein WT1 in apoptosis. *Biochem Soc Trans.* 36(Pt 4):629-31.
- Helmlinger D, Tora L, Devys D** (2006). Transcriptional alterations and chromatin remodeling in polyglutamine diseases. *Trends Genet.* 22(10):562-70. Review.
- Hillion J, Le Coniat M, Jonveaux P, Berger R, Bernard OA** (1997). AF6q21, a novel partner of the MLL gene in t(6;11)(q21;q23), defines a forkhead transcriptional factor subfamily. *Blood.* 90(9):3714-9.
- Ho SR, Wang K, Whisenhunt TR, Huang P, Zhu X, Kudlow JE, Paterson AJ** (2010). O-GlcNAcylation enhances FOXO4 transcriptional regulation in response to stress. *FEBS Lett.* 584(1):49-54.
- Horike S, Cai S, Miyano M, Cheng JF, Kohwi-Shigematsu T** (2005). Loss of silent-chromatin looping and impaired imprinting of DLX5 in Rett syndrome. *Nat Genet.* 37(1):31-40.
- Huang H, Regan KM, Wang F, Wang D, Smith DI, van Deursen JM, Tindall DJ** (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(5):1649-54.
- Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Rouleau GA, Sakaki Y, Kanazawa I** (2001). The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet.* 46(7):413-22.

-
- Itoh Y, Hayashi H, Miyazawa K, Kojima S, Akahoshi T, Onozaki K** (2007). 17beta-estradiol induces IL-1alpha gene expression in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through estrogen receptor alpha (ERalpha) and augmentation of transcriptional activity of Sp1 by dissociating histone deacetylase 2 from ERalpha. *J Immunol.* 178(5):3059-66.
- Iwamoto K, Bundo M, Washizuka S, Kakiuchi C, Kato T** (2004). Expression of HSPF1 and LIM in the lymphoblastoid cells derived from patients with bipolar disorder and schizophrenia. *J Hum Genet.* 49(5):227-31.
- Jang YC, Pérez VI, Song W, Lustgarten MS, Salmon AB, Mele J, Qi W, Liu Y, Liang H, Chaudhuri A, Ikeno Y, Epstein CJ, Van Remmen H, Richardson A** (2009). Overexpression of Mn superoxide dismutase does not increase life span in mice. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 64(11):1114-25.
- Jung J, Bonini N** (2007). CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science.* 315(5820):1857-9.
- Kaestner KH, Knochel W, Martinez DE** (2000). Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev.* 14(2):142-6.
- Katsuno M, Adachi H, Kume A, Li M, Nakagomi Y, Niwa H, Sang C, Kobayashi Y, Doyu M, Sobue G** (2002). Testosterone reduction prevents phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Neuron.* 35(5):843-54.
- 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. *Nat Genet.* 8(3):221-8.
- Kim SJ, Kim TS, Hong S, Rhim H, Kim IY, Kang S** (2003). Oxidative stimuli affect polyglutamine aggregation and cell death in human mutant ataxin-1-expressing cells. *Neurosci Lett.* 348(1):21-4.
- 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(1):41-53.
- Kobayashi T, Tanaka K, Inoue K, Kakizuka A** (2002). Functional ATPase activity of p97/valosin-containing protein (VCP) is required for the quality control of endoplasmic reticulum in neuronally differentiated mammalian PC12 cells. *J Biol Chem.* 277(49):47358-65.

-
- Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM** (1999). Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature*. 398(6728):630-4.
- Kops GJ, Dansen TB, Polderman PE, Saarloos I, Wirtz KW, Coffey PJ, Huang TT, Bos JL, Medema RH, Burgering BM** (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*. 419(6904):316-21.
- Kovtun IV, McMurray CT** (2001). Trinucleotide expansion in haploid germ cells by gap repair. *Nat Genet*. 27(4):407-11.
- Koyano S, Iwabuchi K, Yagishita S, Kuroiwa Y, Uchihara T** (2002). Paradoxical absence of nuclear inclusion in cerebellar Purkinje cells of hereditary ataxias linked to CAG expansion. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 73(4):450-2.
- Kuiperij HB, van der Horst A, Raaijmakers J, Weijzen S, Medema RH, Bos JL, Burgering BM, Zwartkruis FJ** (2005). Activation of FoxO transcription factors contributes to the antiproliferative effect of cAMP. *Oncogene*. 24(12):2087-95.
- La Spada AR, Fu YH, Sopher BL, Libby RT, Wang X, Li LY, Einum DD, Huang J, Possin DE, Smith AC, Martinez RA, Koszdin KL, Treuting PM, Ware CB, Hurley JB, Ptáček LJ, Chen S** (2001). Polyglutamine-expanded ataxin-7 antagonizes CRX function and induces cone-rod dystrophy in a mouse model of SCA7. *Neuron*. 31(6):913-27.
- 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(47):45004-12.
- Li M, Chiu JF, Mossman BT, Fukagawa NK** (2006). Down-regulation of manganese-superoxide dismutase through phosphorylation of FOXO3a by Akt in explanted vascular smooth muscle cells from old rats. *J Biol Chem*. 281(52):40429-39.
- Limprasert P, Nouri N, Heyman RA, Nopparatana C, Kamonsilp M, Deininger PL, Keats BJ** (1996). Analysis of CAG repeat of the Machado-Joseph gene in human, chimpanzee and monkey populations: a variant nucleotide is associated with the number of CAG repeats. *Hum Mol Genet*. 5(2):207-13.
- Lin K, Dorman JB, Rodan A, Kenyon C** (1997). daf-16: An HNF-3/forkhead family member that can function to double the life-span of *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 278(5341):1319-22.

-
- Lunkes A, Mandel JL** (1998). A cellular model that recapitulates major pathogenic steps of Huntington's disease. *Hum Mol Genet.* 7(9):1355-61.
- Macedo-Ribeiro S, Cortes L, Maciel P, Carvalho AL** (2009). Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS One.* 4(6):e5834.
- Maiese K, Chong ZZ, Shang YC** (2008). OutFOXing disease and disability: the therapeutic potential of targeting FoxO proteins. *Trends Mol Med.* 14(5):219-27. Review.
- Majello B, De Luca P, Lania L** (1997). Sp3 is a bifunctional transcription regulator with modular independent activation and repression domains. *J Biol Chem.* 272(7):4021-6.
- Mantamadiotis T, Lemberger T, Bleckmann SC, Kern H, Kretz O, Martin Villalba A, Tronche F, Kellendonk C, Gau D, Kapfhammer J, Otto C, Schmid W, Schütz G** (2002). Disruption of CREB function in brain leads to neurodegeneration. *Nat Genet.* 31(1):47-54.
- 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.
- Masino L, Musi V, Menon RP, Fusi P, Kelly G, Frenkiel TA, Trottier Y, Pastore A** (2003). Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett.* 549(1-3):21-5.
- Masino L, Nicastro G, Menon RP, Dal Piaz F, Calder L, Pastore A** (2004). Characterization of the structure and the amyloidogenic properties of the Josephin domain of the polyglutamine-containing protein ataxin-3. *J Mol Biol.* 344(4):1021-35.
- 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.
- Mitsui K, Nakayama H, Akagi T, Nekooki M, Ohtawa K, Takio K, Hashikawa T, Nukina N** (2002). Purification of polyglutamine aggregates and identification of elongation factor-1alpha and heat shock protein 84 as aggregate-interacting proteins. *J Neurosci.* 22(21):9267-77.

-
- Mojsilovic-Petrovic J, Nedelsky N, Boccitto M, Mano I, Georgiades SN, Zhou W, Liu Y, Neve RL, Taylor JP, Driscoll M, Clardy J, Merry D, Kalb RG (2009).** FOXO3a is broadly neuroprotective in vitro and in vivo against insults implicated in motor neuron diseases. *J Neurosci.* 29(25):8236-47.
- Mueller T, Breuer P, Schmitt I, Walter J, Evert BO, Wüllner U (2009).** CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum Mol Genet.* 18(17):3334-43.
- Nakano KK, Dawson DM, Spence A (1972).** Machado disease. A hereditary ataxia in Portuguese emigrants to Massachusetts. *Neurology.* 22(1):49-55.
- Neitzel H (1986).** A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. *Hum Genet.* 73(4):320-6.
- Nemoto S, Finkel T (2002).** Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science.* 295(5564):2450-2.
- 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 U S A.* 102(30):10493-8.
- Nicastro G, Masino L, Esposito V, Menon RP, De Simone A, Fraternali F, Pastore A (2009).** Josephin domain of ataxin-3 contains two distinct ubiquitin-binding sites. *Biopolymers.* 91(12):1203-14.
- Nishimura Y, Martin CL, Vazquez-Lopez A, Spence SJ, Alvarez-Retuerto AI, Sigman M, Steindler C, Pellegrini S, Schanen NC, Warren ST, Geschwind DH (2007).** Genome-wide expression profiling of lymphoblastoid cell lines distinguishes different forms of autism and reveals shared pathways. *Hum Mol Genet.* 16(14):1682-98.
- Nucifora FC Jr, Sasaki M, Peters MF, Huang H, Cooper JK, Yamada M, Takahashi H, Tsuji S, Troncoso J, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2001).** Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science.* 291(5512):2423-8.
- Ogg S, Paradis S, Gottlieb S, Patterson GI, Lee L, Tissenbaum HA, Ruvkun G (1997).** The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*. *Nature.* 389(6654):994-9.

-
- Palmer ML, Lee SY, Carlson D, Fahrenkrug S, O'Grady SM** (2006) Stable knockdown of CFTR establishes a role for the channel in P2Y receptor-stimulated anion secretion. *J Cell Physiol.* 206(3):759-70.
- Palhan VB, Chen S, Peng GH, Tjernberg A, Gamper AM, Fan Y, Chait BT, La Spada AR, Roeder RG** (2005). Polyglutamine-expanded ataxin-7 inhibits STAGA histone acetyltransferase activity to produce retinal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(24):8472-7.
- Parry P, Wei Y, Evans G** (1994). Cloning and characterization of the t(X;11) breakpoint from a leukemic cell line identify a new member of the forkhead gene family. *Genes Chromosomes Cancer.* 11(2):79-84.
- Paul A, Belton A, Nag S, Martin I, Grotewiel MS, Duttaroy A** (2007). Reduced mitochondrial SOD displays mortality characteristics reminiscent of natural aging. *Mech Ageing Dev.* 128(11-12):706-16.
- Paulson HL, Perez MK, Trotter Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH, Pittman RN** (1997a). Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron.* 19(2):333-44.
- 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.
- Paulson HL** (2007). Dominantly inherited ataxias: lessons learned from Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Semin Neurol.* 27(2):133-42.
- 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.
- 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 U S A.* 91(12):5355-8.
- Perutz MF** (1996). Glutamine repeats and inherited neurodegenerative diseases: molecular aspects. *Curr Opin Struct Biol.* 6(6):848-58. Review.
- Poirier MA, Jiang H, Ross CA** (2005). A structure-based analysis of huntingtin mutant polyglutamine aggregation and toxicity: evidence for a compact beta-sheet structure. *Hum Mol Genet.* 14(6):765-74.

-
- Ranganathan S, Harmison GG, Meyertholen K, Pennuto M, Burnett BG, Fischbeck KH** (2009). Mitochondrial abnormalities in spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 18(1):27-42.
- Reddy PH, Williams M, Charles V, Garrett L, Pike-Buchanan L, Whetsell WO Jr, Miller G, Tagle DA** (1998). Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet.* 20(2):198-202.
- Reina CP, Zhong X, Pittman RN** (2010). Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet.* 19(2):235-49.
- Riess O, Rüb U, Pastore A, Bauer P, Schöls L** (2008). SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum.* 7(2):125-37.
- Riley BE, Orr HT** (2006). Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev.* 20(16):2183-92. Review.
- Rosenberg RN, Nyhan WL, Bay C** (1976). Autosomal dominant striatonigral degeneration: a clinical, pathological, and biochemical study of a new genetic disorder. *Trans Am Neurol Assoc.* 101:78-80.
- Ryu KS, Lee KJ, Bae SH, Kim BK, Kim KA, Choi BS** (2003). Binding surface mapping of intra- and interdomain interactions among hHR23B, ubiquitin, and polyubiquitin binding site 2 of S5a. *J Biol Chem.* 278(38):36621-7.
- Ryu J, Cho S, Park BC, Lee do H** (2010). Oxidative stress-enhanced SUMOylation and aggregation of ataxin-1: Implication of JNK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 393(2):280-5.
- Sasabe E, Yang Z, Ohno S, Yamamoto T** (2010). Reactive oxygen species produced by the knockdown of manganese-superoxide dismutase up-regulate hypoxia-inducible factor-1alpha expression in oral squamous cell carcinoma cells. *Free Radic Biol Med.* 48(10):1321-9.
- 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.
- Schmidt M, Fernandez de Mattos S, van der Horst A, Klompaker R, Kops GJ, Lam EW, Burgering BM, Medema RH (2002).** Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol Cell Biol*. 22(22):7842-52.
- Schmitt I, Linden M, Khazneh H, Evert BO, Breuer P, Klockgether T, Wuellner U (2007).** Inactivation of the mouse *Atxn3* (ataxin-3) gene increases protein ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*. 362(3):734-9.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T, Riess O (2004).** Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol*. 3(5):291-304. Review.
- Shah AG, Friedman MJ, Huang S, Roberts M, Li XJ, Li S (2009).** Transcriptional dysregulation of *TrkA* associates with neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 17. *Hum Mol Genet*. 18(21):4141-52.
- Silhan J, Vacha P, Strnadova P, Vecer J, Herman P, Sulc M, Teisinger J, Obsilova V, Obsil T (2009).** 14-3-3 protein masks the DNA binding interface of forkhead transcription factor FOXO4. *J Biol Chem*. 284(29):19349-60.
- Sinden RR (1999).** Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats. *Am J Hum Genet*. 64(2):346-53.
- Smith WW, Norton DD, Gorospe M, Jiang H, Nemoto S, Holbrook NJ, Finkel T, Kusiak JW (2005).** Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins mediates Abeta toxicity. *J Cell Biol*. 169(2):331-9.
- Ström AL, Forsgren L, Holmberg M (2005).** A role for both wild-type and expanded ataxin-7 in transcriptional regulation. *Neurobiol Dis*. 20(3):646-55.
- Su B, Liu H, Wang X, Chen SG, Siedlak SL, Kondo E, Choi R, Takeda A, Castellani RJ, Perry G, Smith MA, Zhu X, Lee HG (2009).** Ectopic localization of FOXO3a protein in Lewy bodies in Lewy body dementia and Parkinson's disease. *Mol Neurodegener*. 4:32.
- Suzuki K, Kastuno M, Banno H, Sobue G (2009).** Pathogenesis-targeting therapeutics for spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA). *Neuropathology*. 29(4):509-16.

-
- Takeyama K, Ito S, Yamamoto A, Tanimoto H, Furutani T, Kanuka H, Miura M, Tabata T, Kato S** (2002). Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*. *Neuron*. 35(5):855-64.
- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O, Tsuji S** (1993). The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet*. 4(3):300-4.
- Thrower JS, Hoffman L, Rechsteiner M, Pickart CM** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*. 19(1):94-102.
- Todi SV, Laco MN, Winborn BJ, Travis SM, Wen HM, Paulson HL** (2007). Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity. *J Biol Chem*. 282(40):29348-58.
- Todi SV, Winborn BJ, Scaglione KM, Blount JR, Travis SM, Paulson HL** (2009). Ubiquitination directly enhances activity of the deubiquitinating enzyme ataxin-3. *EMBO J*. 28(4):372-82.
- 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.
- Turrens JF** (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 552(Pt 2):335-44.
- 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.
- 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.
- van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM** (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2(SIRT1). *J Biol Chem*. 279(28):28873-9.
- van der Horst A, de Vries-Smits AM, Brenkman AB, van Triest MH, van den Broek N, Colland F, Maurice MM, Burgering BM** (2006). FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP. *Nat Cell Biol*. 8(10):1064-73.

-
- van der Vos KE, Coffe PJ** (2008). FOXO-binding partners: it takes two to tango. *Oncogene*. 27(16):2289-99.
- van Roon-Mom WM, Reid SJ, Jones AL, MacDonald ME, Faull RL, Snell RG** (2002). Insoluble TATA-binding protein accumulation in Huntington's disease cortex. *Brain Res Mol Brain Res*. 109(1-2):1-10.
- Walton MR, Dragunow I** (2000). Is CREB a key to neuronal survival? *Trends Neurosci*. 23(2):48-53.
- Wang B, Zhu J, Mounzih K, Chehab EF, Ke Y, Chehab FF** (2009). Overexpression of the transcription factor Foxo4 is associated with rapid glucose clearance. *Mol Cell Endocrinol*. 307(1-2):217-23.
- 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.
- Wang Q, Li L, Ye Y** (2006). Regulation of retrotranslocation by p97-associated deubiquitinating enzyme ataxin-3. *J Cell Biol*. 174(7):963-71.
- Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL, Bonini NM** (1999). Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet*. 23(4):425-8.
- 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.
- Winborn BJ, Travis SM, Todi SV, Scaglione KM, Xu P, Williams AJ, Cohen RE, Peng J, Paulson HL** (2008). The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem*. 283(39):26436-43.
- Wójcik C, Rowicka M, Kudlicki A, Nowis D, McConnell E, Kujawa M, DeMartino GN** (2006). Valosin-containing protein (p97) is a regulator of endoplasmic reticulum stress and of the degradation of N-end rule and ubiquitin-fusion degradation pathway substrates in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 17(11):4606-18.
- Zhong X, Pittman RN** (2006). Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet*. 15(16):2409-20.

7.2. Websites

<http://www.ataxie.de/sca3.0.html>

www.stratagene.com/gcprimerdesign

www.expasy.org/tools/protparam.html

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>

8. VERZEICHNISSE

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der ATXN3-Proteinvarianten mit einer N-terminalen Josephin-Domäne (JD), zwei bzw. drei Ubiquitin-Interaktionsmotiven (UIM) und einem PolyQ-Abschnitt (Q).	11
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung eines Funktionsmodells von ATXN3 in der ERAD.	15
Abbildung 1.3: Modell der transkriptionellen Funktion von ATXN3.	17
Abbildung 4.1: ATXN3-spezifische Immunpräzipitationen mit nukleären Extrakten aus CSM-Q23 und -Q70-Zellen.	62
Abbildung 4.2: Hybridisierte Arraymembranen der immunpräzipitierten DNA-Sonden aus CSM-Q23, CSM-Q70 und HeLa.	64
Abbildung 4.3: Übersicht der identifizierten Transkriptionsfaktoren, die aus der Analyse des Transkriptionsfaktor-Transkriptionsfaktor-Interaktionsarrays resultierten.	65
Abbildung 4.4: EMSA mit TFIID- (links) bzw. FOXO4-Sonde (rechts) und nukleären Extrakten aus CSM-Q23, CSM-Q70 und HeLa-Zellen.	67
Abbildung 4.5: EMSA mit WT1-Sonde und nukleären Extrakten aus CSM-Q23, CSM-70 und HeLa-Zellen.	69
Abbildung 4.6: Zytoplasmatische und nukleäre Expression von endogenem FOXO4 und WT1 in HeLa-, CSM-Ctrl-, CSM-Q23- und CSM-Q70-Zellen.	70
Abbildung 4.7: Immunfluoreszenzfärbung eines pontinen Neurons eines Kontroll-Patienten (obere Reihe) und eines SCA3-Patienten (untere Reihe).	72
Abbildung 4.8: Immunfluoreszenzfärbung eines pontinen Neurons eines Kontroll-Patienten (obere Reihe) und eines SCA3-Patienten (untere Reihe).	73
Abbildung 4.9: GST-ATXN3-Proteinvarianten	74

Abbildung 4.10: GST-Pulldown (PD) mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen, CSM-Ctrl-Zellen und Wildtyp-Maushirn.	76
Abbildung 4.11: HA-FOXO4-Immunpräzipitation und Western-Blot-Analyse von HeLa-Zellen, die mit überexprimiertem HA-FOXO4 und ATXN3Q2, -Q22, -Q71 und -Q123 kotransfiziert wurden.	77
Abbildung 4.12: Western-Blot-Analyse immunpräzipitierten endogenen ATXN3 und FOXO4 aus nukleärem Extrakt eines humanen Pongsgewebes.	78
Abbildung 4.13: <i>In vitro</i> Interaktion von His-NT-FOXO4 mit den verschiedenen GST-ATXN3-Varianten.	79
Abbildung 4.14: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von HA-FOXO4 bzw. HA-FOXO4-TM und His-ATXN3Q23 bzw. His-ATXN3Q70 transfizierter HeLa-Zellen.	80
Abbildung 4.15: Promotoraktivität des künstlichen FOXO4-Zielgenpromotors 4x DBE nach Kotransfektion mit FOXO4 und/oder ATXN3Q23 oder ATXN3Q70.	82
Abbildung 4.16: Promotoraktivität des 1,4kb-SOD2-Promotorkonstruktes nach Kotransfektion mit FOXO4 und/oder ATXN3Q23 oder ATXN3Q70.	83
Abbildung 4.17: SOD2 mRNA- (A) und Proteinexpression (B) in Kontroll- und SCA3-Pons.	85
Abbildung 4.18: Exemplarische Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse fluoreszenzmarkierter lymphoblastoider Zellen.	86
Abbildung 4.19: Liste der hergestellten lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) mit der anonymisierten Angabe des Patienten sowie der Erkrankung, des Geschlechts und des Alters der Spenderperson.	87
Abbildung 4.20: SOD2-mRNA- und Proteinlevels in Kontroll- und SCA3-LCLs.	88
Abbildung 4.21: ATXN3-Knockdown in einer SCA3-LCL durch lentivirale Transduktion einer ATXN3-spezifischen shRNA.	90
Abbildung 4.22: Elektrophoretische Auftrennung der präparierten Chromatinfragmente aus Kontroll- und SCA3-LCLs.	91
Abbildung 4.23: QPCR-Analyse des humanen SOD2-Genpromotorbereichs [-1398 bis -1243] nach CHIP mit ATXN3-, IgG- und H3-Antikörpern.	92
Abbildung 4.24: ROS-Messung der Kontroll- und SCA3-LCLs normiert auf die Anzahl lebender Zellen.	93

Abbildung 4.25: H ₂ O ₂ -Behandlung von HeLa-Zellen im Zeitverlauf und Western-Blot-Analyse der ATXN3-, FOXO4-, SOD2- und Aktin-Expression.	94
Abbildung 4.26: SOD2-Gen- und -Proteinexpressionsanalyse nach H ₂ O ₂ -Behandlung in SCA3- und Kontroll-LCLs.	96
Abbildung 4.27: Wachstum unbehandelter und mit 100µM H ₂ O ₂ behandelter Kontroll- und SCA3-LCLs im Zeitverlauf über 72h.	97
Abbildung 5.1: Modell der ATXN3-aktivierten Stressantwort des FOXO4-abhängigen SOD2-Genpromotors.	108

8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Liste bekannter PolyQ-Krankheiten mit den jeweiligen Erkrankungsproteinen, den normalen und pathogenen PolyQ-Repeat-Längen, sowie den putativen Funktionen der einzelnen Proteine.	5
Tabelle 1.2: Homologe <i>MJD</i> -Gene in eukaryotischen Organismen mit Angabe der Gensymbole, sowie der Homologie (in %) von DNA und Proteinen im Vergleich zur humanen <i>MJD</i> -Sequenz.	9

8.3. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	CSM14.1	Mesenzepale
μ	Mikro-		neuronenähnliche
%	Prozent		Rattenzellen
β	Beta	DAPI	4', 6-Diamidino-2-Phenylindol
A	Adenosin	DEPC	Diethylpyrocarbonat
AK	Antikörper	DMSO	Dimethylsulfoxid
AP	alkalische Phosphatase	DNA	Desoxyribonukleinsäure
AR	Androgenrezeptor	DNase	Desoxyribonuklease
ATN1	Atrophin-1	dNTP	Desoxyribonukleosid-
ATXN	Ataxin		triphosphat
BACE	Beta-Sekretase (beta-site of APP cleaving enzyme)	DRPLA	dentatorubro-pallidoluyische Atrophie
BDNF	brain-derived neurotrophic factor	DTT	Dithiothreitol
bp	Basenpaare	DUB	Deubiquitinierendes Enzym
BSA	Rinderserumalbumin	ECL	verstärkte Chemilumineszenz (enhanced chemiluminescence)
C	Cytidin	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ca.	Circa	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',- tetra-azetat
CAG	Glutamin	ER	Endoplasmatisches Retikulum
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat	ERAD	ER-assozierte Degradation
CBP	CREB Bindungsprotein	<i>et al.</i>	<i>et aliter</i>
CD	Unterscheidungsgruppen (cluster of differentiation)	FACS	Fluoreszenz aktivierte Zell Sortierung
cDNA	komplementäre DNA	FCS	Fötales Kälberserum (fetal calf serum)
CFTR	cystische Fibrose Transmembranregulator	FITC	Fluoreszein-isothio-cyanat
cm	Zentimeter	FOX	Forkheadbox
CM	Complete Mini	xg	Erdbeschleunigung
CMV	Cytomegalievirus	g	Gramm
CREB	cAMP response element binding protein	G	Guanosin
CRM1	chromosome region maintenance1, exportin-1	GAPDH	Glycerinaldehydphosphat- Dehydrogenase
		GST	Glutathion S-Transferase

h	Stunde	NBT	Nitroblautetrazolinumchlorid
HAT	Histonazetyltransferase	NCBI	Nationales Zentrum für
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorofluorescein		Biotechnologie Information
HD	Huntington'sche Krankheit	NCoR	nukleärer Rezeptor Ko-
HDAC	Histondeazetylase		Repressor
HEK293	Humane embryonale	NE	nukleäres Extrakt
	Nierenzellen (human	NES	nukleäres Exportsignal
	embryonic kidney cells)	NGF	Nervenwachstumsfaktor
His	Histidine		(nerve growth factor)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-	NI	Nukleäre Inklusionen
	Transferase	NLS	nukleäres Lokalisationssignal
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horse	OD	optische Dichte
	radish peroxidase)	ORF	offenes Leseraster (open
Htt	Huntingtin		reading frame)
IF	Immunfluoreszenz	p	piko-
IP	Immunpräzipitation	PAGE	Polyacrylamid-
IPTG	Isopropylthio-β-D-		Gelelektrophorese
	galactopyranosid	PE	Phycoerythrin
JD	Josephin-Domäne	PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
K	Lysin	PCR	Polymerasekettenreaktion
kb	Kilobasen	PD	Pulldown
kDa	Kilodalton	PFA	Paraformaldehyd
L	Leuzin	pH	negativ dekadischer
l	Liter		Logarithmus der
LB	Luria-Bertani		Wasserstoffkonzentration
LCL	lymphoblastoide Zelllinien	PMSF	Poly-Methyl-Sulfonyl-Flourid
m	Milli-	PolyQ	Polyglutamin
M	Molar (mol/l)	P/S	Penizillin/ Streptomycin
M	Mol	PVDF	Polyvinylidenfluorid
MCS	multiple Klonierungsstelle	ROS	reaktive
MEF	Murine embryonale		Sauerstoffverbindungen
	Fibroblasten	RNA	Ribonukleinsäure
min	Minute	RNase	Ribonuklease
MOPS	3-Morpholinopropan-	rRNA	ribosomale RNA
	sulfonsäure	RT	Raumtemperatur
MMP	Matrix-Metalloproteinase	RT	reverse Transkription
mRNA	Boten-RNA	s.	siehe
n	nano-	S	Serin
NaOH	Natronlauge	SBMA	spinobulbäre Muskelatrophie

SCA	Spinozerebelläre Ataxie	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
SEM	Standardfehler des arithmetischen Mittels (standard error of the mean)	TrkA	Tyrosinkinase A Rezeptor (nerve growth factor receptor)
shRNA	short hairpin RNA	U	Uracil
SOD	Superoxid Dismutase	U	Unit
SDS	Natriumdodecylsulfat	UIM	Ubiquitin-Interaktionsmotiv
sec	Sekunde	ÜN	über Nacht
T	Thymidin	Ufd1	Ubiquitinfusion
TAE	Tris-Azetat-EDTA		Degradationsprotein1
TAF	TBP assoziierte Faktoren	UpM	Umdrehungen pro Minute
TATA-Box	DNA-Sequenz in der Promotorregion eines Gens	UV	Ultraviolett
TBE	Tris-Borat-EDTA	V	Volt
TBP	TATA-Box Bindungsprotein	VCP	valosin containing protein
TCR	T-Zell-Rezeptor	vs.	<i>versus</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin	WB	Western-Blot
TFIID	Transkriptionsfaktor II D	WT1	Wilms' Tumor 1
TFTC/STAGA	TBP freier TAF-enthaltender SPT3/ TAF9/ GCN5 Azetyltransferase Komplex	WT	Wildtyp
		YAC	yeast artificial chromosome

9. ANHANG

9.1. Nukleotidsequenzen

9.1.1. ATXN3Q23 cDNA

GGATCCTCTAGATCCAGACAAATAAACATGGAGTCCATCTTCCACGAGAAACAAGAAGGCTCAC
TATGTGCTCAACATTGCCTGAATAACTTATTGCAAGGAGAATATTTAGCCCTGTGGAATTATCCTC
AATTGCACATCAGCTGGATGAGGAGGAGAGGATGAGAATGGCAGAAGGGGGAGTTACTAGTG
AAGATTATCGCACGTTTTTACAGCAGCCTTCTGAAATATGGATGACAGTGGTTTTTTCTCTATTC
AGGTTATAAGCAATGCCTTGAAAGTTTGGGGTTTAGAACTAGTCCTGTTCAACAGTCCAGAGTAT
CAGAGGCTCAGGATCGATCCTATAAATGAAAGATCATTGTATGCAATTATAAGGAACACTGGTTT
ACAGTTAGAAAATTAGGAAAACAGTGGTTTAACTTGAATTCTCTCTTGACGGGTCCAGAATTAAT
ATCAGATACATTTCTTGCACTTTTCTGGCTCAATTACAACAGGAAGGTTATTCTATATTTGTTGTT
AAGGGTGATCTGCCAGATTGCGAAGCTGACCAACTCCTGCAGATGATTAGGGTCCAACAGATGC
ATCGACCAAACTTATTGGAGAAGAATTAGCACAATAAAAGAGCAAAGAGTCCATAAAACAGA
CCTGGAACGAATGTTAGAAGCAAATGATGGCTCAGGAATGTTAGACGAAGATGAGGAGGATTT
GCAGAGGGCTCTGGCACTAAGTCGCCAAGAAATTGACATGGAAGATGAGGAAGCAGATCTCCG
CAGGGCTATTCAGCTAAGTATGCAAGGTAGTTCCAGAAACATATCTCAAGATATGACACAGACAT
CAGGTACAAATCTTACTTCAGAAGAGCTTCGGAAGAGACGAGAAGCCTACTTTGAAAAACAGC
AGCAAAAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGGGGGACCTATCAGGACAGAGTTCACATCCATGTGAAAGGCCAGCCACCAAGTTCAGGAGC
ACTTGGGTGTGATCTAGGCAAGGCCTGCTCACCATTCATCATGTTCGCTACCTTCACACTTTATCT
GACATAAGAGCTCCATGTGATTTTTGCTTTACATTATTCTTCATTCCCTCTTTAATCATATTAAGACT
CTTAAGTAAATTTGTAGTCGACTAGAGGATCC

9.1.2. ATXN3Q70 cDNA

GGATCCTCTAGATCCAGACAAATAAACATGGAGTCCATCTTCCACGAGAAACAAGAAGGCTCAC
TATGTGCTCAACATTGCCTGAATAACTTATTGCAAGGAGAATATTTTAGCCCTGTGGAATTATCCTC
AATTGCACATCAGCTGGATGAGGAGGAGAGGATGAGAATGGCAGAAGGGGGAGTTACTAGTG
AAGATTATCGCACGTTTTTACAGCAGCCTTCTGGAAATATGGATGACAGTGGTTTTTCTCTATTC
AGGTTATAAGCAATGCCTTGAAAGTTTGGGGTTTAGAACTAGTCCTGTTCAACAGTCCAGAGTAT
CAGAGGCTCAGGATCGATCCTATAAATGAAAGATCATTTGTATGCAATTATAAGGAACACTGGTTT
ACAGTTAGAAAATTAGGAAAACAGTGGTTTAACTTGAATTCTCTCTTGACGGGTCCAGAATTAAT
ATCAGATACATTTCTTGCACTTTTCTGGCTCAATTACAACAGGAAGGTTATTCTATATTTGTTGTT
AAGGGTGATCTGCCAGATTGCGAAGCTGACCAACTCCTGCAGATGATTAGGGTCCAACAGATGC
ATCGACCAAACTTATTGGAGAAGAATTAGCACAATAAAAGAGCAAAGAGTCCATAAAACAGA
CCTGGAACGAATGTTAGAAGCAAATGATGGCTCAGGAATGTTAGACGAAGATGAGGAGGATTT
GCAGAGGGCTCTGGCACTAAGTCGCCAAGAAATTGACATGGAAGATGAGGAAGCAGATCTCCG
CAGGGCTATTCAGCTAAGTATGCAAGGTAGTTCCAGAAACATATCTCAAGATATGACACAGACAT
CAGGTACAAATCTTACTTCAGAAGAGCTTCGGAAGAGACGAGAAGCCTACTTTGAAAAACAGC
AGCAAAAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCA
GCA
GCA
GCA
GGCCAGCCACAGTTCAGGAGCACTTGGGTGTGATCTAGGCAAGGCCTGCTCACCATTTCATCAT
GTTTCGCTACCTTCACACTTTATCTGACATAAGAGCTCCATGTGATTTTTGCTTTACATTATTCTTCAT
TCCCTCTTTAATCATATTAAGACTCTTAAGTAAATTTGTAGTCGACTAGAGGATCC

9.1.3. FOXO4 cDNA

ATGGATCCGGGGAATGAGAATTCAGCCACAGAGGCTGCCGCGATCATAGACCTAGATCCCGACT
TCGAACCCAGAGCCGTCCCCGCTCCTGCACCTGGCCCCCTCCCCGACCAGAGATCGCTAACCA
GCCGTCCGAGCCGCCGAGGTGGAGCCAGATCTGGGGGAAAAGGTACACACGGAGGGGCGC
TCAGAGCCGATCCTGTTGCCCTCTCGGCTCCAGAGCCGGCCGGGGCCCCAGCCCGGAATC
CTGGGGGCTGTAACAGGTCTCGGAAGGGAGGCTCCCGCCGGAATGCCTGGGGAAATCAGTC

ATATGCAGAACTCATCAGCCAGGCCATTGAAAGCGCCCCGAGAAGCGACTGACACTTGCCCA
GATCTACGAGTGGATGGTCCGTA CTGTACCCTACTTCAAGGACAAGGGTGACAGCAACAGCTCA
GCAGGATGGAAGAACTCGATCCGCCACAACCTGTCCCTGCACAGCAAGTTCATCAAGGTTCACA
ACGAGGCCACCGGCAAAAGCTCTTGGTGGATGCTGAACCCTGAGGGAGGCAAGAGCGGCAAA
GCCCCCGCCGCCGGCCGCCTCCATGGATAGCAGCAGCAAGCTGCTCCGGGGCCGCAGTAAA
GCCCCAAGAAGAAACCATCTGTGCTGCCAGCTCCACCCGAAGGTGCCACTCCAACGAGCCCT
GTCGGCCACTTTGCCAAGTGGTCAGGCAGCCCTTGCTCTCGAAACCGTGAAGAAGCCGATATGT
GGACCACCTTCCGTCCACGAAGCAGTTCAAATGCCAGCAGTGTGACACCCGGCTGTCCCCCTT
GAGGCCAGAGTCTGAGGTGCTGGCGGAGGAAATACCAGCTTCAGTCAGCAGTTATGCAGGGG
GTGTCCCTCCCACCCTCAATGAAGGTCTAGAGCTGTTAGATGGGCTCAATCTCACCTCTTCCCATT
CCCTGCTATCTCGGAGTGGTCTCTCTGGCTTCTCTTTGCAGCATCCTGGGGTTACCGGCCCTTA
CACACCTACAGCAGCTCCCTTTTCAGCCCAGCAGAGGGGGCCCCTGTCAGCAGGAGAAGGGTGC
TTCTCCAGCTCCCAGGCTCTGGAGGCCCTGCTCACCTCTGATACGCCACCACCCCTGCTGACGT
CCTCATGACCCAGGTAGATCCCATTCTGTCCCAGGCTCCGACTCTTCTGTTGCTGGGGGGGCTTC
CTTCTCCAGTAAGCTGGCCACGGGCGTCGGCCTGTGTCCCAAGCCCCTAGAGGCTCCAGGCC
CAGCAGTCTGGTTCCCACCCTTTCTATGATAGCACCACTCCAGTCATGGCAAGTGCCCCATCC
CCAAGGCTCTGGGGACTCCTGTGCTCACACCCCTACTGAAGCTGCAAGCCAAGACAGAATGCC
TCAGGATCTAGATCTTGATATGTATATGGAGAACCTGGAGTGTGACATGGATAACATCATCAGTGA
CCTCATGGATGAGGGCGAGGGACTGGACTTCAACTTTGAGCCAGATCCC**TG**AGTCATGCCTGG
AAGCTTTGTCCCCTGCTTCAGATGTGGAGCCAGGCGTGTTTCATATCTACTCTTTACCCTTGAGCCC
TCCCAGGAATTTGGGACCCTGCTTTAGAGCTAGGGTGGGGTCTGGTCACACACAGGTG