

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Aggregationsverhalten des
Polyglutaminproteins Ataxin-3
in vitro und in Zellkultur**

Annette Haacke

aus

Marburg

2006

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl betreut.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Abteilung Zelluläre Biochemie durchgeführt.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, 23.01.2006

Annette Haacke

Dissertation eingereicht am 23.01.2006

1. Gutachter: Prof. Dr. Franz-Ulrich Hartl
2. Gutachter: Dr. Konstanze Winklhofer

Mündliche Prüfung am 16.05.2006

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	9
1.1 Neurodegenerative amyloide Erkrankungen.....	9
1.1.1 Spinozerebellare Ataxie 3 und andere Polyglutamin(polyQ)-Erkrankungen.....	9
1.1.2 Amyloide Proteinablagerungen (Aggregate).....	11
1.1.3 Neuronale Toxizitätsmechanismen.....	15
1.1.4 Eigenschaften des Ataxin3-Proteins.....	18
1.2 Molekulare Chaperone und deren Einfluß auf amyloide Erkrankungen.....	21
1.2.1 Aufgaben der molekularen Chaperone in der Zelle.....	21
1.2.2 Modulation der polyQ-Aggregation und Toxizität durch molekulare Chaperone	24
1.3 Proteolytische Spaltung der pathogenen Proteine als Krankheitsauslöser.....	26
1.3.1 Proteolyse von pathologischen Proteinen im menschlichen Gehirn	26
1.3.2 Fragmentierung von polyQ-Proteinen bei transgenen Mäusen und in Zellkultur.....	27
1.3.3 Involvierung von Caspasen in der Spaltung.....	29
1.3.4 Mögliche Rolle von Calpainen als polyQ-Protein schneidende Proteasen	31
1.4 Einfluß des Alterns	33
1.5 Zielsetzung.....	35
2. MATERIAL UND METHODEN.....	37
2.1 Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien.....	37
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme.....	37
2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme.....	37
2.1.3 Zelllinien.....	37
2.2 Vektoren und Oligonukleotide	37
2.2.1 Vektoren	37
2.2.2 Oligonukleotide	38
2.3 Gereinigte Proteine und Antikörper.....	39
2.3.1 Gereinigte Proteine (außer GST-Ataxin3-Fusionsproteine siehe 2.8.5)	39

2.3.2 Primärantikörper	40
2.3.3 Sekundärantikörper	40
2.4 Puffer und Medien	40
2.4.1 Puffer und Reagenzien	40
2.4.2 Medien für die Bakterienkultur	41
2.4.3 Medien für die Hefekultur	42
2.4.4 Reagenzien für die Zellkultur	42
2.5 Molekularbiologische Methoden	42
2.5.1 Plasmidpräparationen	42
2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Plasmiden	42
2.5.3 DNS-Restriktionsverdau	43
2.5.4 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	43
2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid-DNS	43
2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.5.7 Zielgerichtete Mutagenese	44
2.5.8 Ligation von DNS-Fragmenten	44
2.5.9 DNS-Sequenzierungen	44
2.5.10 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen	44
2.5.11 Herstellung eines Ataxin3-Konstrukts mit alternierenden CAA CAG-Trinukleotiden	45
2.6 Hefekulturmethoden	46
2.6.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefen	46
2.6.2 Proteinexpression in Hefe	46
2.6.3 Herstellung von Hefe-Extrakten unter denaturierenden Bedingungen	46
2.6.4 Herstellung von nativen Hefe-Extrakten	46
2.6.5 Plasmidisolation aus Hefe	47
2.6.6 Hefe-Vitalitätstest	47
2.7 Kulturmethode für Säugetierzellen	47
2.7.1 Kultivierung von adhären Zellen	47
2.7.2 Kryokonservierung	47
2.7.3 Transiente Transfektion	48

2.7.4 Herstellung von Zellysaten.....	48
2.7.5 Herstellung von N2a-postnukleären Überständen zur Ataxin3-Spaltung <i>in vitro</i>	48
2.7.6 Herstellung von HEK293T-Lysaten für <i>in vitro</i> -Caspase-Aktivierungsassays.....	49
2.7.7 Immunfluoreszenz-Mikroskopie	49
2.8 Proteinbiochemische Methoden	50
2.8.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese).....	50
2.8.2 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen	50
2.8.3 Western Blot Analyse von SDS-PAGE-Gelen.....	50
2.8.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	51
2.8.5 Expression und Reinigung von GST-Ataxin3-Fusionsproteinen	51
2.8.6 Expression und Reinigung von His ₆ -Fusionsproteinen	52
2.8.7 Aufreinigung von Antikörpern aus Serum	52
2.9 Biochemische und biophysikalische Methoden.....	53
2.9.1 Limitierte Proteolyse <i>in vitro</i>	53
2.9.2 <i>In vitro</i> -Aggregation	53
2.9.3 Filtertest der <i>in vitro</i> -Aggregation (<i>filter retardation assay</i>)	53
2.9.4 Elektronenmikroskopie.....	54
2.9.5 Proteinpräzipitation über GST-Epitope (<i>pull down assay</i>)	54
2.9.6 Affinitätsreinigung von Aggregaten mittels Ni-NTA-Agarose.....	54
2.9.7 Auflösen von Aggregaten mit Ameisensäure.....	54
2.9.8 <i>In vitro</i> -Proteolyse mit Calpain II.....	55
3. ERGEBNISSE	56
3.1 Analyse des Aggregationsverhaltens verschiedener Ataxin3-Fragmente	56
3.1.1 Ataxin3-Aggregation <i>in vitro</i>	56
3.1.2 Ataxin3-Aggregation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	63
3.1.3 Ataxin3-Aggregation in Neuroblastomazellen.....	64
3.2 Effekt der molekularen Chaperone Hsp70/40 auf die Ataxin3-Aggregation.....	67
3.2.1 Inhibition der Ataxin3-Aggregation durch Hsp70/40 <i>in vitro</i>	67
3.2.2 Inhibition der Aggregation und Verstärkung des Abbaus von Polyglutamin-Proteinen durch Hsp70/40 in Neuroblastomazellen	72

3.3 Modulation der Ataxin3-Aggregation durch p97 <i>in vitro</i>	75
3.3.1 Effekt von p97 auf verschiedene Ataxin3-Fragmente <i>in vitro</i>	75
3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit des p97-Effekts <i>in vitro</i>	77
3.4 Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 mit Polyglutamin-Fragmenten	78
3.4.1 PolyQ-abhängige Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 <i>in vitro</i>	79
3.4.2 Rekrutierung von Vollängen-Ataxin3 in frühe Aggregationsintermediate <i>in vitro</i> ...	81
3.4.3 Koaggregation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	84
3.4.4 PolyQ-abhängige Koaggregation und Verringerung der Ataxin3-Konzentration in Neuroblastomazellen	84
3.5 Einfluß der zellulären Lokalisation auf das Aggregationsverhalten	88
3.5.1 Aggregation von Ataxin3 mit Kernlokalisierungssignal in Hefe	88
3.5.2 Ataxin3 mit Kernlokalisations- und Kernexportsignal in N2a-Zellen	89
3.5.3 Analyse von Ataxin3-Mutanten des endogenen putativen Kernlokalisierungssignals in Neuroblastomazellen	91
3.6 Einfluß der proteolytischen Ataxin3-Spaltung auf das Aggregationsverhalten.....	94
3.6.1 Aggregation von pathologischem Vollängen-Ataxin3 in N2a-Zellen.....	94
3.6.2 Einfluß von Staurosporin auf die Ataxin3-Spaltung in Säugetierzellen.....	97
3.6.3 Proteolytische Spaltung von Ataxin3 <i>in vitro</i> mit zellulären Lysaten.....	99
3.6.4 Auswirkungen von Ionomycin auf die Ataxin3-Spaltung in Säugetierzellen	103
3.6.5 Proteolytische Spaltung von Ataxin3 <i>in vitro</i> mit Calpain II.....	105
3.6.6 Inhibition der Ataxin3-Spaltung und -Aggregation durch Calpeptin und Calpastatin in Säugetierzellen.....	109
4. DISKUSSION	113
4.1 Aggregationseigenschaften des Ataxin3-Proteins.....	113
4.1.1 Gereinigte GST-Ataxin3-Fusionsproteine und die Ataxin3-Expression in Neuroblastomazellen sind als <i>in vitro</i> - und <i>in vivo</i> -Aggregationsmodelle geeignet.....	113
4.1.2 Untermauerung der <i>toxic fragment</i> -Hypothese: Im Gegensatz zu Ataxin3-Fragmenten aggregiert Vollängen-Ataxin3 mit pathologischem polyQ-Bereich kaum.....	114
4.1.3 Bildung von SDS-resistenten Oligomeren und SDS-löslichen Aggregationsintermediaten.....	115

4.1.4 Die zelluläre Lokalisation von Ataxin3 hat keinen Einfluß auf die Aggregation in Neuroblastomazellen	116
4.1.5 Die endogene Sequenz RKRR (282-285) dient nicht als Kernlokalisierungssignal ...	117
4.1.6 Aggregationseigenschaften von Ataxin3 in <i>S. cerevisiae</i>	117
4.1.7 Aggregierende Ataxin3-Fragmente induzieren keine Toxizität in <i>S. cerevisiae</i> und N2a-Zellen	118
4.1.8 Modifikationen und proteolytische Degradation von Ataxin3 in N2a-Zellen.....	119
4.2 Toxic fragment-Hypothese: Proteolytische Spaltung von Vollängen-Ataxin3 als Voraussetzung für Aggregation.....	120
4.2.1 Detektion von polyQ-enhaltenden Fragmenten in Zelllysaten und aufgelösten Aggregaten bei Expression von pathologischem Ataxin3-Vollängenprotein	120
4.2.2 Die induzierte Spaltung von pathologischem Vollängen-Ataxin3 in N2a-Zellen resultiert in Aggregation.....	121
4.2.3 Ataxin3 wird nicht autoproteolytisch gespalten	121
4.2.4 Untersuchungen zur Identifizierung der Ataxin3-schneidenden Protease	121
4.2.5 Hinweise auf die Spaltung von Ataxin3 durch Caspasen.....	123
4.2.6 Calpain-abhängige Ataxin3-Spaltung <i>in vitro</i>	125
4.2.7 <i>In vivo</i> -Experimente mit Ionomycin, Calpeptin und Calpastatin deuten auf eine Ataxin3-Spaltung durch Calpaine hin	128
4.2.8 Hinweise auf weitere, bislang unbekannte Ataxin3-schneidende Protease(n).....	129
4.3 Koaggregationseigenschaften des Ataxin3-Vollängenproteins	129
4.3.1 Die Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 ist polyQ-abhängig und unabhängig von den Ubiquitin-Interaktionsmotiven.....	129
4.3.2 Vollängen-Ataxin3 wird stabil in Koaggregate rekrutiert.....	131
4.3.3 Vollängen-Ataxin3 macht <i>in vitro</i> eine polyQ-induzierte Konformationsänderung durch und wird in frühe Aggregationsintermediate rekrutiert.....	131
4.3.4 Ein partieller Funktionsverlust des Wildtyp-Ataxin3 könnte zur Erkrankung in heterozygoten SCA3-Patienten beitragen.....	132
4.4 Modulation der Ataxin3-Aggregation durch molekulare Chaperone.....	134
4.4.1 Die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp40 inhibieren die SDS-resistente Ataxin3-Aggregation	134

4.4.2 Die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp40 fördern die SDS-lösliche Aggregation nicht sondern verstärken den proteasomalen Ataxin3-Abbau.....	135
4.4.3 Expression molekularer Chaperone als möglicher Therapieansatz bei polyQ-Erkrankungen	137
4.4.4 Konzentrationsabhängige Verstärkung der Ataxin3-Aggregation durch p97 <i>in vitro</i>	138
4.5 Ausblick	140
5. ZUSAMMENFASSUNG	142
6. LITERATUR	143
7. ANHANG.....	163
Abkürzungen und Trivialnamen von Chemikalien	163
Proteinsequenzen der verwendeten Polyglutamin-Proteine	165
DNS-Sequenz der alternierenden CAA CAG-Codons (Q ₃ KQ ₈₇).....	166
Lebenslauf	167

1. Einleitung

1.1 Neurodegenerative amyloide Erkrankungen

1.1.1 Spinozerebellare Ataxie 3 und andere Polyglutamin(polyQ)-Erkrankungen

Die Spinozerebellare Ataxie 3 (SCA3), auch Machado-Joseph-Erkrankung (MJD) genannt, ist eine autosomal dominant vererbte neurodegenerative Erkrankung. Sie tritt meist in einem Alter von 30 - 40 Jahren auf und endet tödlich nach einer Krankheitsdauer von etwa 10 Jahren. Zu dem Krankheitsbild gehören zerebellare Ataxie (Störung der Bewegungskoordination, z.B. des Gangs) mit progredientem Verlauf, Dysarthrie (Sprachstörung), Ophthalmoplegie (Augenmuskellähmung), Nystagmus (Augenzittern), Dysmetrie (falsche Abmessung von Zielbewegungen), Spastik, Rigor (Starre), Dystonie (Tonusstörung), Muskelatrophie, verstärkte bzw. abgeschwächte Reflexe, Schluckstörung, Intentionstremor (Zittern bei zielgerichteter Bewegung), faziolinguale Faszikulationen (blitzartige Kontraktionen von Muskelbündeln der Zungen- und mimischen Muskulatur ohne Bewegungseffekt) und selten Demenz. Die Prävalenz aller Spinozerebellaren Ataxien wird auf 1 bis 4 pro 100.000 geschätzt (SCA3 < 1 / 100.000) (Andrew et al., 1997).

Als Ursache der SCA3 (MJD) wurde die Verlängerung eines repetitiven (CAG)_n-Bereichs im Gen MJD1 auf dem Chromosom 14 identifiziert. Der repetitive Trinukleotid-Bereich im MJD1-Gen kodiert einen ununterbrochenen Polyglutamin-(polyQ)-Bereich im Protein Ataxin3. Die Erkrankung SCA3 manifestiert sich, wenn der repetitive CAG-Bereich eine Länge von mindestens 61 Wiederholungen aufweist, wobei die Länge des polyQ-Bereichs mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn (*age of onset*) negativ korreliert. Bei 64 CAG-Wiederholungen findet man einen Ausbruch der SCA3 mit etwa 62 Jahren, 82Q resultieren in einem Krankheitsbeginn mit circa 14 Jahren (Durr et al., 1996; Maruyama et al., 2002). Bei SCA3-Patienten findet man außerdem einen mit zunehmender Länge des polyQ-Bereichs zunehmenden Schweregrad der klinischen Symptome. Bei gesunden Menschen wurde eine polyQ-Länge von 12 - 42 Glutaminen nachgewiesen. Eine intermediäre polyQ-Länge von 53 - 54Q ist selten und resultiert im *restless legs*-Syndrom mit Faszikulationen, Tremor, Gangstörungen und einer sensomotorischen axonalen Polyneuropathie (van Alfen et al., 2001).

Es wird angenommen, daß die Expansion der CAG-Wiederholungen durch ein Verrutschen der DNS-Polymerase auf der Matritzen-DNS (*gene slippage*) oder durch eine Ausbildung von DNS-Sekundärstrukturen während der Meiose verursacht wird (Sinden, 1999). Sie resultiert

Einleitung

in einem als Antizipation bezeichneten Phänomen, welches durch eine frühere Manifestation und einen schwereren Verlauf der SCA3 in nachfolgenden Generationen gekennzeichnet ist (Durr et al., 1996).

Neuropathologisch ist SCA3 durch neuronalen Zellverlust und Gliose (Proliferation von Gliazellen) in den Basalganglien, Kleinhirn (Cerebellum), Hirnstamm und Rückenmark, insbesondere im Nucleus subthalamicus (Basalganglien), Nucleus dentatus (Kleinhirn), Tractus spinocerebellaris (Kleinhirnseitenstrang), Substantia nigra (Hirnstamm), Hinterstrang, in den pontinen Hirnnervenkernen inklusive Nuclei vestibulari, und durch Neuropathie der peripheren Motor- und Sensoraxone gekennzeichnet (Rosenberg, 1992; Takiyama et al., 1994; Sudarsky and Coutinho, 1995; Soong et al., 1997; Evert et al., 2000).

Das MJD1-Gen wird ubiquitär im menschlichen Körper exprimiert und kommt in mindestens vier alternativen Spleiß-Varianten vor (Ichikawa et al., 2001). Zusätzliche Stop-Codon-Polymorphismen resultieren in unterschiedlichen C-Termini (Goto et al., 1997). Verschiedene Untersuchungen zeigen, daß Ataxin3 sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert ist (Paulson et al., 1997a; Wang et al., 1997; Trottier et al., 1998; Tait et al., 1998; Evert et al., 1999).

Die Verlängerung eines exprimierten CAG-Bereichs wurde in einer wachsenden Gruppe von überwiegend dominant vererbten neurodegenerativen Krankheiten identifiziert (Tabelle 1-1). Diese *Trinukleotide Repeat*-Erkrankungen wurden unter dem Begriff Polyglutamin-Erkrankungen zusammengefaßt. Zu ihnen gehören außer der SCA3, die Huntington-Erkrankung (HD, Chorea (griech.= Tanz) / Morbus Huntington, auch Veitstanz genannt, Review: (Bates, 2005)), Dentatorubrale Pallidolysische Atrophie (DRPLA), Spinobulbäre Muskuläre Atrophie (SBMA, auch Kennedy-Erkrankung genannt) und weitere Spinozerebellare Ataxien (SCA1, 2, 6, 7, 17). Außerhalb des polyQ-Bereichs weisen die pathologischen Proteine keine bzw. nur geringe Sequenz-Ähnlichkeiten auf. Die Expression eines 79Q-Peptids bzw. die Einführung eines verlängerten polyQ-Bereichs in ein Protein, welches normalerweise nicht mit einer neurodegenerativen Erkrankung in Verbindung steht, führt zu neuronaler Pathologie bei transgenen Mäusen (Ikeda et al., 1996; Ordway et al., 1997), weshalb angenommen wird, daß der polyQ-Bereich durch Ausübung einer toxischen Funktion die Ursache der Erkrankungen darstellt. Ebenfalls für den polyQ-Bereich als Erkrankungsursache spricht die inverse Korrelation zwischen polyQ-Länge und Alter bei Krankheitsbeginn sowie die Korrelation zwischen polyQ-Länge und Schwere der Manifestation. Außerdem sterben Mäuse, die eine gezielte Unterbrechung im murinen Huntingtin (Htt)-Gen besitzen, während der frühen Embryonalentwicklung (Nasir et al.,

Einleitung

1995), was darauf hindeutet, daß es sich bei der neurodegenerativen Erkrankung HD nicht um einen Htt-Funktionsverlust sondern um einen Hinzugewinn einer neuen Funktion (*gain of function*) handelt. Ataxin3 ist mit Ausnahme des Transkriptionsfaktors TBP das kleinste der in Tabelle 1-1 aufgelisteten polyQ-Proteine. Im Gegensatz zur SCA3 manifestieren sich die meisten anderen polyQ-Erkrankungen, wenn ein Schwellenwert von etwa 40 Glutaminen im entsprechenden Protein erreicht ist (Tabelle 1-1), mit Ausnahme der SCA6, bei der im Vergleich zu den übrigen polyQ-Erkrankungen über einen anderen Pathogenitätsmechanismus diskutiert wird (Tarlac and Storey, 2003). Ataxin3 besitzt einen C-terminalen polyQ-Bereich, wohingegen die meisten anderen Proteine aus Tabelle 1-1 einen N-terminalen polyQ-Bereich haben.

Tabelle 1-1: Name der verschiedenen polyQ-Erkrankungen, verantwortliches Gen / Protein, Molekülmasse des Wildtyp-Proteins in Kilo-Dalton, Glutamin-Anzahl bei gesunden (Wildtyp) und kranken Menschen.

*(Andrew et al., 1997)

polyQ-Krankheit	Gen / Protein	Protein (kDa)	Q _n (Wildtyp)	Q _n (pathogen)
SCA 3 = MJD	MJD1 / Ataxin3	42	12 - 42	61 – 86
HD	Huntingtin (Htt)	350	6 - 41	36 – 80
DRPLA	Atrophin1	124	3 - 36	49 – 88
SBMA	Androgen-Rezeptor (AR)	99	9 - 36	38 – 62
SCA 1	Ataxin1	87	6 – 44 (unterbrochen durch 1-3 H)*	39 – 88 (nicht unterbrochen)
SCA 2	Ataxin2	140	14 - 34	32 – 77
SCA 6	CACNA1A (Calciumkanal α1A)	160-250	4 - 18	21 – 33
SCA 7	Ataxin7	95	4 - 35	37 – 300
SCA 17	TATA-Bindeprotein (TBP)	37	25 - 42	47 – 63

1.1.2 Amyloide Proteinablagerungen (Aggregate)

In histologischen Schnitten von humanen SCA3-Gehirnen konnten intrazelluläre Proteinablagerungen oder Einschlußkörperchen (Einschlüsse = *inclusions*) bestehend aus mutiertem Ataxin3 gefunden werden. Diese Proteinpräzipitationen lagen vorwiegend in neuronalen Zellkernen betroffener Gehirnareale vor (Paulson et al., 1997b). Ähnliche Proteinablagerungen und neuronale Zellverluste konnten bei den anderen polyQ-Erkrankungen identifiziert werden, man findet jedoch spezifisch für die jeweilige Erkrankung unterschiedliche betroffene Gehirnbereiche (DiFiglia et al., 1997; Skinner et al., 1997;

Einleitung

Schmidt et al., 1998; Evert et al., 2000; Ross and Poirier, 2004), wobei die Gehirnregionen mit Proteinablagerungen den Regionen, die neuronale Degeneration zeigen, grob entsprechen. In Zellkulturexperimenten konnte durch Expression von Ataxin3 oder von anderen polyQ-Proteinen mit verlängertem polyQ-Bereich die Bildung von nukleären Einschlüssen induziert werden (Ikeda et al., 1996; Butler et al., 1998; Cooper et al., 1998; Evert et al., 1999; Chai et al., 1999b; Stenoiien et al., 1999). *In vitro* wurde gezeigt, daß poly-Glutamin-Peptide in Wasser hochgradig unlöslich sind, und daß die Aggregation von polyQ-Proteinen von der Länge des polyQ-Bereichs abhängt (Perutz et al., 1994; Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999; Tanaka et al., 2001; Chen et al., 2002a).

Vergleicht man die polyQ-Erkrankungen mit anderen neurodegenerativen Krankheiten, fällt auf, daß auch bei der Alzheimer-, der Parkinson-Erkrankung und den Prion-Krankheiten (spongiforme Encephalopathien) neuronaler Zellverlust sowie Proteinablagerungen in Form von intrazellulären Einschlüssen oder extrazellulären Plaques zu finden sind (Abb.1-1). Sogenannte neuronale amyloide Ablagerungen, die definitionsgemäß extrazellulär vorkommen, wurden zunächst für das A β -Peptid (= Amyloid-beta) der Alzheimer-Erkrankung charakterisiert, heute spricht man jedoch auch bei Prion-Ablagerungen und bei intrazellulären Einschlüssen der Parkinson- und polyQ-Erkrankungen von amyloiden bzw. amyloid-ähnlichen Aggregaten (Scherzinger et al., 1997; Scherzinger et al., 1999; Rochet and Lansbury, 2000; Soto, 2003). Der Begriff Amyloid (griech.= Stärkemehl, da mit Iod intensive Blaufärbung entsteht wie bei Amylose) wurde in der Medizin für sich ablagernde Protein-Polysaccharid-Komplexe verwendet, die unter krankhaften Umständen im Organismus (Amyloidosen) entstehen (z.B. Tuberkulose, chronische Eiterungen, Syphilis, maligne Tumoren) und besonders Milz, Leber, Nieren, aber auch die Haut befallen (Pschyrembel, 1982). Neuere Namensgebungen beinhalten das Serum-Amyloid-A, das sich im Serum bei akuten und chronischen Infektionen, Tumoren und in höherem Lebensalter findet, das Amyloid-L, welches aus leichten Immunglobulinketten gebildet wird (*light chain-associated amyloidosis*) und das Amyloid-B aus Beta-2-Mikroglobulin (Pschyrembel, 1994). Amyloid der senilen, familiären und hereditären Systemischen Amyloidosen (familiäre Amyloid-Polyneuropathien) besteht aus Transthyretin oder Lysozym, Amyloid bei Diabetes mellitus Typ II aus *Islet Amyloid Polypeptide* (IAPP) (Lansbury, 1999; Rochet and Lansbury, 2000; Dobson, 2001; Horwich, 2002).

Charakteristisch für amyloide Aggregate ist ihre fibrilläre Form (Elektronenmikroskopie, siehe Abb.1-1), erhöhter β -Faltblatt-Gehalt der sonst eher α -helikalen Proteine (Circulardichroismus-Spektroskopie) sowie eine „cross-beta“-Struktur in Röntgenstruktur-

Einleitung

analysen (Röntgenbeugungsanalysen) mit 4,75 Å-meridionaler und 10 Å-äquatorialer Reflexion, die auf eine Fibrillen-Struktur aus aufeinander gestapelten β -Faltblättern hindeutet. Außerdem binden amyloide Aggregate ThioflavinT und Kongorot, wodurch sie sich anfärben lassen, und zeigen verstärkte Fluoreszenz bzw. einen typischen Spektralshift sowie grüne Doppelbrechung (*green birefringence*) im polarisierten Licht (Scherzinger et al., 1997; Serpell, 2000; Morozova-Roche et al., 2000; Tanaka et al., 2001; Dobson, 2001; Chen et al., 2002a; Dobson, 2004; Nelson et al., 2005). Amyloide Aggregationen lassen sich *in vitro* mit Kongorot inhibieren, die Huntingtin (Htt)-Aggregation außerdem mit ThioflavinS und anti-polyQ-Antikörpern (Heiser et al., 2000; Sanchez et al., 2003).

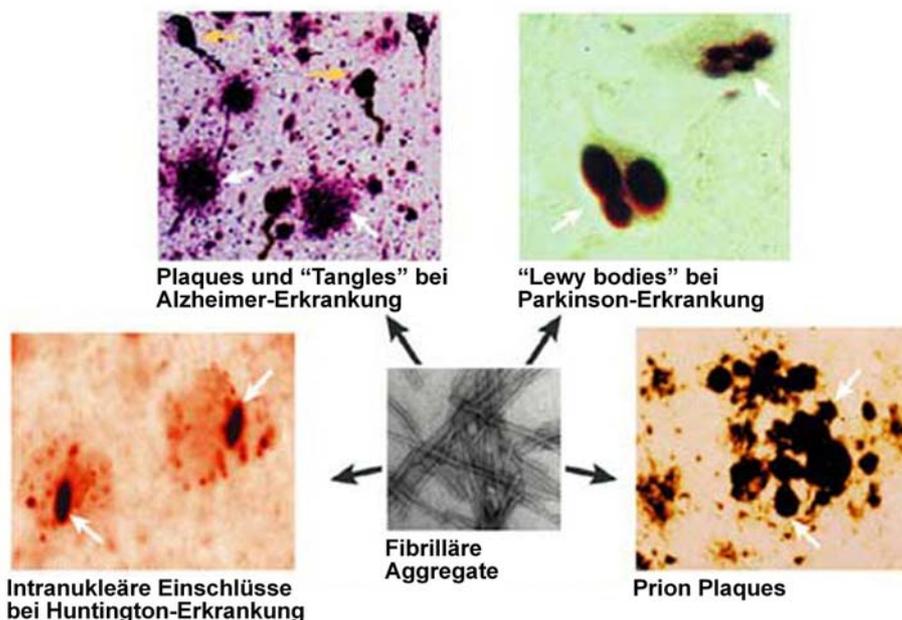


Abbildung 1-1: Proteinaggregation in neurodegenerativen Amyloid-Erkrankungen (verändert nach (Soto, 2003)).

Interessanterweise zeigen amyloide Aggregate ähnliche Strukturen und Eigenschaften, obwohl sie aus sehr unterschiedlichen Proteinen gebildet werden (Sunde et al., 1997; Lansbury, 1999; Horwich, 2002; Kaye et al., 2003; Ross and Poirier, 2004). Darüber hinaus konnte für einige Proteine wie Fibronectin TypeIII-Modul, Acylphosphatase, SH3-Domäne der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase, Myoglobin und Insulin, die nicht in Erkrankungen involviert sind, gezeigt werden, daß sie unter partiell denaturierenden Bedingungen Amyloid bilden können (Litvinovich et al., 1998; Chiti et al., 2001; Guijarro et al., 1998; Fandrich et al., 2001; Jimenez et al., 2002; Rochet and Lansbury, 2000; Dobson, 2001; Dobson, 2004). Auch humanes Ataxin3 mit nur 26 oder 36Q bzw. die Josephin-Domäne alleine (siehe unten) bilden *in vitro* Amyloid bei Erhitzen auf 80-90°C (Marchal et al., 2003; Shehi et al., 2003;

Einleitung

Masino et al., 2004). Es wird daher von einer Eigenschaft des Polypeptidrückgrats und nicht der Seitenketten ausgegangen, die zur Bildung von Amyloid führt. Somit ist die Eigenschaft der Amyloidbildung allen Polypeptiden gemein und nicht nur einigen wenigen pathogenen Proteinen vorbehalten, die Rate und Neigung dazu sind jedoch von der Aminosäuresequenz abhängig (Dobson, 2001).

Amyloide Fibrillogenese sind generell nukleationsabhängig, wobei ein „Nukleus“ (*seed* = Aggregationskeim) als Startmolekül benötigt wird, an dem sich weitere Proteine anlagern können und schließlich eine Fibrille bilden. Typisch für nukleationsabhängige Aggregationen ist eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und eine *Lag*-Phase, die durch Zugabe von zuvor gebildeten Aggregaten (*seeding*) verkürzt werden kann (Scherzinger et al., 1999; Rochet and Lansbury, 2000; Wanker, 2000; Dobson, 2001; Chen et al., 2002a; Chen et al., 2002b; Horwich, 2002; Soto, 2003).

In ersten Struktur-Untersuchungen von polyQ-Fibrillen wurde eine stabile „Reißverschluß“-Struktur (*polar zipper*) aus β -Faltblättern vorgeschlagen (Perutz et al., 1994). Da bei D₂Q₁₅K₂-Aggregaten die Amyloid-typische 4,75 Å -Reflexion in Röntgenbeugungsanalysen gefunden wurde, jedoch keine 10 Å -Reflexion, wurde in einem verfeinerten Modell eine zylindrische, helikal angeordnete β -Faltblatt-Struktur (*circular parallel β -helix*) angenommen, bei der ~20 Glutamine einer Umdrehung der Helix entsprechen (Perutz et al., 2002). Eine einzige Umdrehung sei instabil, 2 Umdrehungen aus ~40Q sollten jedoch ausreichend stabil sein, um als Aggregations-Nukleus zu wirken. Andere Autoren schlugen ebenso vor, daß es sich bei dem polyQ-Nukleus um ein Monomer handeln sollte (Chen et al., 2002b). Neueste Ergebnisse (*molecular dynamics simulations*) untermauern dies und behaupten, daß ein einziges 54Q-Protein bzw. ein Dimer aus zwei 36Q-Proteinen als Aggregationskeim ausreicht (Stork et al., 2005). Dieses Modell geht nicht von einer wassergefüllten zylindrischen parallelen β -Helix-Struktur (Perutz et al., 2002) sondern von einer dreieckigen (*triangular*) parallelen β -Helix aus, die bei einem 54Q-Protein aus 3 kompletten Umdrehungen bestehen soll und nicht wassergefüllt ist (Stork et al., 2005). Andere Autoren beobachteten in ähnlichen Simulationen zylindrische parallele β -Helices, die ebenfalls nicht wassergefüllt sind und aus 18 ± 2 Glutaminen pro Helixumdrehung bestehen (Khare et al., 2005). Die hier vorgestellten Modelle beruhen auf der Annahme, daß die amyloide Fibrillisation ausschließlich auf nicht-kovalenten Bindungen beruht, was kürzlich durch die atomar-aufgelöste Struktur von Fibrillen eines Glutamin-/Asparagin-reichen Sup35-Peptids bestätigt wurde (Nelson et al., 2005). Einige Autoren schlagen jedoch eine polyQ-

Einleitung

Aggregation aufgrund von kovalenten Bindungen vor, die durch das Enzym Transglutaminase katalysiert werden soll (Kahlem et al., 1996; Kahlem et al., 1998; Dedeoglu et al., 2002; Lesort et al., 2003). Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da eine Aggregation von polyQ-Proteinen *in vitro* ohne Zugabe von Transglutaminase stattfindet, und da sich Aggregate aus Zellextrakten mit Ameisensäure auflösen lassen (Hazeki et al., 2000), was auf nicht-kovalente Bindungen hindeutet.

1.1.3 Neuronale Toxizitätsmechanismen

Verschiedene Modelle versuchen die Toxizität der polyQ-Proteine zu erklären. Als Grund für die Neuronenspezifität der Erkrankungen wird eine fehlende Ausdünnung von Proteinablagerungen und beschädigten zellulären Komponenten in diesen post-mitotischen Zellen des menschlichen Körpers angenommen. Experimentell ist die beobachtete polyQ-Toxizität jedoch nicht auf neuronale Säugetierzellen beschränkt, sondern mit vielen anderen Zelltypen in Zellkultur sowie bei Fliegen (Bonini, 1999), Nematoden (Satyal et al., 2000) und sogar Hefe (Meriin et al., 2002) reproduzierbar.

Entgegen der Annahme, Proteinablagerungen seien cytotoxisch und die direkte Ursache der Erkrankungen (Bates, 2003), häufen sich die Hinweise darauf, daß die Aggregation einen Schutzmechanismus der Zellen darstellen könnte, indem toxische polyQ-Monomere und polyQ-Oligomere rekrutiert und damit von anderen Proteinen in der Zelle abgetrennt werden (Klement et al., 1998; Saudou et al., 1998; Sisodia, 1998; Tobin and Signer, 2000; Orr, 2001; Rubinsztein, 2002; Taylor et al., 2002; Soto, 2003; Bowman et al., 2005). Beispielsweise konnte man in einer mikroskopischen Studie, die das Überleben einzelner Zellen analysierte, zeigen, daß das Mortalitätsrisiko der Zellen mit der Menge von diffusem Huntingtin (Htt) korrelierte, jedoch nicht mit der Menge der Htt-Proteinablagerungen (Arrasate et al., 2004). Bei HD-transgenen symptomatischen Mäusen wurde Apoptose im Striatum beobachtet, obwohl die Aggregationsfrequenz dort <1% betrug (Reddy et al., 1998). In anderen Mausmodellen für HD, SCA1 und SCA7 wurde neuronale Dysfunktion zeitlich vor der Bildung von Einschlüssen detektiert, was darauf hindeutet, daß nicht die Aggregate sondern die monomeren Proteine bzw. frühe Aggregationsintermediate die Pathogenese verursachen (Hodgson et al., 1999; Menalled et al., 2002; Watase et al., 2002; Yoo et al., 2003). Darüberhinaus war bei transgenen SCA1-Mäusen in den am stärksten degenerierten Neuronen die Löslichkeit von Ataxin1 am höchsten, und Aggregate wurden erst in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung gebildet (Watase et al., 2002). Ähnlich wurde

Einleitung

apoptotischer Zelltod in Neuronen von Parkinson-Patienten ohne Proteinablagerungen (*Lewy bodies*) nachgewiesen (Tompkins and Hill, 1997). Die extrazelluläre Zugabe von amorphen HypF-N-Aggregaten zu Säugerzellen resultierte in Toxizität, wohingegen Fibrillen keinen negativen Einfluß hatten (Bucciantini et al., 2002). Auch für das extrazelluläre A β -Peptid geht man von einer Toxizität des löslichen Peptids bzw. der frühen Aggregationsintermediate (Oligomere, Protofibrillen) aus (McLean et al., 1999; Lambert et al., 1998; Hartley et al., 1999; Zhu et al., 2000). Obwohl in humanen SCA7- und HD-Gehirnen Einschlüsse in nicht-degenerierten Zellen beobachtet wurden (Ross and Poirier, 2004), wird angenommen, daß Aggregate den Erkrankungsprozeß reflektieren und mit der Pathogenese in Verbindung stehen (Ross et al., 2003). So resultierte die Unterdrückung der Htt-Exon1-Expression bei symptomatischen transgenen HD-Mäusen in einem Verschwinden der Aggregate sowie in einer Verringerung der motorischen Dysfunktion (Yamamoto et al., 2000; Diaz-Hernandez et al., 2004).

Es wird angenommen, daß die Erkrankungen aus hinzugewonnenen, dominierenden toxischen Funktionen (*gain of function*) der fehlgefalteten Proteine resultieren, welche letztendlich aggregieren. Die Fehlfaltungen oder partiellen Entfaltungen werden durch Mutationen in den entsprechenden Proteinen α -Synuclein (Parkinson-Erkrankung), Prion-Protein (Creutzfeldt-Jakob-Erkrankung, Gerstmann-Sträußler-Scheinker-Syndrom, tödliche familiäre Insomnie) Tau (Tauopathien), Transthyretin / Lysozym (systemische Amyloidosen) bzw. durch Verlängerung des polyQ-Bereichs in polyQ-Proteinen hervorgerufen. Diese Krankheiten werden daher auch zu der Gruppe der Fehlfaltungserkrankungen (*conformational diseases, protein folding diseases*) gezählt. Zusätzlich zu den genannten neurodegenerativen Krankheiten zählen auch die zystische Fibrose, Phenylketonurie, α_1 -Antitrypsin-Defizienz und die Sichelzellenanämie zu den Proteinfaltungserkrankungen (Lansbury, 1999; Dobson, 2001; Horwich, 2002; Soto, 2003; Kimura and Kakizuka, 2003; Dobson, 2004).

Die Veränderung der Wechselwirkung dieser fehlgefalteten Proteine mit anderen zellulären Proteinen wird als Ursache der Erkrankungen angenommen. So konnte die Htt-induzierte Neurodegeneration im *Drosophila*-Modell durch Expression eines Htt-bindenden Polypeptids reduziert werden (Kazantsev et al., 2002).

In polyQ-Aggregaten von humanen Gehirnen konnten außer dem jeweiligen polyQ-verlängerten Protein auch andere, nicht pathogene polyQ-Proteine wie Ataxin2, Ataxin3, polyQ-enthaltende Transkriptionsfaktoren wie TBP, CBP sowie molekulare Chaperone, Ubiquitin und Proteasom-Bestandteile identifiziert werden (Paulson et al., 1997b; DiFiglia et

Einleitung

al., 1997; Perez et al., 1998; Chai et al., 1999b; Evert et al., 2000; McCampbell et al., 2000; Uchihara et al., 2001; Zander et al., 2001; Nucifora et al., 2001; Sakahira et al., 2002; Schmidt et al., 2002; Diaz-Hernandez et al., 2004). Zelluläre Komponenten des Proteinfaltungs- und Degradations-/Abbau-Apparats wurden ebenfalls in intrazellulären Einschlüssen bei Parkinson- und Alzheimer-Erkrankten (Tau-Aggregate) gefunden (Sherman and Goldberg, 2001).

Ein Modell geht von einer transkriptionellen Dysregulation durch die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren, die häufig selbst polyQ-Bereiche besitzen, aus (Ross, 2002; Sugars and Rubinsztein, 2003). Zusätzlich zur Inaktivierung durch polyQ-abhängige Koaggregation (Kazantsev et al., 1999; Uchihara et al., 2001; Nucifora et al., 2001; Chai et al., 2002) wird eine direkte Inaktivierung von TBP und Sp1 / TAF_{II}130 durch Interaktion der polyQ-Bereiche in den monomeren Proteinen angenommen (Schaffar et al., 2004; Dunah et al., 2002; Freiman and Tjian, 2002). Für polyQ-verlängertes Htt-Exon1 und Ataxin3 wurde eine Transkriptionshemmung durch Inhibition der Histonacetyltransferase-Aktivität von p300/CBP-associated factor (P/CAF) vorgeschlagen (Steffan et al., 2001; Li et al., 2002). Eine Beeinträchtigung der CRE- (CBP-) vermittelten Transkription wurde gezeigt (Nucifora et al., 2001; Wyttenbach et al., 2001; Sugars et al., 2004). Transgene Mäuse mit polyQ-verlängertem Ataxin1 zeigen eine veränderte Genexpression im Cerebellum (Lin et al., 2000). Ein Vergleich der Expression verschiedener Gene bei transgenen DRPLA- oder HD-Mäusen mittels *Microarray* zeigte übereinstimmend eine verringerte Expression von Neuropeptiden sowie Proteinen, die in Signaltransduktion (Neurotransmitter-Rezeptoren, Wachstumsfaktor-*signalling*) involviert sind (Sugars and Rubinsztein, 2003). In Zellkultur resultierte die Ataxin3-(Q70)-Expression in einer veränderten Genexpression wie z.B. einer verstärkten Transkription von inflammatorischen Genen, wobei Ataxin3-(Q23) selbst eine transkriptionsregulierende Aktivität besitzen soll, die im pathologischen Protein mit verlängertem polyQ-Bereich verändert ist (Evert et al., 2003). Somit findet man bei der SCA3 zusätzlich zum toxischen Funktionsgewinn (*gain of function*) des pathologischen Proteins einen Verlust der normalen Ataxin3-Funktion (*loss of function*), was ebenfalls zur Pathogenese beitragen könnte.

In einem anderen Modell geht man davon aus, daß polyQ-Aggregate nicht durch Proteasomen abgebaut werden können, jedoch zu diesen transportiert werden und sie inaktivieren (Evert et al., 2000; Tobin and Signer, 2000; Ross, 2002; Ross and Poirier, 2004). Verminderter Abbau zellulärer Proteine und somit verringerte regulatorische Funktionen, aber auch die Akkumulation von fehlgefalteten Proteinen, sollen schließlich zu zellulärer Dysfunktion und

Einleitung

Neurodegeneration führen. Die Tatsache, daß man Ubiquitin sowie Bestandteile von Proteasomen in Aggregaten nachweisen konnte (Fujigasaki et al., 2000; Schmidt et al., 1998), spricht für dieses Modell. In Zellkultur konnte eine partielle Inhibition des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch Expression eines 79Q-Proteins (Nishitoh et al., 2002) bzw. durch das Vorhandensein von polyQ- oder CFTR-Aggregaten gezeigt werden (Bence et al., 2001). Andere Autoren schließen jedoch eine Proteasomenhemmung bei transgenen SCA7-Mäusen sogar im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium aus (Bowman et al., 2005). Eine verringerte Proteasom-Aktivität in der Alzheimer-Erkrankung wurde gezeigt (Ding and Keller, 2003). Zusätzlich zur Proteasom-Inhibition wird die Induktion von ER-Streß als Grund der Neurodegeneration vorgeschlagen. ER-Streß wird durch die Akkumulation von ungefalteten Proteinen im Lumen des ER (Endoplasmatisches Retikulum) ausgelöst, was bei einer Inhibition des ER-assoziierten Proteinabbaus (ERAD = ER-assoziierte Degradation) der Fall ist. Genauso wie der Proteasom-Inhibitor MG132 induzierte die 79Q-Expression ER-Streß, was in Aktivierung der IRE1-TRAF2-ASK1-JNK-Signalkaskade und neuronalem Zelltod resultierte (Nishitoh et al., 2002). Eine Rolle von ER-Streß wurde ebenfalls bei der Parkinson- und Alzheimer-Erkrankung, sowie beim Diabetes mellitus postuliert (Katayama et al., 2004; Schroder and Kaufman, 2005).

Zusammenfassend kann man feststellen, daß die hier vorgestellten Modelle, die neuronalen Toxizitätsmechanismen betreffend, sich nicht gegenseitig ausschließen, sondern gemeinsam zur Pathogenese der polyQ-Erkrankungen beitragen könnten.

1.1.4 Eigenschaften des Ataxin3-Proteins

Die Proteinsequenz des in dieser Studie verwendeten Ataxin3 (MJD1) wurde im menschlichen Gehirn identifiziert und besteht bei einem polyQ-Bereich von 22 Glutaminen aus 360 Aminosäuren (Abb.1-2). Der N-Terminus (1-198) bildet eine globuläre Domäne, die Josephin-Domäne genannt wird, und konserviert ist (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana*) ((Albrecht et al., 2003), InterPro/Pfam-Datenbank). Nach Abschluß der hier dargestellten Arbeit wurden NMR-spektroskopische Daten veröffentlicht, welche die atomare Struktur der isolierten Josephin-Domäne aufklärten (Nicastro et al., 2005; Mao et al., 2005). Die Josephin-Domäne besteht aus zwei Subdomänen, die durch eine Spalte voneinander getrennt sind. Sie liegt überwiegend als Monomer vor und hat eine negativ geladene Oberfläche (Nicastro et al., 2005). Die identifizierten α -Helices an den Positionen 14-22, 31-47, 56-62, 78-85 und 147-158 bestätigen die in dieser Arbeit zu

Einleitung

Rate gezogenen, relativ groben Sekundärstrukturvorhersagen (Abb.1-2). Der polyQ-Bereich (296-317) des Proteins liegt im C-Terminus und kommt mit einer Länge von 12-86Q nur beim Mensch vor. Bei anderen Säugetieren wie Maus und Ratte existieren anstelle des polyQ-Bereichs nur 3-6 Glutamine ((Schmitt et al., 1997), Proteindatenbank von www.ncbi.nlm.nih.gov), was ebenfalls für das Huntingtin (Htt)-Protein zutrifft. Ein Vergleich verschiedener Spezies zeigt, daß beim Mensch Proteine mit einer bestimmten polyQ-Länge häufiger vorkommen als bei der Maus, und daß im Laufe der Evolution die maximale polyQ-Länge zunahm (Alba et al., 2001). Experimentelle Daten deuten darauf hin, daß im Gegensatz zur globulären Josephin-Domäne der C-Terminus von Ataxin3 relativ unstrukturiert ist (Masino et al., 2003; Chow et al., 2004). Ein putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) mit der Sequenz RKRR wurde an Position 282-285 gefunden, ebenso wie ein putatives Kernexportsignal (NES) mit der Sequenz ADQLLQMRV an Position 174-183 (Tait et al., 1998; Albrecht et al., 2004).

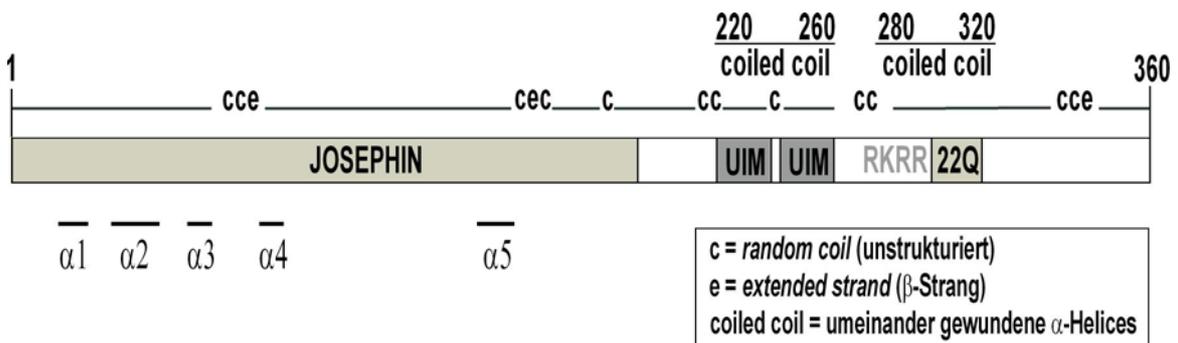


Abbildung 1-2: Aufbau des humanen Wildtyp-Ataxin3-Proteins. Die Josephin-Domäne, beide UIMs (Ubiquitin-Interaktions-Motive), das putative Kernlokalisations-Signal mit der Sequenz RKRR und der polyQ-Bereich mit 22 Glutaminen sind dargestellt. Über dem Balkendiagramm wurden die in Sekundärstrukturvorhersagen als unstrukturierte (c) sowie als β -Strang-ähnliche Regionen (e) gedeuteten Bereiche aufgelistet. Ebenfalls sind die beiden *coiled coil*-Domänen dargestellt. Unter dem Diagramm sind die fünf, mittels NMR identifizierte α -Helices $\alpha 1$ – $\alpha 5$ (Positionen 14-22, 31-47, 56-62, 78-85 und 147-158) der isolierten Josephin-Domäne dargestellt (Nicastro et al., 2005).

Die hier verwendete Ataxin3-Isoform besitzt zwei Ubiquitin-Interaktionsmotive (UIM) (223-240 und 243-260), die zwischen der Josephin-Domäne und dem polyQ-Bereich liegen (Abb.1-2), und die einer von zwei für Ataxin3 vorhergesagten *coiled coil*-Strukturen (superspiralisierte α -Helices) (~ 220 -260) entsprechen (Albrecht et al., 2003; Albrecht et al., 2004). In einer alternativ gespleißten Ataxin3-Isoform existiert zusätzlich eine dritte UIM C-terminal des polyQ-Bereichs (Albrecht et al., 2003). UIMs sind kurze konservierte Sequenzmotive, die in vielen Proteinen vorkommen, welche eine Rolle im Ubiquitynylierungs- und Ubiquitinerkennungssystem spielen. Eine UIM-abhängige Bindung

Einleitung

von Poly-Ubiquitin-Ketten durch Ataxin3 sowie eine Bindung von ubiquitinylierten Proteinen wurde gezeigt (Donaldson et al., 2003; Burnett et al., 2003; Chai et al., 2004; Shoesmith Berke et al., 2005). Die zweite vorhergesagte *coiled coil*-Struktur von Ataxin3 schließt den polyQ-Bereich ein und soll sich an Position ~280-320 befinden (BCM Search Launcher, InterPro, Pole Bioinformatique Lyonnais, siehe Abb.1-2). Ein 3-Helix-Bündel (~173-342) wurde ebenfalls vorgeschlagen, welches mit einer polyQ-Länge bis zu 41Q stabil sein soll (Albrecht et al., 2003). Diese Stabilisierung des polyQ-Bereichs könnte der Grund dafür sein, daß die SCA3-Erkrankung erst bei >61Q ausbricht, im Gegensatz zu den anderen polyQ-Krankheiten, die einen Schwellenwert von etwa 40Q haben. Experimente mit dem anti-polyQ-Antikörper 1C2 deuten auf ein unterschiedliches Ausmaß der Exposition von polyQ-Bereichen in verschiedenen Proteinen hin, was die Unterschiede in den Schwellenwerten der verschiedenen Erkrankungen (Tabelle 1-1) bestimmen könnte (Tanaka et al., 2001).

Ubiquitin ist ein 8 kDa-Protein, welches mit Hilfe von Ubiquitin-aktivierenden Enzymen (E1), Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2) und Ubiquitin-Ligasen (E3) am C-terminalen Glycin kovalent mit Lysin-Resten von Substraten verknüpft wird. Polyubiquitin-Ketten entstehen durch wiederholte Verknüpfungen des zuletzt addierten Ubiquitins mit einem weiteren Ubiquitin. Ubiquitin-Ketten-Assemblierungsfaktoren (E4) sollen für die Bildung von Polyubiquitin-Ketten bestimmter Substrate benötigt werden (Matsumoto et al., 2004). Die Poly-Ubiquitinylierung genannte posttranslationale Modifikation dient u.a. der Erkennung der Substrate, die abgebaut werden sollen, durch die Proteasom-Degradationsmaschinerie. Das Anhängen eines einzelnen Ubiquitins jedoch dient als Signal für Endocytose oder gezielten Proteintransport (*protein sorting, membrane trafficking*). Deubiquitinylierende Enzyme katalysieren das Entfernen von Ubiquitin von Ubiquitin-Protein-Konjugaten oder Polyubiquitin-Ketten (Kim et al., 2003a). Mittels Bioinformatik wurde Ataxin3 als Cysteinprotease mit Papainfaltung und deubiquitinylierender Aktivität vorausgesagt (Scheel et al., 2003), was experimentell bestätigt werden konnte (Burnett et al., 2003; Nicastro et al., 2005). Ataxin3 weist geringe Homologien zu Mitgliedern der UCH (*Ubiquitin C-terminal hydrolase*)- und UBP (*Ubiquitin-specific processing protease*)-Familien auf (Burnett et al., 2003), die katalytische Triade aus Cystein (C14), Histidin (H119), Aspartat/Asparagin (N134) sowie weitere Aminosäuren sind jedoch konserviert (Scheel et al., 2003; Burnett et al., 2003). Die Reste C14, H119 und N134 befinden sich in der Helix α_1 bzw. in den β -Faltblättern β_3 und β_4 (Nicastro et al., 2005; Mao et al., 2005). Zusätzlich zur Tatsache, daß diese drei Aminosäuren konserviert sind, weist deren räumliche Nähe in der NMR-Struktur der Josephin-Domäne auf deren katalytische Funktion hin (Mao et al., 2005). Burnett und

Einleitung

Kollegen zeigten, daß die Aminosäure Cys14 essenziell für die deubiquitylierende Aktivität von Ataxin3 *in vitro* ist (Burnett et al., 2003) und lieferten außerdem Hinweise darauf, daß Ataxin3 inklusive Cys14 und UIMs für die Bildung von Aggresomen aus mutiertem CFTR (Transmembranprotein, Modell-ERAD-Substrat) *in vivo* benötigt wird (Burnett and Pittman, 2005). Bei *Drosophila melanogaster* konnte gezeigt werden, daß Ataxin3 die polyQ-induzierte Aggregation verzögerte und die Neurodegeneration des Fliegenauges hemmte, was von der zellulären Proteasomaktivität und vom Vorhandensein des katalytischen Cys14 und den UIMs abhängig war (Warrick et al., 2005).

In einem *Yeast Two-Hybrid Screen* wurde eine Interaktion von Ataxin3 mit humanem HHR23A und HHR23B, Homologe von RAD23 aus Hefe, gezeigt. Diese Interaktion findet zwischen der Josephin-Domäne und der N-terminalen UBL-Domäne (*Ubiquitin-like*) von HHR23A/B statt (Wang et al., 2000; Nicastro et al., 2005). Ein weiterer Interaktionspartner von Ataxin3 in Säugetierzell-Extrakten ist p97, welches auch VCP (*valosin-containing protein*) genannt wird, und dessen Hefehomolog CDC48 ist (Hirabayashi et al., 2001; Doss-Pepe et al., 2003; Matsumoto et al., 2004). Das AAA-(*ATPases associated with various cellular activities*) Protein p97 soll, wie Ataxin3, an der Bildung von Aggresomen beteiligt sein (Wojcik et al., 2004). RAD23 und p97 assoziieren, wie Ataxin3 (Doss-Pepe et al., 2003), mit dem Proteasom und mit polyubiquitylierten Substraten. Es wird ihnen eine Rolle im Ubiquitin-Proteasom-System und im ER-assoziierten Degradationssystem (ERAD) zugesprochen (van Laar et al., 2002; Woodman, 2003; Dreveny et al., 2004; Wang et al., 2004). Die Vermutung liegt nahe, daß Ataxin3 ebenfalls in Prozesse des Ubiquitin-Proteasom-Systems und in ERAD involviert sein könnte. Ataxin3 als Ubiquitin-Protease könnte Substrate partiell deubiquitylieren und so deren proteasomalen Abbau verhindern.

1.2 Molekulare Chaperone und deren Einfluß auf amyloide Erkrankungen

1.2.1 Aufgaben der molekularen Chaperone in der Zelle

Proteine müssen, um biologisch aktiv zu sein, in eine bestimmte 3-dimensionale Struktur gefaltet werden. Theoretisch können sie eine Vielzahl von Konformationen annehmen, generell entspricht jedoch nur eine von ihnen dem nativen Zustand des Proteins. Die nötige Information zum Erreichen des nativen Zustands ist in der Aminosäuresequenz selbst kodiert. Trotzdem ist die Faltung größerer Proteine mit mehreren Domänen ineffizient, und die Proteine bilden teilweise oder vollständig fehlgefaltete Zustände aus, die aggregieren können.

Einleitung

Falschfaltung resultiert aus Exposition und Interaktion von hydrophoben und unstrukturierten Bereichen der Polypeptidkette, die normalerweise innerhalb des Proteins verborgen liegen. Von hydrophoben Wechselwirkungen und Wasserstoff-Brücken-Bindungen angetrieben, assoziieren die Proteine und bilden ungeordnete Aggregate. Die zelluläre Maschinerie der molekularen Chaperone (franz.= Anstandsdamen) wirkt der Aggregationstendenz von nicht-nativen Proteinen sowohl während der Proteinneusynthese als auch während zellulärer Streßbedingungen (oxidativer Streß / erhöhte Temperatur, deshalb „Hitzeschockproteine“), die in Entfaltung von Proteinen resultieren, entgegen. Chaperone unterstützen den Faltungsprozeß oft durch wiederholtes Binden und Freilassen der Substrate, was durch ATPase-Aktivität und verschiedene Kofaktoren reguliert wird. Generell erkennen Chaperone hydrophobe Aminosäureseitenketten und / oder unstrukturierte Regionen, die eine Eigenschaft von nicht-nativen Proteinen sind. Verschiedene Chaperon-Proteine kooperieren miteinander in lebenden Zellen und sind zusätzlich zur Proteinneufaltung und -rückfaltung in zellulären Prozessen wie Oligomer-Assemblierung, Transport zu bestimmten zellulären Kompartimenten (*targeting*, *trafficking*), Sekretion, Degradation (Abbau) und Signaltransduktion involviert (Reviews: (Hartl, 1996; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Barral et al., 2004)).

Die Chaperonine sind zylindrische Komplexe, die einen zentralen Hohlraum besitzen, welcher nach Einschließen des Substratproteins zu dessen Faltung beiträgt. Am besten charakterisiert ist das Gruppe I-Chaperonin GroEL (Hsp60) mit seinem Kofaktor GroES (Hsp10) von *Escherichia coli*. GroEL bildet einen homooligomeren Doppelring aus 7 Untereinheiten pro Ring. GroES ist ein einzelner heptamer Ring aus ~10 kDa-Untereinheiten und stellt einen Deckel auf dem Kreiszyylinder dar. Die GroES-Bindung resultiert in Konformationsänderungen des GroEL, was hydrophobe Wechselwirkungen des GroEL mit dem Substrat innerhalb des zentralen Hohlraums unterbindet und somit die Faltung des Substrats begünstigt. Nach Hydrolyse von 7 ATP-Molekülen im cis-Ring werden 7 ATP am trans-Ring gebunden, was die Öffnung des cis-Rings und dadurch die Freilassung des Substrats verursacht. Zur Gruppe II der Chaperonine zählen das eukaryotische TriC (TCP-1 *ring complex*), auch CCT genannt (*Chaperonin containing TCP-1*), und das bei Archaea vorkommende Thermosom, die beide keinen GroES-ähnlichen Kofaktor benötigen. Die wichtigsten TriC-Substrate sind die Cytoskelettproteine Aktin und Tubulin.

Die Hsp70-Chaperone spielen eine Rolle bei der Stabilisierung von nicht-nativen Polypeptidketten (während Proteinneusynthese, Streßbedingungen), während *Protein targeting*, bei Membrantranslokationen sowie während des Proteinabbaus. Im Cytosol höherer

Einleitung

Eukaryoten existieren Streß-induzierbare Hsp70-Proteine (*heat shock protein* von ~70 kDa = Hsp72) sowie homologe Formen, die konstitutiv exprimiert werden (Hsc70 = Hsc73). Es bestehen desweiteren verschiedene Kofaktoren, z.B. die Hsp40-Proteine. Am besten untersucht ist das Hsp70-Homolog DnaK aus *E. coli* mit seinem Hsp40-Kofaktor DnaJ, welcher die ATP-Hydrolyse durch DnaK beschleunigt und somit zur Stabilisierung des Chaperon-Substrat-Komplexes im ADP-Zustand beiträgt. Der Nukleotidaustauschfaktor GrpE induziert die Dissoziation des ADP von DnaK, was zu erneuter ATP-Bindung und Substratfreilassung führt. Alle Hsp40-Proteine besitzen wie DnaJ eine sogenannte J-Domäne, die mit Hsp70 interagiert. Die meisten Hsp40-Proteine können Substrate binden und an Hsp70 weiterreichen. Einige der Hsp40-Proteine wirken nur als Kofaktoren für Hsp70 (humanes Hdj1), andere zeigen jedoch wie DnaJ aus *E. coli* eine eigene Chaperonaktivität (Ydj1 aus *S. cerevisiae*, humanes Hdj2), die abhängig vom Vorkommen einer Glycin-/Phenylalanin-reichen Region und einer Cystein-reichen Zink-Finger-Domäne ist. Hsp40-Chaperone sollen neben der Proteinfaltung am Proteinabbau via Ubiquitin-Proteasom-System, an Exo-/ Endocytose und an Hsp90-vermittelter Signaltransduktion beteiligt sein (Reviews: (Hartl, 1996; Cheetham and Caplan, 1998; Hartl and Hayer-Hartl, 2002; Barral et al., 2004)). Hsp90-Chaperone sind Homodimere und besitzen unter nicht-Streß-Bedingungen bestimmte Substrate wie z.B. Steroid-Hormonrezeptoren, protoonkogene Kinasen, Zellzyklusregulatoren und andere Signaltransduktionsproteine. Substrattransfer zwischen Hsc70 und Hsp90 erfolgt mittels *Tetratricopeptide repeat* (TPR)-Domänen enthaltenden Proteinen. Das Kochaperon CHIP soll mittels TPR-Domäne mit Hsc/Hsp70 und Hsp90 interagieren, deren Substrate mittels Ubiquitin-Ligase-Domäne ubiquitinylieren, und sie so zum proteasomalen Abbau markieren, was eine Verbindung zwischen Chaperon-assistierter Proteinfaltung und proteasomaler Proteindegradation, den beiden Hauptkomponenten der Proteinqualitätskontrolle im Cytoplasma, darstellt (Reviews: (Young et al., 2001; Young et al., 2003; Murata et al., 2003; McDonough and Patterson, 2003)).

Ein Mitglied der Hsp100/Clp-Familie von AAA-(*ATPases associated with various cellular activities*) Proteinen ist das zylinderförmige hexamere Hsp104-Chaperon in *Saccharomyces cerevisiae*, welches die Fähigkeit besitzt, Proteine zu entfalten, aber auch Proteinaggregate aufzulösen (Disaggregation) (Parsell et al., 1994; Shorter and Lindquist, 2004). Ein weiteres AAA-Protein ist das zylinderförmige Homohexamer p97 / VCP (siehe 1.1.4), welches zusammen mit verschiedenen Kofaktoren eine Rolle bei Membranfusionen, bei Transkriptionsaktivierung und Replikation, im Ubiquitin-Proteasom-System und im ER-

Einleitung

assozierten Degradationssystem (ERAD) spielt (Reviews: (Wang et al., 2004; Dreveny et al., 2004; Woodman, 2003)).

Im Endoplasmatischen Retikulum (ER) existieren eine Vielzahl von Chaperonen, die an der Faltung, Disulfidbrückenbildung, Reifung von Glykoproteinen und Oligomerisierung von sekretorischen sowie Membranproteinen beteiligt sind. Eine Qualitätskontrolle (*ER quality control*) stellt sicher, daß nur korrekt gefaltete und assemblierte Proteine aus dem ER exportiert werden. Fehlgefaltete Proteine und inkomplette Oligomere werden im ER erkannt und mittels Retrotranslokation ins Cytoplasma zurückbefördert, wo sie nach Ubiquitinylierung durch Proteasomen abgebaut werden (ERAD = ER-assozierte Degradation). Außer Hsp70 (BiP) und Hsp90 (GRP94)-Chaperonen sollen an ERAD-Prozessen die bereits erwähnten Proteine p97 / VCP und RAD23 / HHR23 beteiligt sein (siehe 1.1.4).

1.2.2 Modulation der polyQ-Aggregation und Toxizität durch molekulare Chaperone

Einige Chaperone modulieren die polyQ-Aggregation und unterdrücken dessen Toxizität. Dies deutet darauf hin, daß ein Ungleichgewicht zwischen neuronaler Chaperon-Kapazität, Proteinabbau und der Produktion von potentiell gefährlichen polyQ-Proteinen den Beginn der Erkrankungen auslösen könnte (Reviews: (Sakahira et al., 2002; Kimura and Kakizuka, 2003; Barral et al., 2004)). Eine Kolokalisation von molekularen Chaperonen mit polyQ-Aggregaten in humanen Gehirnen konnte gezeigt werden (Chai et al., 1999b; Schmidt et al., 2002), allerdings belegen Experimente mit FLIP- und FRAP-Technik (*fluorescence loss in photobleaching, fluorescence recovery after photobleaching*) an lebenden Zellen, daß Chaperone nicht in polyQ-Aggregate hineingezogen werden, sondern überwiegend transient mit ihnen interagieren (Kim et al., 2002). Die Interaktion von molekularen Chaperonen sowie die Kolokalisation von Proteasom-Bestandteilen mit zellulären Einschlüssen belegt, daß es sich bei den polyQ-Erkrankungen um Fehlfaltungserkrankungen (*conformational diseases, protein folding diseases*) handelt.

Eine Inhibition der Huntingtin (Htt)-Exon1-Aggregation wurde *in vitro* mit gereinigten Hsp70/40-Chaperonen beobachtet (Muchowski et al., 2000). Die Überexpression von Ssa1/Ydj1 (Hsp70/40-Hefehomologe) verringerte die SDS-resistente Htt-Aggregation in *S. cerevisiae* (Muchowski et al., 2000). Hsp70/40-Überexpression verminderte die polyQ-induzierte Toxizität in einem Hefemodell (Schaffar et al., 2004). Die Überexpression von

Einleitung

Hsp70 und / oder Hsp40 (humanes Hdj1/2) hemmte die Aggregation von Ataxin1, Ataxin3, AR und Htt in COS-7, PC-12, HeLa und Neuroblastoma-Zellen (Cummings et al., 1998; Chai et al., 1999a; Stenoien et al., 1999; Jana et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Bailey et al., 2002). Eine Induktion der Hitzeschockantwort (*heat shock response*) durch Geldanamycin inhibierte die polyQ-Aggregation in COS-1-Zellen genauso wie eine Hsp70/Hdj1-Überexpression (Sittler et al., 2001). Die Hsp70/90-Induktion durch Geldanamycin verringerte ebenfalls die Fibrillisation von mutiertem Tau-Protein in Zellkultur, wohingegen die Hsp70/90-Reduktion durch *siRNA* (*small interfering RNA*) die Tau-Aggregation verstärkte (Dou et al., 2003). Die Expression von konstitutiv aktiven Mutanten des Hitzeschock-Transkriptionsfaktors HSF1 resultierte in partieller Reduktion der Ataxin1-Aggregation in HeLa-Zellen (Rimoldi et al., 2001).

Hsp70/40-Überexpression verringerte die polyQ-Neurotoxizität in *Drosophila melanogaster* (Warrick et al., 1999; Chan et al., 2000; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000) sowie bei transgenen SCA1-Mäusen (Cummings et al., 2001). Die *Drosophila*-Homologe dHdj1, dTPR2 und dHsp70 konnten als aktive Komponenten identifiziert werden (Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000; Fernandez-Funez et al., 2000). Die Expression einer dominant-negativen dHsp70-Mutante erhöhte die Toxizität (Warrick et al., 1999). Die Überexpression von Hsp70 konnte ebenfalls die von α -Synuclein induzierte Toxizität in einem *Drosophila*-Modell der Parkinson-Erkrankung reduzieren (Bonini, 2002; Auluck et al., 2002).

Interessanterweise resultierte sowohl die Überexpression als auch die Deletion von Hsp104 in einer Reduktion der polyQ-Aggregation in Hefe (Krobitsch and Lindquist, 2000; Meriin et al., 2002; Kimura et al., 2001). Dies entspricht den Effekten auf das Glutamin/Asparagin-reiche Hefe-Prion Sup35, wobei Überexpression oder Deletion von Hsp104 den [PSI⁺]-Prionzustand eliminiert (Lindquist, 1997; Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996). In *Caenorhabditis elegans* verminderte die Koexpression von Hsp104 die Q82-GFP-Aggregation und die polyQ-induzierte Entwicklungsverzögerung (Satyal et al., 2000).

Zusätzlich zu den bisher erwähnten direkten Chaperon-Effekten wie Modulation der polyQ-Aggregation und Unterdrückung der polyQ-Toxizität ist ein indirekter Effekt der molekularen Chaperone möglich, der in einer Verringerung von Zelltod und Neurodegeneration resultieren könnte. Hsp70 soll z.B. die Ausbildung von Apoptosomen verhindern (Beere et al., 2000), die Aktivierung von Caspase-3 und -9 inhibieren (Mosser et al., 2000) und die JNK-Aktivierung verringern (Volloch et al., 1998), die zu programmiertem Zelltod führen.

1.3 Proteolytische Spaltung der pathogenen Proteine als Krankheitsauslöser

1.3.1 Proteolyse von pathologischen Proteinen im menschlichen Gehirn

Für die Alzheimer-Erkrankung ist bekannt, daß das membrangebundene Volllängenprotein namens Amyloid-Vorläuferprotein (*Amyloid Precursor Protein* =APP) durch die β - und γ -Sekretasen genannten Proteasen geschnitten werden muß, um aggregationskompetentes A β -Peptid (maximal 42 Aminosäuren) zu generieren (Review: (Haass, 2004)). Familiäre Formen der Alzheimer-Erkrankung weisen Mutationen in APP oder Presenilin-1/-2 (γ -Sekretase) auf, die zu einer um 2 Aminosäuren-verschobenen Spaltung des APP und verstärkter Aggregation führen. Für die amyloiden Erkrankungen *Familial British Dementia* und *Aortic Medial Amyloid* sollen das ABri-Peptid (34 Aminosäuren) bzw. das Medin-Peptid (50 Aminosäuren) verantwortlich sein, wobei bei letzterem die proteolytische Spaltung in einer Exposition von normalerweise verborgenen β -Strängen resultieren soll (Review: (Rochet and Lansbury, 2000)).

Neuronale Proteinablagerungen in humanen HD-Gehirnen konnten ausschließlich mit einem Antikörper gegen den N-Terminus des 350 kDa-Htt-Proteins detektiert werden, nicht jedoch mit einem Antikörper gegen den Bereich 585-725 (DiFiglia et al., 1997). Aggregate in SBMA-Gehirnen wurden ebenso nur mit Antikörpern gegen N-terminale Epitope des AR nachgewiesen (Li et al., 1998). Da sich in Htt und AR der polyQ-Bereich im N-Terminus befindet, deutet dies auf eine Aggregation von polyQ-enthaltenden Fragmenten hin. Intranukleäre Einschlüsse in humanen SCA3-Gehirnen konnten nur schlecht mit einem Antikörper gegen einen internen Bereich des Ataxin3, gut jedoch mit einem Antikörper gegen den C-Terminus, in dem sich der polyQ-Bereich befindet, detektiert werden (Schmidt et al., 1998). Diese Daten sprechen dafür, daß die Volllängenproteine nicht aggregationskompetent sind, sondern die durch proteolytische Spaltung entstehenden polyQ-Fragmente aggregieren. Es wird angenommen, daß die Konformationsänderungen zur Ausbildung einer „cross-beta“-Struktur im Volllängenprotein nicht stattfinden und daher kein Nukleus als Startpunkt der Aggregation gebildet werden kann (siehe 1.1.2). Experimente mit Htt-Exon1 zeigten, daß die Abspaltung des Fusionspartners GST von Htt (siehe 3.1.1) zu einer Konformationsänderung des Htt-Exon1 führte (intramolekulare FRET-Analysen), welches mit zeitlicher Verzögerung aggregierte (intermolekularer FRET) (Schaffar et al., 2004). In diesen Experimenten übernahm der Fusionspartner GST die Rolle der N- bzw. C-terminalen Sequenz im polyQ-Volllängenprotein und mußte durch Proteolyse entfernt werden, um Aggregation zu ermöglichen. Es wird demnach angenommen, daß die proteolytische Spaltung der

Einleitung

Volllängenproteine zu Fragmenten führt, die polyQ-Bereiche mit veränderter Konformation enthalten. Diese Fragmente initiieren den Aggregationsprozeß, welcher mit der Bildung von Proteinablagerungen und neuronaler Dysfunktion (Toxizität) assoziiert ist. Da also die proteolytische Spaltung eine Voraussetzung für Toxizität ist, spricht man von der *toxic fragment*-Hypothese (Rubinsztein, 2002; Tobin and Signer, 2000; Wanker, 2000; Ross, 2002; Ross and Poirier, 2004; Ferrigno and Silver, 2000). Wie in Abschnitt 1.1.3 dargestellt geht ein Modell zur Erklärung der polyQ-Pathogenese von einer veränderten Wechselwirkung der fehlgefalteten polyQ-Proteine mit Transkriptionsfaktoren aus. Dies konnte mit Hilfe eines Luciferase-Reporter-Experiments in primären Neuronen gezeigt werden, wo nur mit einem Fragment des Atrophin1, nicht jedoch mit dem Volllängenprotein, die CBP-abhängige Transkription inhibiert wurde (Nucifora et al., 2001).

In Western Blot Analysen mit humanem HD- bzw. SCA3-Gehirnmaterial konnten tatsächlich N-terminale Htt-Fragmente von etwa 40-50 kDa bzw. Ataxin3-Fragmente von etwa 35 kDa identifiziert werden, die in Gehirnen gesunder Personen nicht vorkamen und demnach von mutiertem Htt bzw. Ataxin3 stammen sollten (DiFiglia et al., 1997; Tobin and Signer, 2000; Mende-Mueller et al., 2001; Sun et al., 2002; Toneff et al., 2002; Goti et al., 2004). Western Blot Analysen mit humanem SCA7-Gehirnmaterial detektierten polyQ-enthaltende 55 kDa-Fragmente, die nicht in Gehirnen einer Kontrollgruppe auftraten und daher wahrscheinlich vom pathogenen Ataxin7 stammen (Garden et al., 2002).

1.3.2 Fragmentierung von polyQ-Proteinen bei transgenen Mäusen und in Zellkultur

Für HD existieren mehrere transgene Mausmodelle, die verschiedene Fragmente bzw. das Htt-Volllängenprotein unterschiedlich stark exprimieren (Lin et al., 1999; Rubinsztein, 2002; Sugars and Rubinsztein, 2003). Bei der Linie R6/2 und bei 150Q-HD-*knock-in*-Mäusen findet man ein Expressionsniveau des Transgens, das dem Niveau des endogenen Htt entspricht. Bei den R6/2-Mäusen, die das Htt-Fragment Exon1 mit 140Q exprimieren, wurden nukleäre Einschlüsse in den meisten Gehirnregionen sowie ein ausgeprägter Phänotyp mit Bewegungsstörungen (Chorea), Tremor, epileptischen Anfällen, Gewichtsverlust und vorzeitigem Tod im Alter von 10-13 Wochen beobachtet (Mangiarini et al., 1996; Cha et al., 1998). Bei HD-*knock-in*-Mäusen, bei denen das endogene Maus-Htt-Gen mit einem verlängerten polyQ-Bereich (150Q) versehen wurde, wurden nukleäre Einschlüsse sowie Verhaltensabnormalitäten, motorische Störungen und Gliosis, jedoch kein früherer Tod

Einleitung

detektiert (Lin et al., 2001). Diese Daten zeigen, daß bei einer bestimmten polyQ-Länge dessen Vorkommen in einem kleinen Protein toxischer ist als in einem größeren Sequenzkontext, und bekräftigen somit die *toxic fragment*-Hypothese (siehe 1.3.1).

Ein nukleäres N-terminales 43 kDa-Fragment konnte bei Htt-Volllängenprotein-exprimierenden HD-*knock-in*-Mäusen mit 72-80Q (Shelbourne et al., 1999) aus dem Striatum isoliert werden (Li et al., 2000). Entsprechend wurden polyQ-enthaltende 70-80 kDa-Fragmente in kortikalen Gehirnllysaten von Htt-150Q-*knock-in*-Mäusen identifiziert (Gafni et al., 2004). Bei YAC-Htt-72Q-Mäusen (YAC = *Yeast Artificial Chromosome*) konnten polyQ-enthaltende Fragmente (90 kDa) bereits in einem Alter von 2 Monaten detektiert werden, wohingegen Neurodegeneration erst im 6. Monat auftrat (Wellington et al., 2002). Die Htt-Spaltung fand demnach zeitlich vor der Entstehung von Verhaltens- und neuropathologischen Veränderungen statt, was darauf hindeutet, daß die Fragmentierung eine Voraussetzung für die Pathogenese sein könnte.

In Zellkultur wurden Fragmente von überexprimiertem Huntingtin (Htt) unabhängig von dessen polyQ-Länge detektiert, was zeigt, daß auch das Wildtyp-Protein proteolytisch gespalten wird (Kim et al., 1999; Sun et al., 2002). Aggregation wurde bei der transienten Expression von Htt-Volllängenprotein mit pathologischem polyQ nicht beobachtet, jedoch bei Expression von N-terminalen Htt-Fragmenten (Cooper et al., 1998). Beim humanen AR-Volllängenprotein (50Q) entsprach eine Hemmung der proteolytischen Spaltung einer Inhibition der Aggregation, was wie bei Htt für eine Abhängigkeit der Aggregation von der Proteolyse spricht (Ellerby et al., 1999a). Darüberhinaus führte die Expression eines AR-Fragments (65Q), nicht jedoch die des AR-Volllängenproteins, zu einer Störung der Streß-Antwort (Cowan et al., 2003) und unterstützt daher die *toxic fragment*-Hypothese.

Daten von transgenen SCA3-Mäusen deuten - ähnlich wie bei HD-Mäusen - darauf hin, daß die Proteolyse des pathogenen polyQ-Volllängenproteins eine Voraussetzung für die Ausbildung von Toxizität ist. Transgene Mäuse, die das C-terminale Ataxin3-Fragment 290cQ79 unter einem Purkinjezell-spezifischen Promotor exprimierten, zeigten im Alter von 4 Wochen ataktische Haltung, Gangstörungen (breitbeinig) und häufiges Umfallen (Ikeda et al., 1996). Transgene Mäuse für das Volllängenprotein (Q79) oder für das Fragment mit normaler polyQ-Länge (290cQ35) zeigten keinerlei Erkrankungsmerkmale bis zum Alter von 23 - 32 Wochen (Ikeda et al., 1996). In einem anderen Mausmodell wurde eine ubiquitäre Expression von humanem Volllängen-MJD1-Gen unter Kontrolle seiner eigenen regulatorischen Elemente in Form von YAC-Konstrukten benutzt (Cemal et al., 2002). Im Gegensatz zu MJD1-Q15 entwickelten die MJD1-Q76/Q84-Mäuse einen breiteren Gang,

Einleitung

tieferer Beckenhaltung, Tremor, *limb clasp* (Zusammenschlagen der Beine bei Hochheben am Schwanz), jedoch keinen vorzeitigen Tod. Neuronaler Zellverlust und intranukleäre Einschlüsse wurden detektiert, Ataxin3-Fragmente jedoch nicht (Cemal et al., 2002). In einem dritten Mausmodell, in dem Volllängen-Ataxin3 (Q71) mittels Prion-Promotor exprimiert wurde, wurde ein Phänotyp ab einem Alter von 2 - 8 Monaten mit Tremor, abnormer Körperhaltung / Gang (Buckel, klammernde Pfoten, erniedrigtes Becken), Ataxie, Epilepsie, Gewichtsverlust und vorzeitigem Tod beobachtet (Goti et al., 2004). Kontrolltiere mit 20Q aber auch einige heterozygote Q71-Linien waren selbst mit einem Alter von 15 Monaten identisch zum Wildtyp. Intranukleäre Einschlüsse wurden in Gehirn und Rückenmark von kranken Q71-Mäusen gefunden. Bei gesunden Q71-Heterozygoten zeigte eine Linie keine Einschlüsse, während sie bei einer anderen Linie in einem Alter von 13 Monaten auftraten. Es konnte ein nukleäres polyQ-Fragment von 36 kDa identifiziert werden, das mit Antikörpern gegen die Ataxin3-Epitope 221-224 und 320-334 detektiert wurde, nicht jedoch mit Antikörpern gegen 202-219. Eine Protease-Schnittstelle liegt demnach vermutlich im Ataxin3-Protein bei Position ~220. Das spezifische Vorkommen von 36 kDa-Fragmenten und Aggregaten im Gehirn (jedoch nicht in anderen Geweben) und bei kranken Tieren (selten bei gesunden Q71-Mäusen) deutet darauf hin, daß die Pathogenese tatsächlich von der Ataxin3-Proteolyse abhängt. Vom Volllängenprotein, welches in Muskel, Herz und Gonaden detektiert wurde, ging kein toxischer Effekt aus (Goti et al., 2004).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die bisher erwähnten Daten wie die Detektion von polyQ-Fragmenten in Gehirnen von Patienten, bei transgenen Mäusen und in Zellkultur sowie die Korrelation der Fragmentierung mit der Pathogenese die *toxic fragment*-Hypothese unterstützen. Die verantwortliche(n) Protease(n) wurden bisher nicht identifiziert.

1.3.3 Involvierung von Caspasen in der Spaltung

Da für polyQ-Proteine die Induktion von Apoptose angenommen wird (Ikeda et al., 1996; Paulson et al., 1997b; Miyashita et al., 1999; Ona et al., 1999; Sanchez et al., 1999; Chen et al., 2000; Zander et al., 2001; Soto, 2003; Tsai et al., 2004), wird eine Rolle von apoptotischen Proteasen, den Caspasen, in der Proteolyse von polyQ-Proteinen diskutiert (Evert et al., 2000; Zoghbi and Orr, 1999; Paulson et al., 2000; Tarlac and Storey, 2003).

Der programmierte Zelltod (Apoptose, Zellselbstmord) ist ein aktiver Prozeß, der letztendlich in einer Phagozytose der toten Zellen durch benachbarte Zellen oder Makrophagen resultiert und keine entzündlichen Reaktionen nach sich zieht. Im Gegensatz dazu steht der Prozeß der

Einleitung

Nekrose, der passiv ist und zur Lyse der Zellen sowie zu Inflammation führt. Früher ging man von verschiedenen Initiationsmechanismen der beiden Prozesse aus, heute weiß man jedoch, daß z.B. oxidativer Streß in Abhängigkeit von der Dosis beide Prozesse auslösen kann (Brunk et al., 2001). Apoptotische Zellen sind durch Zellschrumpfung, cytoplasmatische Vakuolen, Plasma- / Kernmembranblasen, Chromatinkondensation und Kernfragmentierung charakterisiert. Eine entscheidende Rolle in der Apoptose spielen die Caspasen. Diese Cysteinproteasen werden in einer Proform exprimiert und durch Abspaltung der Pro-Sequenz aktiviert. Eine Kaskade von verschiedenen Caspasen, die sich gegenseitig aktivieren (*upstream activators / initiators*), führt letztendlich (*executioner caspases*) zur Zerstörung der DNS und des Cytoskeletts. Die Aktivierung dieser Kaskade geschieht generell über einen Rezeptorvermittelten oder mitochondrialen Weg, wobei Caspase-8 bzw. die Freisetzung von CytochromC aus den Mitochondrien und Caspase-9 eine zentrale Rolle spielen. Substratproteine einschließlich der Caspasen selbst werden anhand von Tetrapeptid-Konsensussequenzen erkannt und hinter einem Aspartat geschnitten, weshalb man ihnen den Namen C(ystein)ASPasen gab (Reviews: (Zimmermann et al., 2001; Zimmermann and Green, 2001; Stennicke and Salvesen, 2000)).

Eine Spaltung von *in vitro*-translatiertem Htt, Atrophin1 und AR mit gereinigten Caspasen wurde nachgewiesen (Wellington et al., 1998; Gafni and Ellerby, 2002). Htt(1-969)-exprimierende X57-Zellen zeigten Fragmente, die in MCF-7 (Δ Caspase-3)-Zellen nicht auftraten (Kim et al., 2001). Behandlung von Htt-exprimierenden X57-Zellen, differenzierten SH-SY5Y-Zellen oder primären Neuronen mit den Caspase-Inhibitoren Z-DEVD-FMK / Ac-DEVD-CHO reduzierte die Anzahl von zellulären Einschlußkörperchen bzw. die Anzahl apoptotischer Zellen, genauso wie die Koexpression des antiapoptotischen Faktors BclX_L (Kim et al., 1999; Saudou et al., 1998; De Pril et al., 2004). Staurosporin-Behandlung von COS-7-Zellen resultierte in Fragmentierung von endogenem und überexprimiertem humanen Ataxin3 und wurde mit dem Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK unterdrückt (Berke et al., 2004). Die Mutation der Caspase-Schnittstelle D109 in Atrophin1 verhinderte dessen proteolytische Spaltung (Ellerby et al., 1999a). Die Mutation der Caspase-Schnittstelle D146 im AR (Q50) reduzierte dessen Aggregation in Tamoxifen-behandelten HEK293T-Zellen und verringerte die Anzahl apoptotischer Zellen (Ellerby et al., 1999b). Ein Antikörper, der nur mit an Position 552 geschnittenem Htt reagiert, detektierte Htt552-Fragmente in humanen HD- und Kontrollgruppen-Gehirnen, was auf eine Caspase-Spaltung des Htt hindeutet (Wellington et al., 2002).

1.3.4 Mögliche Rolle von Calpainen als polyQ-Protein schneidende Proteasen

Neben Caspasen werden auch Calpaine als mögliche polyQ-prozessierende Proteasen in der Literatur diskutiert (Tarlac and Storey, 2003). Calpaine sind eine Familie von Calcium-abhängigen, ATP-unabhängigen Cysteinproteasen, die verschiedene Cytoskelett-, membranassoziierte und regulatorische Proteine schneiden. Bis jetzt sind über 100 Calpain-Schnittstellen in verschiedenen Substraten bekannt, die jedoch zu keiner Konsensus-Sequenz führten. Am häufigsten waren L/T/V/(C) an P2-Position, K/Y/R/(F)/(T) an P1-Position und S/(T)/(A)/(R) an P1'-Position (Tompa et al., 2004). An P3- sowie P2'-, P3'-, P4'-Position scheint Prolin bevorzugt zu werden. Es ist davon auszugehen, daß zusätzlich zur Aminosäuresequenz strukturelle Merkmale bei der Erkennung der Substrate eine Rolle spielen. So wurde vorgeschlagen, daß Calpaine in relativ ungeordneten Segmenten von Proteinen schneiden (Tompa et al., 2004). Ubiquitär exprimiert werden die beiden Isoformen Calpain I (μ -Calpain) und Calpain II (m-Calpain), welche Heterodimere aus einer katalytischen 80 kDa-Untereinheit, die unterschiedlich für Calpain I und II ist (60% Homologie), und einer identischen regulatorischen 30 kDa-Untereinheit sind. Beide Untereinheiten besitzen Calmodulin-ähnliche Calcium-bindende EF-Hände. Die Aktivität von Calpainen wird durch die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, durch Translokation zu Membranen, durch den endogenen Polypeptid-Inhibitor Calpastatin, durch Modifikation der Substrate und evtl. durch Autoproteolyse reguliert (Johnson and Guttmann, 1997; Nixon, 2003). Außer den ubiquitären Calpainen I und II wurden bis heute 14 weitere Calpain-ähnliche Gene in Säugern identifiziert. Einige von ihnen haben keine Calmodulin-ähnlichen Domänen (*atypical calpains*), weshalb man von einer Calcium-Unabhängigkeit ausgeht. Andere wiederum scheinen proteolytisch inaktiv zu sein, da die katalytische Triade (Cys, His, Asn) fehlt (Huang and Wang, 2001; Goll et al., 2003).

Man findet eine gegenseitige Beeinflussung der Caspasen- und Calpain-Systeme. Caspasen können Calpaine durch Modifikation oder Spaltung des Calpain-Inhibitors Calpastatin aktivieren (Wang et al., 1998; Porn-Ares et al., 1998; Neumar et al., 2003). Calpaine können die Caspase-Kaskade sowohl negativ als auch positiv modulieren. Einerseits können Calpaine die Caspasen-3, -7, -8, -9 durch Spaltung inaktivieren, andererseits die Procaspasen-7, -3, -12 sowie proapoptisches Bid durch Spaltung aktivieren und zu einer Abnahme des antiapoptischen Faktors Bcl-2 beitragen (Ruiz-Vela et al., 1999; Chua et al., 2000; Nakagawa and Yuan, 2000; Lu et al., 2002; Gil-Parrado et al., 2002; Neumar et al., 2003).

Einleitung

In Experimenten zur Proteolyse von polyQ-Proteinen wurde eine Spaltung von *in vitro*-translatiertem Htt mit gereinigtem Calpain I und II gezeigt, sowie eine Spaltung von endogenem Htt aus Mausgehirn-Homogenaten oder Zelllysaten mit Calpain II (Gafni and Ellerby, 2002; Kim et al., 2001; Goffredo et al., 2002). Eine Behandlung von Htt(1-969)-exprimierenden X57-Zellen mit den Calpain-Inhibitoren ALLN, ALLM oder Calpeptin resultierte in einem Verschwinden der Htt-Fragmente (Kim et al., 2001). Mutagenese-Studien erbrachten Hinweise auf Caspase- und Calpain-abhängige Prozessierungen des Htt(1-1212) in HEK293T-Zellen (Gafni et al., 2004). Die Behandlung von primären Ratten-Neuronen mit dem Calcium-Ionophor A23187 zeigte eine deutliche Spaltung des endogenen Htt-Proteins, welche durch Calpeptin unterdrückt wurde (Goffredo et al., 2002). Auch für das Prion-Protein wurde eine Calpain-abhängige Fragmentierung gezeigt, wobei eine Calpain-Inhibition die PrP^{Sc}-Propagation in Zellkultur inhibierte (Yadavalli et al., 2004).

Ratten zeigten 1-7 Tage nach Ischämie verstärkte Fragmentierung von endogenem Htt in Striatum und Cortex, wobei dasselbe N-terminale 55 kDa-Fragment durch Behandlung von Kontrollgruppen-Gehirnextrakten mit gereinigtem Calpain I oder II induziert werden konnte (Kim et al., 2003b). Ähnlich resultierte zerebrale Ischämie bei Htt-92Q-*knock-in*-Mäusen in Calpain-Aktivierung und Htt-Fragmenten, die der *in vitro*-Spaltung von Kontrollgruppen-Gehirnextrakten mit Calpain I entsprachen, nicht aber der *in vitro*-Spaltung mit Caspase-3 (Namura et al., 2002). Eine Calpain-Inhibition unterdrückte die Ausbildung von lokomotorischen Defiziten in einem Mausmodell der Parkinson-Erkrankung (Crocker et al., 2003).

In humanen HD-, Parkinson- und Alzheimer-Gehirnen gibt es Hinweise auf eine gesteigerte Calpain-Expression bzw. -Aktivität (Gafni and Ellerby, 2002; Crocker et al., 2003; Saito et al., 1993; Karlsson et al., 1995). In Lymphoblasten von HD-Patienten sowie im Gehirn von transgenen HD-72Q-Mäusen wurde eine verringerte Resistenz der Mitochondrien in Bezug auf Ca²⁺-Stimulation detektiert sowie ein Effekt von polyQ-verlängertem Htt auf die Aktivierung von Glutamatrezeptoren und die Stimulation von Calcium-Kanälen, was in einem erhöhten Ca²⁺-Einstrom resultierte (Bezprozvanny and Hayden, 2004). Eine Überlastung der Mitochondrien mit Ca²⁺ kann letztendlich über CytochromC-Freigabe zur Induktion von Apoptose und Neurodegeneration führen (Samara and Tavernarakis, 2003).

Trotz weitverbreiteter Expression der meisten polyQ-Proteine im Körper findet man selektive erkrankungsspezifische Gehirnbereiche, die bevorzugt der Neurodegeneration unterliegen (siehe 1.1.1-1.1.2). Verschiedene Faktoren könnten zu dieser Zellspezifität beitragen, wobei für SCA3 eine verstärkte Transkription des MJD1-Gens in betroffenen Gehirnregionen

ausgeschlossen wurde (Schmitt et al., 1997). Über eine Interaktion mit unterschiedlichen Proteinen oder eine Proteolyse durch bestimmte Proteasen, deren Expression räumlich oder zeitlich beschränkt ist, wird diskutiert. So ist trotz vieler Gemeinsamkeiten durchaus möglich, daß der Ausbruch jeder polyQ-Erkrankung durch ein anderes Ereignis, welches spezifisch für die Sequenz außerhalb des polyQ-Bereichs ist, ausgelöst wird.

1.4 Einfluß des Alterns

Einer der Gründe, warum sich die Amyloid-Erkrankungen erst in hohem Alter manifestieren, könnte die Nukleationsabhängigkeit (siehe 1.1.2) der amyloiden Aggregationen sein. So wird angenommen, daß die Bildung eines Nukleus thermodynamisch kontrolliert ist, und sich das Gleichgewicht auf Seiten des monomeren Proteins befindet. Die *Lag*-Phase der *in vitro*-Aggregationsreaktionen entspricht somit der Zeit, die bis zum Ausbruch der Erkrankung vergeht (Horwich, 2002; Chen et al., 2002b).

Als ein weiterer Grund für das Ausbrechen der amyloiden Erkrankungen in hohem Alter wird eine Veränderung der zellulären Prozesse mit zunehmendem Alter angesehen. Die amyloide Aggregation von *Islet Amyloid Polypeptide* (IAPP), welche mit Diabetes mellitus Typ II assoziiert ist, findet man überwiegend bei hohem Alter der Patienten. Auch Transthyretin, das in mutierter Form familiäre Amyloidosen auslöst, findet man in der Wildtyp-Form bei vielen älteren Menschen in amyloiden Strukturen im Herz (*senile cardiac amyloidosis*). Mit zunehmendem Alter scheinen sich also Situationen in der Zelle einzustellen, die einer partiellen Denaturierung durch z.B. milde Säurebehandlung *in vitro* entsprechen (Dobson, 2001; Horwich, 2002). Außer in den bisher diskutierten Amyloiderkrankungen ist Neurodegeneration auch eine wesentliche Komponente bei Epilepsie, Schlaganfall, Hypoglykämie und Hirntrauma (Samara and Tavernarakis, 2003).

Altern ist ein natürlicher Prozess, der genetisch und durch Umweltfaktoren bestimmt und von zunehmendem Versagen zellulärer Homöostase begleitet wird. Dies resultiert unter anderem in der Akkumulation von oxidierten, miteinander kovalent verknüpften, denaturierten Proteinen in Säugetierzellen (Sherman and Goldberg, 2001; Macario and Conway de Macario, 2002). Daher wird angenommen, daß die Ursache für Altern eine verringerte Funktion der zellulären Proteolyse-Mechanismen ist. In verschiedenen humanen und Rattengeweben wurden mit zunehmendem Alter verringerte Proteasom-Aktivitäten festgestellt, ebenso in *C. elegans* (Chondrogianni et al., 2002; Samara and Tavernarakis, 2003). Verringerter Abbau der

Einleitung

polyQ-Proteine sollte zu einer erhöhten Konzentration von toxischen Monomeren führen, was in Nukleation (Keimbildung), Aggregation und Pathogenese resultieren sollte.

Einige Studien zeigten, daß lysosomale Aktivitäten ebenfalls mit zunehmendem Alter abnehmen, während andere Studien von einer verstärkten Cathepsin E- und D-Expression in Neuronen von gealterten Säugergehirnen ausgehen (Nakanishi et al., 1997; Sherman and Goldberg, 2001; Nixon, 2003; Samara and Tavernarakis, 2003).

Abgesehen davon sollen lysosomale Membranen von gealterten Gehirnen durchlässiger sein, was zu einem Auslaufen (*leakage*) von lysosomalen Enzymen wie Cathepsin D und β -Glukuronidase ins Cytoplasma führt, und in Fällen von Herz- und Gehirn-Ischämie detektiert wurde (Samara and Tavernarakis, 2003). Partielles Aufbrechen der Lysosomen (*lysosomal rupture*) z.B. durch oxidativen Streß mit Relokalisation lysosomaler Proteasen (Cathepsin B, L, D) ins Cytosol kann zu Caspase-Aktivierung und Apoptose bzw. zu nekrotischem Zelltod führen (Brunk et al., 2001). Wie bereits erwähnt, geht man von der Akkumulation oxidierter Proteine mit zunehmendem Alter aus, was für verstärkten oxidativen Streß spricht. Andere Agonisten, die zu partiellem Lysosomenaufbrechen führen können, sind lysosomotrope Detergenzien wie Sphingosin (Grundbaustein von Phospholipiden) (Kagedal et al., 2001), Wachstumsfaktor-Mangel oder die Aktivierung von FAS- bzw. TNF-Rezeptoren durch Bindung von FAS-Ligand bzw. TNF α (Brunk et al., 2001). Auch Calpaine sollen die Stabilität von lysosomalen Membranen beeinträchtigen (Huang and Wang, 2001; Samara and Tavernarakis, 2003). Eine mit dem Alter zunehmende Konzentration von lysosomalen Proteasen und aktivierten Caspasen im Cytoplasma sollte in einer verstärkten Spaltung von polyQ-Vollängenproteinen und anschließender Neurodegeneration resultieren.

Verschiedene Studien zeigen außerdem eine mit zunehmendem Alter abgeschwächte Induktion von molekularen Chaperonen z.B. durch Hitzeschock, Hypoxie oder oxidativen Streß (Heydari et al., 1994; Shamovsky and Gershon, 2004; Nardai et al., 2002). Daher wird davon ausgegangen, daß die zellulären Chaperon-Konzentrationen für Dekaden ausreichen, um polyQ-Aggregation und Toxizität zu unterdrücken, die mit zunehmendem Alter verringerte Chaperon-Kapazität jedoch zum Ausbruch der polyQ-Erkrankungen führt (Sherman and Goldberg, 2001; Sakahira et al., 2002; Macario and Conway de Macario, 2002). Die Akkumulation ungefalteter, oxidierter Proteine (s. oben) könnte zu diesem Phänomen beitragen, indem die Konzentration freier Chaperone durch Bindung dieser oxidierten Proteine reduziert wird. Andererseits könnte das Auftreten der oxidierten Proteine das Resultat einer verminderten Chaperon-Kapazität sein. Nach dieser Theorie würden längere polyQ-Bereiche eine größere Chaperon-Kapazität benötigen, was die negative

Einleitung

Korrelation zwischen Ausbruchsalter der polyQ-Erkrankungen und Länge des polyQ-Bereichs erklären könnte.

Im Gegensatz zu den verringerten proteasomalen, lysosomalen und Chaperon-Aktivitäten findet man mit zunehmendem Alter erhöhte Calpain-Aktivitäten. Dies ist wahrscheinlich nicht auf erhöhte Calpain-Expression, sondern auf verstärkten Calcium-Einstrom (*Influx*), verringerte Calpastatin-Konzentration sowie veränderte Modifikationen von Substraten zurückzuführen. Eine Calpain-Aktivierung in verschiedenen, teilweise altersbedingten Erkrankungen wie z.B. Alzheimer-, Parkinson-Erkrankung, Kataraktbildung, Bluthochdruck, Arthritis, zerebrale Ischämie (bei Schlaganfall, Herzstillstand), Hirntrauma und Exzitotoxizität (neuronaler Zelltod durch Überstimulierung mit exzitatorischen Neurotransmittern wie z.B. Glutamat) sowie ein Einfluß von Calpainen auf die Erythrozyten-Lebensdauer (*erythrocyte senescence*) wurden postuliert (Huang and Wang, 2001; Nixon, 2003; Samara and Tavernarakis, 2003; Namura et al., 2002).

1.5 Zielsetzung

Neurodegenerative Polyglutamin(polyQ)-Erkrankungen, welche durch eine Verlängerung des polyQ-Bereichs in den krankheitsassoziierten Proteinen verursacht werden, sind durch neuronalen Zellverlust und die Bildung von neuronalen intrazellulären Proteinablagerungen (Einschlußkörperchen) charakterisiert. Da man davon ausgeht, daß eine veränderte Konformation (Fehlfaltung) der pathologischen polyQ-Proteine sowohl in einer veränderten Interaktion mit anderen zellulären Proteinen als auch in Aggregation resultiert, werden Aggregate als Marker des Erkrankungsprozesses angesehen.

Die *toxic fragment*-Hypothese postuliert, daß eine proteolytische Aufspaltung der pathologischen Proteine in polyQ-enthaltende Fragmente deren Aggregation initiiert, welche mit der Bildung von Proteinablagerungen und neuronaler Dysfunktion assoziiert ist. In der Literatur findet man mehrere experimentelle Resultate, die diese Hypothese unterstützen (siehe 1.3.1 - 1.3.2). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Aggregationsverhalten des Ataxin3-Proteins zu untersuchen, welches mit verlängertem polyQ-Bereich die Spinozerebellare Ataxie 3 (SCA3) verursacht. Sowohl das Volllängenprotein als auch verschiedene polyQ-enthaltende Fragmente sollten *in vitro* und in Zellkultur in Bezug auf ihre Aggregationsfähigkeit analysiert werden. Bei Hinweisen zur Bekräftigung der *toxic fragment*-Hypothese sollte eine spaltungsabhängige Aggregation von Ataxin3 in Neuroblastomazellen gezeigt werden, sowie Experimente zur Identifizierung der verantwortlichen Protease, die das

Einleitung

pathogene Ataxin3-Protein schneidet, durchgeführt werden. Da einige Autoren eine Abhängigkeit der polyQ-Pathogenese vom Vorkommen des aggregierenden Proteins im Zellkern postulieren (siehe 3.5), sollte die Ataxin3-Aggregation bei einer veränderten zellulären Lokalisation (Anhängen von Kernlokalisations- oder Kernexportsignalen) untersucht werden. Eine putative endogene Kernlokalisationssequenz sollte ebenfalls analysiert werden.

Da gezeigt wurde, daß die intrazellulären Einschlußkörperchen aus dem jeweiligen pathologischen polyQ-Protein sowie anderen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren, Ubiquitin, Proteasom-Untereinheiten und Chaperonen bestehen, wird als eine Ursache der Toxizität eine Rekrutierung dieser normalen Proteine in die amyloiden Proteinablagerungen (Koaggregation) angesehen (siehe 1.1.3). Bisher wurde vorwiegend eine Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren gezeigt, die polyQ-Bereiche in nicht-pathologischer Länge aufweisen. Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine mögliche Inaktivierung und Rekrutierung von normalem Ataxin3, welches bei heterozygoten Patienten zusätzlich zum pathologischen Ataxin3 exprimiert wird, zu untersuchen. Diese Inaktivierung des normalen Ataxin3 könnte zu einem partiellen Ataxin3-Funktionsverlust führen und somit zusätzlich zu dem postulierten Funktionsgewinn des polyQ-verlängerten Ataxin3 (veränderte Interaktionen und Aggregation) zur SCA3-Erkrankung beitragen.

Man geht davon aus, daß die polyQ-Krankheiten zu den Proteinefehlfaltungserkrankungen gehören, was durch das Vorkommen von Komponenten des Proteinfaltungs- und Degradationsapparats in neuronalen Einschlußkörperchen unterstützt wird. In der Literatur ist bereits eine Reduktion der polyQ-Aggregation und Toxizität durch Überexpression von molekularen Chaperonen in Zellkultur sowie in transgenen Tieren beschrieben (siehe 1.2.2). Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt der molekularen Chaperone Hsp70, Hsp40, Hsp104 und p97 auf die Ataxin3-Aggregation *in vitro* und in Zellkultur zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterien- und Hefestämme, Zelllinien

2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
SURE	<i>e14-</i> (<i>McrA-</i>) Δ (<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)171 <i>endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5</i> (Kan ^r) <i>uvrC</i> [F' <i>proAB lacI^qZAM15 Tn10</i> (Tet ^r)]	Stratagene
BL21	<i>E. coli</i> B F- <i>dcm ompT hsdS</i> (τ_B - m_B -) <i>gal</i>	Stratagene

2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JN54	MATa <i>his3-11,3-15 leu2-4,2-112 ura3-52 trp1-Δ1 lys2</i>	(Nelson et al., 1992)
YPH499	MATa <i>ura3-52 lys2-801 amber ade2-101 ochre trp1Δ63 his3Δ200 leu2Δ1</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)

2.1.3 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Referenz
Neuro-2a (N2a)	Maus-Neuroblastomazellen	ATCC CCL-131
N2a-Tet-off	Stabile N2a-Linie, die das Tet-Off-Regulator-Plasmid (Clontech) beherbergt und somit den Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) exprimiert	(Schaffar et al., 2004)
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomazellen aus Knochenmark-Tumor	ATCC CRL-2266
HEK293T	Humane, epitheliale Nierenzellen	
HeLa	Humane, epitheliale Cervix-Karzinomazellen	ATCC CCL-2
COS-7	Epitheliale Affen-Nierenzellen (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	ATCC CRL-1651
NIH 3T3	Maus-Fibroblasten	ATCC CRL-1658
CHO E36	<i>Chinese Hamster-Ovar-Zellen (Oricetulus griseus)</i>	

2.2 Vektoren und Oligonukleotide

2.2.1 Vektoren

Vektor	Beschreibung	Referenz
pGEX-6P-1	<i>E. coli</i> -Expressionvektor für Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine mit einer <i>PreScission</i> Protease-Schnittstelle zwischen der GST und dem Fusionspartner	Amersham
pProEX HTa	<i>E. coli</i> -Expressionvektor für His ₆ -Fusionsproteine	Invitrogen
pcDNA3.1 / Hygro+	Expressionvektor für Säugetierzellen mit CMV-Promotor, der in <i>E. coli</i> vervielfältigt (Ampicillin-Resistenz) und mittels Plasmidpräparation isoliert werden kann	Invitrogen
pTRE-2hyg	Expressionvektor für Säugetierzellen mit minimalem CMV-Promotor, der das <i>Tetracycline Response Element</i> enthält, zur Doxyzyklin-regulierbaren Proteinexpression (in <i>E. coli</i> : Ampicillin-Resistenz)	Clontech
pSI215	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionvektor mit CUP1-Promotor und TRP1-Markergen (in <i>E. coli</i> : Ampicillin-Resistenz)	Katja Siegers

Material und Methoden

pSI216	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionvektor mit CUP1-Promotor und HIS3-Markergen (in <i>E. coli</i> : Ampicillin-Resistenz)	Katja Siegers
YEp105	<i>S. cerevisiae</i> -Expressionvektor mit CUP1-Promotor und N-terminalem myc-Epitop, TRP1-Markergen, (in <i>E. coli</i> : Ampicillin-Resistenz), <i>Bg/II</i> -Schnittstelle <i>downstream</i> des myc-Epitops ist nicht <i>in frame</i> , daher wurde das mutierte Plasmid YEp105mut1 hergestellt	(Ecker et al., 1987)

2.2.2 Oligonukleotide

Name des Oligonukleotids	Oligonukleotide zur Genamplifikation und -klonierung: Sequenz	Name des klonierten Konstrukts
BamHI-FLAG-5' hSCA3-2	GTGACGCGGATCCATGGACTACAAAGACGATGACGATAAAGCTGGAGAATTCATGGAGTCCATCTTCCACGAGAAACAA GAAGGC	AT3Qn, N256
BamHI-hSCA3-N-term	GTGACGCGGATCCATGGTTATAAGCAATGCCTTGAAAGTT TGGGG	79cQ71
BamHI-hSCA3-mitte	GTGACGCGGATCCATGATATTTGTTGTTAAGGGTGATCTGC C	162cQ71
BamHI-hSCA3-MHRPK	GACGCGGATCCATGCATCGACCAAACTTATTGG	186cQ71
BamHI-hSCA3-MLDEDE	GACGCGGATCCATGTTAGACGAAGATGAGG	221cQ71
BamHI-hSCA3-MEDEEA	GACGCGGATCCATGGAAGATGAGGAAGCAGATC	242cQ71
BamHI-Cterm 5' hSCA3-2	GTGACGCGGATCCATGCAAGGTAGTTCCAGAAACATATC	257cQn, 257-321 (71Q)
BamHI-SCA3-281c-term	GACGCGGATCCATGCTTCGGAAGAGACG	281cQ71
BamHI-SCA3-RDLSG	GACGCGGATCCATGCGGGACCTATCAGGAC	318c
XhoI-myc-3' hSCA3	GTGACGCCTCGAGTTACAAGTCTTCTTCAGAAATGAGCTTT TGTTACATGTCAGATAAAGTGTGAAGGTAGCG	AT3Qn, ...cQn, 318c
BamHI-5' hSCA full-1	GACGCGGATCCATGGAGTCCATCTTCCACGAGAAAC	AT3Qn tagless
XhoI-3' hSCA3-rev	CCGCTCGAGTTATGTCAGATAAAGTGTGAA	AT3Qn tagless
BamHI-pProEx-His	GACGCGGATCCATGTCGTAACCATCACC	(pcDNA3.1-) His-AT3Q71
SCA3-257-XhoI-rev	GTGACCGCTCGAGTTAACTTAGCTGAATAGCCCTGCGG	N256
QRDLS-myc-XhoI-rev	CACCGCTCGAGTTACAAGTCTTCTTCAGAAATGAGCTTTTG TTCACATGATAGGTCCCGCTG	257-321 (71Q)
SmaI-NES-BamHI-Flag	CCCGGGATGTTAGCTTTGAAATTAGCCGGACTAGACATCG GATCCATGGACTAC	NES-AT3Qn
BamHI-5' Htt	GACGCGGATCCATGGCGACCCTGGAAAAGCTGATG	Htt-Exon1-51Q-myc
Htt-myc-XhoI-rev	CACCGCTCGAGTTACAAGTCTTCTTCAGAAATGAGCTTTTG TTCACACGGTCGGTGCAGCGGCTCCTCAGC	Htt-Exon1-51Q-myc
BamHI-Hdj1-f	GACGCGGATCCATGGGTAAAGACTACTAC	Hdj1
XhoI-Hdj1-r	GACCGCTCGAGCTATATTGGAAGAACCTGC	Hdj1

Als Vorlagen-DNS für die PCRs (siehe 2.5.6) wurden PSG5-Ataxin3 (humane *cDNA*) mit 22, 43, 71 und 121 CAG-Wiederholungen (Accession Number AAB33571, erhalten von Erich Wanker) sowie pBluescript-human Hdj1 (Ohtsuka, 1993) eingesetzt.

Name des Oligonukleotids	Oligonukleotide als <i>Linker-Sequenz</i>
NLS-1	GATCCATGCCAAAAAAGAAGAGAAAGGTAA
NLS-2	GATCTTACCTTTCTCTTCTTTTTTGGCATG

Name des Oligonukleotids	Oligonukleotide für zielgerichtete Mutagenesen: Sequenz	Name des klonierten Konstrukts
TseI-mutag-1	CGTTTTTACAGCAACCTTCTGG	TseI-mutag1
TseI-mutag-2	CCAGAAGGTTGCTGTAAAAACG	TseI-mutag1
NDGSGMQSS	AAGCAAATGATGGCTCAGGAATGCAAGGTAGTTC CAGAAAC	AT3Qn ΔUIM (n = 22, 71)
NDGSGMQSS-rev	GTTTCTGGAACCTTGCATTCCTGAGCCATCATT TGC	AT3Qn ΔUIM (n = 22, 71)
YEp105mutag-1	GAAGACTTGGTGATGAGATCTTCGTCAAG	YEp105mut1
YEp105mutag-2	CTTGACGAAGATCTCATCACCAAGTCTTC	YEp105mut1
SCA3-NLS-mut1	ACTTCAGAAGAGCTTCATAACCACCACGAAGCCTA CTTTGAA	257cQ71-HNHH
SCA3-NLS-mut2	TTCAAAGTAGGCTTCGTGGTGGTTATGAAGCTCTT CTGAAGT	257cQ71-HNHH
SCA3-deltaRKRR-1	ACTTCAGAAGAGCTTGAAGCCTACTTTGAA	257cQ71-ΔRKRR
SCA3-deltaRKRR-2	TTCAAAGTAGGCTTCAAGCTCTTCTGAAGT	257cQ71-ΔRKRR
BstBI-SCA3-mut-1	CGAGAAGCCTACTTCGAAAAACAGCAGCAA	SCA3-BstBI-mut
BstBI-SCA3-mut-2	TTGCTGCTGTTTTTCGAAGTAGGCTTCTCG	SCA3-BstBI-mut
SmaI-SCAmut-neu1	CGGGACCTATCAGGCCCGGGTTCACATCCATGTG	SCA mut
SmaI-SCAmut-neu2	CACATGGATGTGAACCCGGGCTGATAGGTCCCCG	SCA mut
Htt-SmaI-1	CCGCCACCACCTCCCGGGCCACCCCCACC	Htt-SmaImut
Htt-SmaI-2	GGTGGGGGTGGCCCGGAGGTGGTGGCGG	Htt-SmaImut
Htt-BstBI-mutag1	GGCCTTCGAGTCCTTCGAAAGCTTCCAAC	Httq103mut
Htt-BstBI-mutag2	GTTGGAAGCTTTCGAAGGACTCGAAGGCC	Httq103mut
SCA3-RDLSGQsrep-forw	GCAACAACGGGACCTATCTGGACAGAGTTCACATC CATG	100RDRep
SCA3-RDLSGQsrep-rev	CATGGATGTGAACTCTGTCCAGATAGGTCCCGTTG TTGC	100RDRep
SCA3-KQQQKrep-forw	CGAGAAGCCTACTTCGAAAAACAACAGCAGAAGC AGC	KQ ₃ Krep (87+3Q)
SCA3-KQQQKrep-rev	GCTGCTTCTGCTGTTGTTTTTCGAAGTAGGCTTCTC G	KQ ₃ Krep (87+3Q)

Die zielgerichteten Mutagenesen Htt-SmaImut und Httq103mut wurden nacheinander mit dem Plasmid pq103 (pcDNA3.1his-Htt-Exon1 mit 103Q) von George Lawless (Hereditary Disease Foundation) durchgeführt.

Name des Oligonukleotids	Oligonukleotide zur Sequenzierung	Primer-Bindungsstelle
Flag	GACGATGACGATAAAGCTGG	FLAG-tag
mjd500	TCTATATTTGTTGTTAAGGG	AT3-Sequenz SIFVVK
MJD-vor-CAG	TTCGGAAGAGACGAGAAGCC	AT3-Sequenz RKRREA
pSI-vor-MCS	CCTGTCTTGTATCAATTGC	vor MCS in pSI215
pSI-400rev	CTTCGCTATTACGCCAGC	hinter MCS in pSI215 (rev)
Yep105neu	AAGTCATCGAAATAGATATTAAG	Promotor von YEp105
pcDNA3.1+-rev	CTAGAAGGCACAGTCGAGGC	hinter MCS in pcDNA3.1 (rev)

2.3 Gereinigte Proteine und Antikörper

2.3.1 Gereinigte Proteine (außer GST-Ataxin3-Fusionsproteine siehe 2.8.5)

Gereinigtes Protein	Herkunft	Referenz bzw. gereinigt von
His ₆ -AT3Q22 (human)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Nadine Strippel (siehe 2.8.6)
His ₆ -Ataxin3 (<i>Rattus norvegicus</i>)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Nikolay Tzvetkov (siehe 2.8.6)
DnaK (<i>E. coli</i>)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Rosemarie Schiebel
DnaJ (<i>E. coli</i>)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Manajit Hayer-Hartl
GrpE (<i>E. coli</i>)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Manajit Hayer-Hartl

Material und Methoden

Hsc/Hsp70 (konstitutive Form und Hitzeschockprotein)	Gereinigt aus Rinderhirn	Gregor Schaffar
His ₆ -Hdj1 (human)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Gregor Schaffar
Hdj2 (human)	rekombinant aus SF9-Zellen	Winfried und Rosemarie Schiebel
His ₆ -p97 (human)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Nikolay Tzvetkov (siehe 2.8.6)
His ₆ -Hsp104 (<i>S. cerevisiae</i>)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Nikolay Tzvetkov (siehe 2.8.6)
GroEL-SRI (= <i>Single Ring</i> -Mutante von GroEL aus <i>E. coli</i>) mit zusätzlicher D87K-Mutation	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Dirk Wischnewski
Aktin	gereinigt aus Kaninchen-Muskel	Sigma A2522
His ₆ -HA-TBP-38Q (human)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Gregor Schaffar
Calpain II (Ratte)	rekombinant aus <i>E. coli</i>	Calbiochem #208718

2.3.2 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Referenz
Anti-Ataxin3	Kaninchen, polyklonal	diese Arbeit (siehe 2.8.7)
Anti-myc (9E10)	Maus, monoklonal	Santa Cruz sc-40
Anti-FLAG (M2)	Maus, monoklonal	Sigma F3165
Anti-FLAG	Kaninchen, polyklonal	Sigma
Anti-His ₆	Maus, monoklonal	Roche 1922416
Anti-polyQ (1C2)	Maus, monoklonal	Chemicon MAB1574
Anti-GST	Ziege, polyklonal	Amersham 27-4577
Anti-TBP	Maus, monoklonal	Abcam ab818-100
Anti-Aktin (N350)	Maus, monoklonal	Amersham
Anti-Hsp70 (C92)	Maus, monoklonal	Stressgen SPA-810
Anti-GAPDH (Kaninchen)	Maus, monoklonal	Chemicon MAB374
Anti-GAPDH (Hefe)	Kaninchen, polyklonal	Sigma A9521
Anti-Caspase-3 (H-277)	Kaninchen, polyklonal	Santa Cruz sc-7148
Anti-CathepsinD (C-20)	Ziege, polyklonal	Santa Cruz sc-6486
Anti-Ubiquitin (FK2)	Maus, monoklonal	Biomol PW8810
Anti-SUMO-1 (Anti-GMP-1)	Maus, monoklonal	Zymed 33-2400

2.3.3 Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Referenz
Anti-Maus-IgG-HRP-Konjugat	Ziege	Sigma A4416
Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat	Ziege	Sigma A3562
Anti-Maus-CY3	Ziege	Dianova
Anti-Maus-FITC	Ziege	Dianova
Anti-Kaninchen-IgG-HRP-Konjugat	Ziege	Sigma A9169
Anti-Kaninchen-IgG-AP-Konjugat	Ziege	Sigma
Anti-Kaninchen-CY3	Ziege	Dianova
Anti-Kaninchen-FITC	Ziege	Dianova
Anti-Ziege-HRP-Konjugat	Kaninchen	Sigma

2.4 Puffer und Medien

2.4.1 Puffer und Reagenzien

1x TAE (Agarose-Gel-Elektrophorese-Puffer) 1mM EDTA
 40mM Tris / Essigsäure pH 8

Material und Methoden

1x SDS-PAGE-Laufpuffer	25mM Tris 192mM Glycin 1% SDS (Natriumdodecylsulfat)
2x SDS-PAGE-Proben-Puffer	63mM Tris / HCl pH6,8 2% SDS 10% Glycerin 0,7M β -Mercaptoethanol
SDS-Gel-Färbelösung	1,2g/l <i>Coomassie-Brilliant-BlueR-250</i> 50% Ethanol 10% Essigsäure
SDS-Gel-Entfärbelösung	10% Ethanol 10% Essigsäure
Western Blot-Puffer	50mM Tris 192mM Glycin 20% Methanol 0,08% SDS
<i>Stripping</i> -Puffer	63mM Tris / HCl pH 6,7 2% SDS 100mM β -Mercaptoethanol
1x PBS-T	8mM Dinatrium-Hydrogenphosphat 2mM Natrium-Dihydrogenphosphat 70mM NaCl 0,08% Tween-20
ECL-Lösung 1	1ml 3-Aminophthal-Hydrazid (250mM in DMSO) 444 μ l p-Kumarinsäure (90mM in DMSO) 10ml Tris / HCl (1M pH 8,5) auf 100ml mit Wasser auffüllen
ECL-Lösung 2	61 μ l Wasserstoffperoxid (30%) 10ml Tris / HCl (1M pH 8,5) auf 100ml mit Wasser auffüllen

2.4.2 Medien für die Bakterienkultur

Luria-Bertani (LB)-Medium	10g/l Trypton (BD Biosciences) 5g/l Hefeextrakt (BD Biosciences) 10g/l NaCl (Merck) (für Agarplatten wurde 15g/l Agar (Fluka) zugegeben)
Terrific Broth (TB)-Medium	47,5g/l Fertigmedium (Fluka) + 8ml/l Glycerin

Die Antibiotika Ampicillin, Kanamycin und Tetracyclin wurden in Endkonzentrationen von 85 μ g/ml (gelöst in Wasser), 50 μ g/ml (in Wasser) bzw. 50 μ g/ml (gelöst in Ethanol) eingesetzt.

Amersham oder Beckman DU640 Spectrophotometer) bestimmt. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50µg/ml doppelsträngiger Plasmid-DNS (Sambrook *et al.*, 1989). Mittels Quotienten der Wellenlängen 260nm/280nm wurde die Reinheit der Plasmidpräparationen festgestellt.

2.5.3 DNS-Restriktionsverdau

Alle verwendeten Restriktionsenzyme stammten von New England Biolabs (NEB) mit Ausnahme des Enzyms *EheI*, das von Fermentas bezogen wurde. Plasmide bzw. PCR-Produkte wurden mit den mitgelieferten Reaktionspuffern und wenn benötigt mit BSA versetzt und mit den Enzymen für 1-2 h nach Herstellerangaben inkubiert.

2.5.4 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen

Um eine Religation von verdauten Plasmidvektoren zu verhindern, wurden die freien 5'-Phosphatester durch CIP (*calv intestine* Alkalische Phosphatase von NEB) hydrolysiert. Dies erfolgte parallel mit einem Restriktionsverdau, indem die Phosphatase in der letzten Stunde zum Restriktionsansatz dazugegeben wurde.

2.5.5 Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid-DNS

Plasmide bzw. Restriktionsansätze wurden mit 6x DNS-Auftragspuffer (6x *Loading Dye Solution* von Fermentas) versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1xTAE aufgetrennt. Die Apparaturen wurden von Biorad bezogen. Es wurde eine Spannung von 100V angelegt. Die Gele (1% Agarose in 1xTAE-Puffer) enthielten 30µg/100ml Ethidiumbromid (Biorad) zum Anfärben der DNS. Als Größenmarker diente der *Gene Ruler 1kb-DNA-Ladder* (Fermentas).

Bei analytischen Gelelektrophoresen wurde die aufgetrennte DNS mit einem Gerät von MWG AG Biotech im UV-Durchlicht fotografiert. Bei präparativen Ansätzen wurden die Fragmentbanden erwarteter Größen am UV-Schirm mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel-Extraktions-Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt.

2.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNS wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = *polymerase chain reaction*) verwendet. Taq-Polymerase (Promega), Pfu-Polymerase (Promega oder Fermentas) oder das *Expand Long Template PCR System* (Roche) wurden eingesetzt. Eine Standard-PCR-Reaktion ist unten dargestellt.

50 – 200ng Vorlage (<i>Template</i>)-DNS	1 Zyklus: 94°C 5 min
50 – 250µM dNTPs (jeweils)	30 Zyklen: 94°C 30 sec
0,1 – 0,3µM <i>Primer I</i>	50-60°C 30 sec
0,1 – 0,3µM <i>Primer II</i>	68-72°C 1 min/kb
5µl 10x Reaktionspuffer	1 Zyklus: 68-72°C 7 min
(max. 4mM MgCl ₂ , wenn Taq verwendet wurde)	Endtemperatur: 4°C
5µl DMSO	
1 – 2 U Polymerase	
Steriles, destilliertes Wasser ad 50µl	

Nachdem 10µl des PCR-Ansatzes in einem Agarosegel auf das Vorhandensein von PCR-Produkten kontrolliert worden waren, wurde die DNS im restlichen Ansatz mit Hilfe des *PCR Purification Kit* (Qiagen) aufgereinigt.

Erfolgreiche PCR-Reaktionen wurden nach Ligation in Vektoren mittels DNS-Sequenzierung identifiziert.

2.5.7 Zielgerichtete Mutagenese

Zur Herstellung von spezifischen Mutationen wurde die gesamte Plasmid-DNS inklusive dem zu mutierenden Gen mit zueinander komplementären, die Mutation tragenden Primern amplifiziert. PCR-Reaktionen wurden wie in 2.5.6 beschrieben mit Pfu bzw. Pfu-Turbo Polymerase (Stratagene) angesetzt, aber leicht verändert inkubiert:

1 Zyklus:	96°C	5 min
25 Zyklen:	96°C	30 sec
	55°C	1 min
	68°C	6 min
Endtemperatur:	4°C	

Die PCR-Produkte wurden mit 10U *DpnI* für mindestens 2 h inkubiert, um methylierte parentale Vorlage (*Template*)-DNS zu verdauen, und anschließend mittels *PCR Purification Kit* oder nach Agarose-Gelelektrophorese mit *QIAquick Gel-Extraktions-Kit* (Qiagen) gereinigt. 1-10µl wurden in SURE-Zellen transformiert. Erfolgreich mutierte Klone wurden mittels Restriktionskartierung und DNS-Sequenzierung identifiziert.

Die zielgerichtete Mutagenese *TseI*-mutag1 (siehe 2.2.2) diente dazu, die einzige *TseI*-Restriktionsschnittstelle, die außerhalb des poly(CAG)-Bereichs vorkommt, aus der DNS-Sequenz von Ataxin3 (AT3) zu entfernen. Nach erfolgreicher Mutagenese wurde die DNS mit *TseI* geschnitten, welches den poly(CAG)-Bereich in 3bp-Fragmente zerschneidet. Die 5' und 3'-DNS-Fragmente wurden ligiert, wodurch AT3Q Δ entstand.

2.5.8 Ligation von DNS-Fragmenten

Um mittels Restriktionsverdau erhaltene Vektor- und *Insert*-Fragmente zu ligieren, wurden Ansätze mit aufgereinigter Vektor- und Fragment-DNS im Verhältnis 1:10 mit Reaktionspuffer und 1µl (400U) *T4-DNA-Ligase* (NEB) üN bei 16°C oder für 2 h bei RT inkubiert. Es folgte eine Transformation in kompetente SURE Zellen.

2.5.9 DNS-Sequenzierungen

Alle Sequenzierungsreaktionen wurden nach der Kettenabbruchmethode (Dideoxyverfahren) von Sanger angesetzt und von verschiedenen Firmen (Medigenomix, Martinsried und Sequiserve, Vaterstetten) durchgeführt. Die erhaltenen DNS-Sequenzen wurden mit Hilfe des *ExPasy-Translate Tool* (<http://www.expasy.org/tools/dna.html>) in Proteinsequenzen übersetzt oder mittels *GeneStream align* (<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) mit bekannten Sequenzen verglichen.

2.5.10 Herstellung und Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen

Mit 5ml einer *E. coli*-üN-Kultur (SURE-Zellen: Kanamycin, Tetracyclin) wurden 200ml LB-Medium angeimpft und für 2-3 h bei 37°C und 240Upm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von circa 0,4 erreicht wurde. Die Zellen wurden mit 4.000xg pelletiert, mit 30ml sterilen, kalten TfbI (100mM RbCl, 50mM MnCl₂, 30mM Kaliumacetat, 10mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH5,8 mit Essigsäure eingestellt) gewaschen und in 4ml kalten TfbII (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl₂, 15% Glycerin, pH7,0 mit NaOH eingestellt) resuspendiert. Portionen aus 100µl wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Transformation wurden 50-100µl der aufgetauten kompetenten Zellen mit 10µl Ligationsansatz oder 1µg Plasmid-DNS versetzt und auf Eis für 15 min inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 2 min, kurzes Abkühlen auf Eis und eine Inkubation mit 0,8ml

LB-Medium für 1 h bei 37°C und 240Upm. Die Zellen wurden pelletiert und auf Antibiotikum-enthaltenden LB-Platten ausplattiert.

2.5.11 Herstellung eines Ataxin3-Konstrukts mit alternierenden CAA CAG-Trinukleotiden

Da CAG-Wiederholungen mit einer Länge von mehr als 70 Trinukleotiden in Hefezellen instabil sind (Abb.3-4e), sollte ein Ataxin3-Konstrukt mit alternierenden CAA CAG-Wiederholungen hergestellt werden, da alternierende Codons zu einer Verminderung der Instabilität führen (Michalik et al., 2001). Der erste Versuch bestand aus dem Aneinanderlagern (*Annealing*) von (CAACAG)_n-Oligonukleotiden (Sequenz nicht aufgelistet) und deren Ligation mit jeweils anderen Oligonukleotiden im selben Ansatz, was zu längeren CAACAG-Fragmenten führen sollte. Die Fragmente wurden dann in die DNS-Fragmente ligiert, die dem Ataxin3 N- und C-Terminus („TseI-mutag1“ mit *TseI* geschnitten) entsprechen, dann in Plasmide ligiert und in SURE-Zellen transformiert. Es konnten jedoch keine Kolonien auf den Antibiotikum-enthaltenden Platten gefunden werden. Eine Elektrotransformation (nicht in Material und Methoden beschrieben) führte zu demselben Resultat. Der zweite Versuchsansatz bestand darin, diese Oligonukleotid-Ataxin3-Ligationen blind aus einem 3%igen Agarosegel auszuschneiden, indem von einer Größe von 1200-1500 bp ausgegangen wurde. Mittels PCR wurden diese Ataxin3-Konstrukte, die etwa 100Q enthalten sollten, amplifiziert. Es konnte jedoch kein PCR-Produkt der erwarteten Größe gefunden werden.

Als drittes Experiment wurde eine PCR mit Primern (Sequenz nicht aufgelistet), die jeweils Schnittstellen für Restriktionsenzyme trugen, und mit einer Vorlage-DNS für Huntingtin-Exon1, welches bereits alternierende CAA CAG-Codons trug (pq103 (pcDNA3.1his-Htt-Exon1 mit 103Q) von George Lawless (Hereditary Disease Foundation), durchgeführt. Der Plan war, die alternierenden Codons zu amplifizieren und mittels der Restriktionsschnittstellen in das Ataxin3-Gen hinein zu klonieren. Entweder wurden keine PCR-Produkte erhalten oder nach Ligation mit den Ataxin3-Gen-Fragmenten konnten keine Transformanten gefunden werden. Als vierter Ansatz wurden *Linker*-Oligonukleotide (Sequenz nicht aufgelistet) so aneinandergelagert, daß sie auf der 5'- bzw 3'-Seite überhängende Enden bildeten, die denen nach Restriktionsverdau mit einem bestimmten Enzym entsprachen. Auf der zugehörigen 3'- bzw. 5'-Seite bildeten die Linker glatte (*blunt*) Enden aus, die mit den aneinandergelagerten (CAACAG)_n-Oligonukleotiden (siehe oben) ligiert wurden. Diese Verbindung wurde wiederum in Ataxin3-Gen-Fragmente und Plasmide ligiert.

Nach Fehlerfolg wurde als fünfte und letzte Maßnahme geplant, die Restriktionsschnittstellen BstBI und SmaI im Ataxin3-Gen kurz vor und kurz hinter die CAG-Wiederholungen mittels zielgerichteter Mutagenese einzufügen (siehe 2.2.2). Nach Erfolg wurden außerdem in das vorhandene Huntingtin-Exon1 kurz vor und kurz hinter die alternierenden CAA CAG-Codons die Schnittstellen BstBI und SmaI eingefügt (zielgerichtete Mutagenesen mit pq103-Plasmid, siehe 2.2.2). Letztendlich wurden die CAG-Wiederholungen im Ataxin3-Gen durch die alternierende CAA CAG-Sequenz aus dem Huntingtin-Exon1 ausgetauscht. Durch Sequenzierung des erhaltenen Ataxin3-Konstrukts wurden die entstandenen Mutationen im Gen sichtbar. Mittels zwei Ansätzen von zielgerichteter Mutagenese wurde die Sequenz vor und hinter den CAA CAG-Codons repariert und so die ursprüngliche Ataxin3-Sequenz wiederhergestellt (siehe 2.2.2). Schließlich endete die Arbeit mit einem FLAG-Ataxin3-myc-Konstrukt mit einem polyQ-Bereich von Q₃KQ₈₇ (siehe Anhang).

2.6 Hefekulturmethoden

Alle hier erwähnten Lösungen und Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert oder steril filtriert. Der verwendete Stamm *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 besitzt die auxotrophe Mutation *ade2-101*, weshalb alle für diesen Stamm verwendeten Flüssigmedien mit Adenin (50mg/l) versetzt wurden.

2.6.1 Herstellung und Transformation kompetenter Hefen

Mit mehreren Hefekolonien wurden 50ml YPD oder *SC-Drop-out*-Medium angeimpft und für 16-18 h bei 30°C und 200U_{pm} inkubiert. 300ml Medium wurden mit dieser Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2-0,3 angeimpft und für circa 3 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 inkubiert. Die Hefezellen wurden mit 1.000xg pelletiert, in 50ml Wasser gewaschen und in 1,5ml TE/LiAc-Lösung (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7,5 + 100mM Lithiumacetat, pH 7,5 mit Essigsäure) resuspendiert. Portionen von 100µl wurden bei -80°C gelagert oder sofort mit Plasmid-DNS transformiert. Hierzu wurde 0,1mg erhitzte *Herring-Testes*-DNS mit 0,1-1µg Plasmid-DNS gemischt und zu 100µl kompetenten Zellen gegeben. Nach Vortexen wurde 0,6ml PEG/LiAc-Lösung (TE/LiAc-Lösung mit 40% PEG 4000) dazugegeben, gevortext und bei 30°C und 200U_{pm} für 30 min inkubiert. Nach Zugabe von 70µl DMSO wurde vorsichtig gemischt. Es folgte ein Hitzeschock bei 42°C für 15 min, danach Abkühlen auf Eis für 1-2 min, und die Zellen wurden mit 20.000xg für 5 Sekunden pelletiert. Die Hefen wurden in 100µl TE resuspendiert und vollständig oder in Verdünnungen auf *SC-Drop-out*-Platten ausplattiert. Die Platten wurden bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Mit Einzelkolonien wurde *SC-Drop-out*-Medium angeimpft und üN bei 30°C und 200 U_{pm} kultiviert. Zur Lagerung wurde 1ml der üN-Kulturen mit 0,3ml Glycerin versetzt und nach Vortexen bei -80°C aufbewahrt (*Glycerol stocks*).

2.6.2 Proteinexpression in Hefe

Für die Überexpression von Proteinen in Hefe wurden Plasmide mit Kupfer-induzierbaren Promotoren verwendet (siehe 2.2.1). Mit einer üN-Kultur wurde *SC-Drop-out*-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft. Die Kulturen wurden etwa 3 h bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 wachsen gelassen und die Expression mittels Zugabe von 100-400µM CuSO₄ induziert. Nach einer Expression von 24h bei 30°C wurden die Hefen pelletiert und Hefe-Extrakte hergestellt.

2.6.3 Herstellung von Hefe-Extrakten unter denaturierenden Bedingungen

Hefen von 5ml Kultur wurden pelletiert und in 100µl TCA-Puffer (20mM Tris/HCl pH8, 50mM Ammoniumacetat, 2mM EDTA, 1mM PMSF, Protease Inhibitor *Complete* von Roche) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen (Sigma G-9268) und 100µl 20% Tri-Chlor-Essigsäure (TCA) wurden die Hefen durch viermaliges Vortexen / Kühlen auf Eis für 1 min aufgeschlossen. Der Glasperlen-Überstand wurde entnommen und bei 20.000xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteine im Pellet in 100µl SDS-Probenpuffer resuspendiert, mit 1M Tris neutralisiert und bei 100°C für 10 min erhitzt. Für SDS-PAGE und Western Blot Analysen wurden 5-15µl eingesetzt.

2.6.4 Herstellung von nativen Hefe-Extrakten

Die Zellpellets von je 5ml Kulturen wurden in 0,5ml nativem Lysis-Puffer (50mM Tris/HCl pH8, 5% Glycerin, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1% TritonX100, 1mM PMSF, Protease Inhibitor *Complete* von Roche) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen wurden die Hefen durch viermaliges Vortexen für 1 min / Einfrieren in Flüssigstickstoff / Auftauen aufgeschlossen. Der Glasperlen-Überstand wurde entnommen und bei 400xg und 4°C für 10

Material und Methoden

min zentrifugiert, um Zellwände und intakte Hefezellen zu entfernen. Das Pellet wurde verworfen, und der Überstand als Hefe-Extrakt weiterverwendet (siehe 2.8.3 und 2.9.3).

2.6.5 Plasmidisolierung aus Hefe

Von einer \bar{u} N-Kultur wurden 1,5ml abgenommen, die Hefen pelletiert und in 0,2ml Aufschlußpuffer (10mM Tris/HCl pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8, 2% TritonX100, 1% SDS) resuspendiert. Nach Zugabe von Glasperlen und 0,2ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden die Zellen durch 5 min Vortexen aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 20.000xg und RT. Die wäßrige obere Phase wurde entnommen und kompetente *E. coli* mit 1 μ l transformiert.

2.6.6 Hefe-Vitalitätstest

Hefe-Flüssigkulturen (psI215 oder Yep105mut1) wurden auf eine OD₆₀₀ von 1,0 abgeglichen und anschließend mehrere, serielle Verdünnungen (1:4 bzw. 1:6) in Medium angesetzt. Davon wurden 5-10 μ l mittels Pipette auf CuSO₄-enthaltende SC-Drop-out-Platten getropft bzw. mit einem sterilen Stempel, der in die Hefe-Verdünnungen getaucht worden war, aufgetupft. Die Platten wurden bei 30°C bzw. 37°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden. Da sich bei dieser Prozedur kein Unterschied im Wachstum der polyQ-exprimierenden Hefen zeigte, wurde in weiteren Experimenten die Proteinexpression bereits in Flüssigkultur mit CuSO₄ für 24 h oder länger induziert und die Hefen zusätzlichem Streß bei 37°C (200Upm) ausgesetzt (siehe Abb.3-4f).

2.7 Kulturmethode für Säugetierzellen

2.7.1 Kultivierung von adhärenz Zellen

Die verwendeten adhärenz Zellen wurden in Kulturschalen (Falcon) oder Kulturflaschen (Greiner) in einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung bei RT von dem Kulturgefäß abgelöst. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Protease Trypsin inaktiviert und die Zellen durch Pipettieren vereinzelt. Nach 1:5 bis 1:10-Verdünnung wurden die Zellen weiter kultiviert. Die Zelllinie N2a-Tet-off wurde ausschließlich in Medium mit Tet-System getestetem FCS und G418 kultiviert.

Zellen nach 3 h Transfektion (siehe 2.7.3) bzw. untransfizierte Zellen wurden mit verschiedenen Substanzen kultiviert. Staurosporin (Calbiochem #569397) wurde 1 μ M ins Medium gegeben und für maximal 17 h mit den Zellen inkubiert. Leupeptin, Aprotinin bzw. Pepstatin wurden in Endkonzentrationen von 0,2mM (in Wasser), 1,5 μ M (in Ethanol) bzw. 20 μ M (in Ethanol) ins Medium gegeben. Ammoniumchlorid wurde 20mM zum Medium gegeben. MG132 wurde 20 μ M (in DMSO) für maximal 5 h, Thapsigargin (Upstate Biotechnology #19-145) wurde 10nM - 10 μ M für 2,5 - 24h eingesetzt. Calpeptin (Calbiochem #03-34-0051) wurde in DMSO gelöst und bis 200 μ M eingesetzt. Bei Inkubationen bis 72 h wurde 50 μ M Calpeptin (direkt nach transients Transfektion für 3 h) ins Medium gegeben und jeweils nach 24 h ausgetauscht. Bei Kultivierung der Zellen mit 0,5 - 5 μ M Ionomycin (in DMSO, Sigma I0634) wurde das Medium gegen OptiMEM + 2mM CaCl₂ ausgetauscht.

2.7.2 Kryokonservierung

Für die Langzeitkonservierung wurden abgelöste Zellen von einer kleinen Kulturflasche in Medium bei 1.000xg pelletiert und in 1ml frischem Medium, das 10% DMSO enthielt,

aufgenommen. Nach Einfrieren üN bei -80°C wurden die Zellen in Flüssigstickstofftanks überführt und dort gelagert.

Wenn gefrorene Zellen wieder in Kultur genommen werden sollten, wurden sie in 5ml kaltem Medium durch mehrmaliges Pipettieren aufgenommen, pelletiert und in frischem Medium wie gewohnt kultiviert.

2.7.3 Transiente Transfektion

Zellen für transiente Transfektionen wurden am vorherigen Tag so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion zu 70% konfluent waren. Die Zellen wurden vor der Transfektion einmal in PBS gewaschen. 3cm-Schalen (*6-well-plates*, Falcon) wurden mit je $2\mu\text{g}$ Plasmid-DNS (aus *Midi-Preps*) und LipofectAMINE PLUS-Reagenz (Invitrogen) in OptiMEM nach Herstellerangaben transfiziert. Nach 3 h Inkubation im Brutschrank wurde 2ml Medium zum 1ml OptiMEM-Transfektionsgemisch dazugegeben und die Zellen für weitere 12 - 72 h kultiviert. In einigen Experimenten wurde das Medium nach 24 - 48 h erneuert.

Bei Verwendung der Zelllinie N2a-Tet-off wurden die Zellen nach Transfektion mit und ohne Doxyzyklin ($1\mu\text{g/ml}$) in Medium mit Tet-System getestetem FCS und G418 kultiviert. Durch Zugabe von Doxyzyklin wurde die Expression von pTRE2hyg-Plasmiden inhibiert.

Zur Expression der TEV-Protease (Accession Number NP_734212) wurde ein pTRE2hyg-Plasmid verwendet, in das eine FLAG-markierte TEV-Protease-*cDNA* (Tector and Hartl, 1999) kloniert worden war (*NheI*, *NotI*). Bei Transfektion mit humaner Vollängen-Calpastatin-*cDNA* wurde das bereits publizierte pRK5-Expressionsplasmid (Yadavalli et al., 2004) verwendet.

2.7.4 Herstellung von Zellysaten

Nach Kultivierung der transfizierten Zellen bzw. nach Inkubation von Zellen mit verschiedenen Substanzen wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 0,5ml Lysis-Puffer (20mM Tris/HCl pH8, 150mM NaCl, 10mM MgCl_2 , 0,2% TritonX100, Protease Inhibitor *Complete* von Roche) mit einem Zellschaber abgeschabt. Wenn die Zellen nur noch schwach an den Kulturschalen angeheftet waren oder sich bereits abgelöst hatten, wurden sie mit dem Medium abgenommen, bei $1.000\times g$ pelletiert und dann in Lysis-Puffer resuspendiert. Nach Überführung in Eppendorf-2ml-Gefäße folgte eine 1-stündige Inkubation mit $4\mu\text{l}$ Benzonase (40U, Merck) bei 4°C . Die Zellysate wurden anschließend weiterverwendet (siehe 2.8.3, 2.9.3, 2.9.7) oder bei -20°C gelagert.

2.7.5 Herstellung von N2a-postnukleären Überständen zur Ataxin3-Spaltung *in vitro*

N2a-Zellen wurden in 10 – 15 cm-Schalen für 24 – 48 h kultiviert, bis sie annähernd zu 100% konfluent waren. Die Zellen wurden in der Schale mit 25mM HEPES/KOH pH 7,6 auf Eis gewaschen und anschließend mit 200mM Saccharose für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Quellen der Zellen wurde die Saccharose vorsichtig entfernt. Es wurden 0,5ml 250mM Saccharose, 3mM Imidazol pH 7,4 auf die Zellen gegeben und diese mit einem Zellschaber abgeschabt. In einem *Dounce*-Homogenisator (Glas-Col) wurden die Zellen durch 30 Hübe aufgeschlossen. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei $1.000\times g$ und 4°C , bei der intakte Zellen und Zellkerne pelletiert wurden. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde auf 20mM Tris/HCl pH 8, 75 – 150 mM KCl eingestellt und als „postnukleärer Überstand“ für *in vitro*-Spaltungsexperimente von Ataxin3 eingesetzt. Zur Herstellung von $10.000\times g$ - und $100.000\times g$ -Überständen wurde der postnukleäre Überstand für 10 min bei $10.000\times g$ und 4°C zentrifugiert und dessen Überstand anschließend für 1h bei $100.000\times g$ und 4°C . Nach einer Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.8.4) wurden $100\mu\text{g}$ postnukleärer Überstand

bzw. 10.000xg- oder 100.000xg-Überstand mit 50ng PP-geschnittenem (siehe 2.9.2) GST-AT3Q22 versetzt und für 1-2 h bei 30°C und 300Upm inkubiert. Die Überstände wurden immer frisch hergestellt, da Einfrieren und Auftauen zu einer Beschädigung der Membranvesikel und damit zur Freisetzung von lysosomalen oder ER-Proteasen führen würde. Die 100µg-Ansätze wurden auf große SDS-PAGE-Gele aufgetragen und in Western Blot Analysen (siehe 2.8.3) eingesetzt.

Wenn angegeben, wurde 1mM CaCl₂ eingesetzt. In Inhibitorstudien wurden 100µM ALLN, 2mM EGTA, 10µM E-64, 15µM Pepstatin, 0,2mM Leupeptin, 1,5µM Aprotinin, 40-100µM Z-VAD-FMK (Calbiochem) und 20µM MG132 eingesetzt. Wenn gereinigtes Calpain II zugegeben wurde, wurde der postnukleäre Überstand zusätzlich mit 1,5mM MgCl₂ versetzt.

2.7.6 Herstellung von HEK293T-Lysaten für *in vitro*-Caspase-Aktivierungsassays

HEK293T-Zellen wurden in 10 - 15 cm-Schalen bis zu vollständiger Konfluenz kultiviert, in PBS gewaschen, mit einem Zellschaber abgeschabt und bei 400xg pelletiert. Nach Waschen in 20mM HEPES/KOH pH 7,6, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT wurden sie nach Zugabe von einem Volumen dieses Puffers resuspendiert. Es folgte eine Inkubation von 20 min auf Eis. Nach dem Quellen folgte der Zellaufschluß, indem die Zellen 30mal in eine 1ml-Spritze mit Kanüle (25x) aufgesogen und wieder hinausgedrückt wurden. Danach wurde für 10 min bei 16.000xg und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde als Lysat in die *in vitro*-Caspase-Aktivierungsexperimente eingesetzt (Bartke et al., 2004). Nach einer Proteinbestimmung (siehe 2.8.4) wurden 50-100 µg des Lysats für 1 h bei 30°C und 300Upm inkubiert. Um Caspasen zu aktivieren, wurde 10µM Cytochrom C (Horse Heart, Sigma C7752) und 1mM dATP zugegeben. Wenn erwähnt, wurden 1mM CaCl₂, 100µM ALLN, 2mM EGTA, 10µM E-64, 15µM Pepstatin, 200µM Leupeptin, 1,5µM Aprotinin, 50-100µM Z-VAD-FMK, 100µM Z-DEVD-FMK, 100µM Ac-YVAD-CHO (Calbiochem #235429) und 20µM MG132 eingesetzt. Es folgte SDS-PAGE mit großen Gelen und Western Blot Analysen (siehe 2.8.3).

2.7.7 Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Für Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen wurden Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag transfiziert. Nach 24-72 h wurden die Deckgläschen 3 mal für 5 min mit RT-warmem PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch 5-minütige Inkubation mit -20°C-kaltem Methanol fixiert. Danach wurden die Zellen nochmals 3x 5 min in PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden verkehrt herum in PBS + 2% Gelatine mit Primärantikörper (Verdünnung 1:20 – 1:400) für 1 h bei RT inkubiert. Nach PBS-Waschschritten folgte die Inkubation mit Fluoreszenz (CY3 oder FITC)-markierten Sekundärantikörpern (5µg/ml in PBS + 2% Gelatine). Diesen wurde zur Zellkernfärbung DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, 0,25µg/ml) zugesetzt. Die Deckgläschen wurden nochmals in PBS gewaschen, zum Entfernen von Salz kurz in Wasser getaucht und in *Antifade Reagent* (Molecular Probes) verkehrt herum auf Objektträgern eingebettet. Nach Trocknen üN bei RT wurden die Präparate mit Nagellack versiegelt und im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt. Die Immunfluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiovert 200M durchgeführt.

2.8 Proteinbiochemische Methoden

2.8.1 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Zur elektrophoretischen Auftrennung von gereinigten Proteinen oder Zellextrakten wurden diskontinuierliche eindimensionale *Sodium*-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen unter denaturierenden, reduzierenden Bedingungen durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Gele bestanden aus einem 5%igen Sammelgel und dem eigentlichen Trenngel, das 10-18%ig angesetzt wurde.

	Sammelgel (5%)	10% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel	18% Trenngel
0,5M Tris/HCl (pH6,8) + 1% SDS	0,66ml	-----	-----	-----	-----
1,5M Tris/HCl (pH8,8) + 1% SDS	-----	2ml	2ml	2ml	2ml
30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	0,45ml	2,6ml	3,2ml	4ml	4,8ml
Aqua dest.	1,6ml	3,4ml	2,8ml	2ml	1,2ml
TEMED (100%)	3µl	6µl	6µl	6µl	6µl
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	30µl	80µl	80µl	80µl	80µl

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinproben mit 2x (oder 4x) SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und bei 100°C für 5 min erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 1x SDS-PAGE-Laufpuffer in MiniProteanII-Apparaturen von Biorad (kleines Gel) bzw. in Apparaturen von Hoefer (großes Gel) mit einer Spannung von maximal 200V bzw. 250V. Als Größenmarker diente Prestained Protein Marker (NEB P7708S), Page Ruler Protein Ladder (Fermentas #SM0661) oder Full Range Rainbow Molecular Weight Marker (Amersham RPN800).

2.8.2 Coomassie-Färbung von SDS-PAGE-Gelen

Nach der Elektrophorese wurden SDS-PAGE-Gele in SDS-Gel-Färbelösung für 30 min bei RT gefärbt. Der nicht an Proteine gebundene Farbstoff wurde anschließend in SDS-Gel-Entfärbelösung entfernt. Ausreichend entfärbte Gele wurden auf Papier unter Vakuum bei 70°C für 50 min (*Slab Gel Dryer* von Savant) oder zwischen zwei Cellophan-Folien ün (*GelAirDryer* von Biorad) getrocknet.

2.8.3 Western Blot Analyse von SDS-PAGE-Gelen

Zur Immundetektion elektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurden diese mit Hilfe des *Semi-dry-Western-blotting*-Verfahrens auf Membranen übertragen. Hierzu wurde das SDS-PAGE-Gel nach der Elektrophorese auf eine Nitrocellulose-Membran (Protran, Schleicher&Schuell) gelegt, die sich auf einer Lage „Whatman“-Papier befand. Papier und Membran waren zuvor in Western Blot-Puffer eingeweicht worden. Über das Gel wurde noch eine Lage Whatman-Papier in Western Blot-Puffer gelegt, und die Apparatur geschlossen. Der Transfer erfolgte für 1 h bei 100mA (kleines Gel) bzw. für 4 h bei 400mA (großes Gel). Von Zelllysaten (siehe 2.7.4) wurden 80-150µg Protein auf große Gele aufgetragen, auf kleine Gele wurde maximal 40µg der Hefe-Extrakte (siehe 2.6.4) aufgetragen.

Zur Überprüfung der Transfereffizienz und als Auftragskontrolle wurden die Membranen mit PonceauS-Lösung (0,5% PonceauS in 1% Essigsäure) gefärbt. Für die Antikörper-Detektion wurden sie anschließend mit 5% Magermilchpulver in PBS-T für 1 h bei RT inkubiert, um unspezifische Wechselwirkungen des Antikörpers zu vermeiden. Es folgte eine schwenkende Inkubation mit Primärantikörper in 1% Magermilchpulver in PBS-T (2 h bei RT oder ün bei

4°C). Nach Waschen in PBS-T, wurde die Sekundärantikörper-Lösung für 1h bei RT auf die Membranen gegeben. Nach PBS-T-Waschen erfolgte bei einem HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern die Detektion mittels ECL-Lösung (Mischung gleicher Mengen ECL-Lösung 1 und 2), indem Filme belichtet wurden oder die Membran im LAS-3000-Gerät (Fujifilm Image Reader LAS-3000) eingescannt wurde. Bei AP-gekoppelten Sekundärantikörper wurde eine Detektion mit ECF-Lösung (Amersham) im Phosphoimager (Fujifilm Image Reader FLA2000) bei 473 nm (Y520 Filter) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm AIDA.

Vor der Detektion mit anderen Primärantikörpern wurde die Membran von gebundenem Antikörper entfernt. Dazu wurde sie für 1 h bei 50°C bzw. für 2 h bei RT in *Stripping*-Puffer inkubiert und nach intensivem Waschen mit PBS-T erneut mit 5% Magermilchpulver in PBS-T abgesättigt.

2.8.4 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Proteinkonzentrationen von Zellextrakten wurden photometrisch unter Verwendung von *Bio-Rad Protein Assay* (#500-0006), welches *Coomassie Brilliant Blue G250* enthält, bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt. Das Testprinzip beruht auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Eine Eichgerade wurde zuvor mit 2-16 µg BSA erstellt.

Konzentrationen gereinigter Proteine wurden mit demselben Verfahren grob abgeschätzt und photometrisch mittels UV-Absorptionsmessung unter Verwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes (Extinktion $E = \epsilon \cdot c \cdot d$) und des jeweiligen theoretischen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) bei 280nm bestimmt. Extinktionskoeffizienten wurden mit Hilfe des ExPasy Servers ermittelt (www.expasy.org/tools/protparam.html).

Da die gereinigten GST-AT3Qn-Fusionsproteine mehrere Degradationsbanden aufwiesen, wurden die ermittelten Konzentrationen durch einen Vergleich dieser Proteine mit anderen GST-AT3-Proteinen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung überprüft und gegebenenfalls durch Abschätzung der entsprechenden Bandenstärken korrigiert.

2.8.5 Expression und Reinigung von GST-Ataxin3-Fusionsproteinen

Zur Reinigung von GST (Glutathion-S-Transferase)-Ataxin3-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie wurden 1,5 l TB-Medium mit 85µg/ml Ampicillin und 50ml üN-Kultur (BL21-pGEX-6P-Ataxin3) bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. Durch Zugabe von 0,1mM IPTG wurde die Expression induziert und die Zellen für weitere 3 h bei 30°C kultiviert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation geerntet, in 40ml Puffer A (50mM Natriumphosphatpuffer pH 8, 100mM NaCl, 10% Glycerin, 1mM DTT, 1mM PMSF) resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Während des Auftauens im Wasserbad wurde Protease Inhibitor *Complete* (Roche), Benzonase, 80mg Lysozym sowie 1% TritonX 100 zugegeben. Es folgte eine schwenkende Inkubation von 30 min bei 4°C. Zur vollständigen Lyse wurde fünfmal je 30 sec im Eisbad sonifiziert (Ultraschall mit Spitze in der Bakteriensuspension). Nach Zentrifugation bei 30.000xg und 4°C für 30 min wurde der Überstand mit 2-3ml in Puffer A äquilibriertem Glutathion-Agarose-Säulenmaterial (Sigma) für 30 min schwenkend bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde in eine Säule (Ø 1cm) überführt, mit 80ml Puffer A / 1M NaCl + 1% TritonX100 und anschließend in 50ml Puffer A gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 20ml Puffer A + 20mM reduziertes Glutathion (pH 8) in 2ml-Fractionen eluiert. Mittels SDS-PAGE wurden je 15µl der Elutionsfraktionen analysiert. Die Fraktionen, in denen ausreichend Protein vorhanden war, wurden vereinigt und in Dialysepuffer (20mM Tris/HCl pH 8, 150mM KCl, 0,1mM EDTA, 10% Glycerin, 0,1mM DTT) üN, in frischem Dialysepuffer über Tag, und nochmals üN in 10K-Dialyseschläuchen (Spectra/Por) dialysiert. Bei einer Proteinkonzentration unter 3µM wurden die Proteine mittels Centriprep-10/-30 oder Centricon-10/-30 (Amicon)

ankonzentriert. Die gereinigten GST-Fusionsproteine wurden portionsweise in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.8.6 Expression und Reinigung von His₆-Fusionsproteinen

Mit einem His₆-Epitop markierte Ataxin3-Proteine wurden in BL21::DE3 [pLysS] (pProEX HTa-Ataxin3) exprimiert. Die Induktion mit 1mM IPTG in TB-Medium erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,6. Die Zellen wurden für weitere 4 h bei 30°C kultiviert. Die Zellen wurden pelletiert und in 25mM Kaliumphosphatpuffer pH 8, 500mM KCl, 20mM Imidazol, Complete-Protease-Inhibitor (ohne EDTA) resuspendiert. Nach Lysozym- und Benzonase-Behandlung wurde sonifiziert. Die Reinigung erfolgte durch Bindung des 30.000xg-Überstandes an Ni-NTA-Agarose (Qiagen), Waschen in Resuspensionspuffer und Elution mit 500mM Imidazol. Nach Dialyse gegen 20mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM NaCl folgte eine Reinigung mittels Ionenaustausch-Chromatographie mit Source 30Q (Amersham Pharmacia Biotech). Ein Stufengradient von 0 – 1M NaCl in 30mM Tris pH 7,5 wurde angelegt, wobei His₆-Ataxin3 bei etwa 0,5M NaCl eluierte. Schließlich folgte eine Gelfiltration mit einer Superdex-75 bzw. -200-Säule (Amersham Pharmacia Biotech) in 25mM HEPES/KOH pH 7,5, 5mM Mg-Acetat, 10mM K-Acetat.

His₆-p97 und His₆-Hsp104 wurden in denselben Zellen bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 mit 1mM IPTG für 4 h bei 37°C induziert. Die Zellen wurden in Lysispuffer (50mM HEPES/NaOH pH7,5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 0,1mM ATP (nur bei p97), 10% Glycerin, 1mM PMSF, Complete-Inhibitor, 0,1% TritonX100) aufgeschlossen. Während der Affinitätschromatographie mit Ni-NTA-Agarose wurde mit 1M NaCl, 50mM Imidazol gewaschen und mit Lysispuffer + 200mM Imidazol, 1mM DTT eluiert. Nach Ankonzentrieren mittels Centriprep-30 folgte eine Gelfiltration mit einer Superdex-200-Säule, wobei die Fraktionen mit hexamerem Protein gesammelt wurden. Es folgte eine Dialyse in 50mM Tris pH8, 150mM KCl, 5mM MgCl₂, 1mM DTT, 0,1mM ATP, 10% Glycerin.

2.8.7 Aufreinigung von Antikörpern aus Serum

Antiserum von einem Kaninchen gegen His₆-Ataxin3 (Sequenz von *Rattus norvegicus*) wurde mittels kovalent gebundenem GST-FLAG-Ataxin3-myc (humane Sequenz mit 22Q) an Glutathion-Agarose gereinigt. Dazu wurde 1ml Glutathion-Agarose mit 1,2mg GST-AT3Q22 für 30 min inkubiert, mit 40ml 0,2M Borat/NaOH pH 8,6 gewaschen, und nach Zugabe von 2ml DMS-Lösung (0,02M Dimethylsuberimidat in 0,2M Triethylmin/HCl pH 8,5) für 30 min bei RT geschwenkt. Der Durchlauf wurde verworfen, und das Säulenmaterial mit 10ml 0,2M Ethanolamin pH 8 für 30 min inkubiert. Nach 3x Waschen mit je 2ml 0,1M Glycin/HCl pH 2,5, wurde 3x mit 10ml TBS (20mM Tris/HCl pH 7, 150mM NaCl) gewaschen. Nach kovalenter Bindung des Antigens (GST-FLAG-Ataxin3-myc mit 22Q) am Säulenmaterial (*Crosslink*) wurde 1ml Antiserum gegen His₆-Ataxin3 auf 1xTBS eingestellt, 15 min bei 3500xg zentrifugiert, und der Überstand üN mit dem Säulenmaterial bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit 5x 10ml TBS und 2x 10ml 0,1xTBS wurde der gereinigte Antikörper mit 3x 1ml 0,1M Glycin/HCl pH 2,5 eluiert. Der pH-Wert des Eluats wurde sofort mit 2M Tris-Base auf pH 7 eingestellt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurde 0,05% BSA zugegeben und der Antikörper bei -20°C gelagert. Das Säulenmaterial wurde mit 6ml 0,1M Phosphatpuffer pH 12 sowie mit 50ml TBS gewaschen und in TBS + 0,02% Natriumazid bei 4°C aufbewahrt.

2.9 Biochemische und biophysikalische Methoden

2.9.1 Limitierte Proteolyse *in vitro*

Pro 50µl-Ansatz wurden 50µg His-AT3Q22 mit 0,0001-0,1 mg/ml ProteinaseK bzw. 0,0001-1 mg/ml Subtilisin für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine PMSF-Zugabe, um die Proteasen zu inaktivieren. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran mittels *Semi-dry-Western-blotting*-Verfahren transferiert. Die Papierlagen auf der Anodenseite sowie die Membran wurden mit 50mM Natriumborat pH 9, 20% Methanol getränkt, das Papier auf der Kathodenseite mit 50mM Natriumborat pH 9, 5% Methanol. Anschließend wurde die Membran in 0,1% *Coomassie-Brilliant-BlueR-250* in 10% Essigsäure, 40% Methanol gefärbt und danach in 10% Essigsäure, 30% Methanol entfärbt. Nach Ausschneiden der Fragmentbanden wurden diese vom Aminoende her (N-terminal) nach der Methode von Edman ansequenziert (Abteilung Lottspeich: Reinhardt Mentele).

2.9.2 *In vitro*-Aggregation

GST-Ataxin3-Fusionproteine besitzen zwischen der Glutathion-S-Transferase-Sequenz und der Ataxin3-Sequenz die Aminosäuresequenz LEVLFQGPLGS, die von der *PreScission* Protease (Amersham #27-0843-01) erkannt und zwischen dem Q und dem G geschnitten wird. Durch Zugabe der Protease wird Ataxin3 vom Fusionspartner getrennt und die Aggregationsfähigkeit von Ataxin3 kann analysiert werden.

Gereinigte GST-Ataxin3-Fusionproteine wurden typischerweise in einer Konzentration von 3µM (in Dialysepuffer bzw. verdünnt in 20mM Tris/HCl pH 8, 150mM KCl) mit 48 U/ml *PreScission* Protease versetzt und bei 30°C und 300 Upm inkubiert.

Selten wurde stattdessen eine Konzentration von 2µM GST-Ataxin3 benutzt.

Für Koaggregationsexperimente wurden geringere Mengen (0,1-0,5µM) der rekrutierten Proteine eingesetzt.

Aggregationsreaktionen mit den molekularen Chaperonen Hsp70/40 wurden generell mit ATP-regenerierendem System angesetzt, welches aus 2mM ATP, 5mM MgCl₂, 8mM Kreatin-Phosphat (Roche) und 50µg/ml Kreatin-Kinase (*rabbit muscle*, Roche) bestand.

Für die *Macromolecular Crowding*-Experimente wurde Ficoll-70 (Sigma) in 20mM Tris/HCl pH 8, 150mM KCl gelöst und in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

2.9.3 Filtertest der *in vitro*-Aggregation (*filter retardation assay*)

Zur Detektion von Aggregaten wurde ein Slot Blot Filtertest eingesetzt (Scherzinger et al., 1997), wobei Proben unter Vakuum durch eine Zelluloseacetat-Membran (Porengröße 0,2µm, Schleicher&Schuell OE66) filtriert wurden. Es folgte eine Immundetektion der auf dem Filter zurückgehaltenen SDS-resistenten Aggregate.

In vitro-Aggregationsansätze bzw. native Hefeextrakte (siehe 2.6.4) wurden mit gleichem Volumen einer 4%igen SDS / 100mM DTT-Lösung versetzt und für 5 min bei 100°C erhitzt. In Säugetierzellen gebildete Aggregate wurden mittels Zellysaten (siehe 2.7.4) untersucht, die mit 10mM Tris (pH 8) / 10mM MgCl₂ verdünnt worden waren und auf eine Endkonzentration von 2% SDS / 50mM DTT eingestellt worden waren (insgesamt 1ml Volumen). Bei *in vitro*-Aggregationsansätzen wurden mehrere, serielle 1:2-Verdünnungen durch die einzelnen Slots durchgesaugt, die 5-75pmol des GST-Fusionsproteins entsprachen. Von den Hefeextrakten wurden 10-100µg eingesetzt, von den Zellysaten 100-600µg pro Slot. Nach dem Erhitzen wurden die Proteine durch eine in 0,1% SDS äquilibrierte Membran filtriert. Die sich in der Slot Blot Apparatur (Hoefer) befindende Membran wurde mehrmals mit 0,1% SDS gewaschen und anschließend wie eine Western Blot-Membran abgesättigt und mit Antikörper-Lösung inkubiert (siehe 2.8.3). Wenn die Membran mit einem weiteren

Antikörper behandelt werden sollte, wurde sie zuvor von gebundenem Antikörper mittels *Stripping* (siehe 2.8.3) befreit.

2.9.4 Elektronenmikroskopie

Zur morphologischen Untersuchung von Ataxin3-Aggregaten wurden diese nach Aggregation ($3\mu\text{M}$ μN) mit 10mM Tris/HCl pH 8 verdünnt und durch Ultrazentrifugation bei $400.000\times g$ pelletiert. Die von Salz befreiten Aggregate wurden in Tris resuspendiert und auf Kupfer-Netzchen, die vorher mit Kohlefilm bedampft worden waren, aufgetragen. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Flüssigkeit mit einem Filterpapier entfernt und das Netzchen mit einer 2%igen Uranylacetat-Lösung überschichtet. Nach erneuter Inkubation wurde die Lösung entfernt und die Netzchen bei RT getrocknet. Alle Proben wurden im Elektronenmikroskop Philips CM12 analysiert.

2.9.5 Proteinpräzipitation über GST-Epitope (*pull down assay*)

Zum Nachweis von Protein-Interaktionen zwischen Ataxin3 und Chaperonen *in vitro* wurden $3\mu\text{M}$ GST-AT3-Proteine mit gereinigtem Hsp70 ($1,5\text{-}3\mu\text{M}$) und Hdj1 ($0,75\text{-}1,5\mu\text{M}$) sowie 2mM ATP, 5mM MgCl_2 und $0,1\%$ Ovalbumin in einem Gesamtvolumen von $50\mu\text{l}$ für 30 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von $0,5\text{U}$ Apyrase wurden die Ansätze mit $10\mu\text{l}$ Glutathion-Agarose-Säulenmaterial (Sigma) versehen. Nach 30 min Inkubation bei 4°C wurde das Material in einer sehr kleinen Plastiksäule mit 20mM Tris/HCl (pH8), 150mM KCl gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert. Die Detektion von gebundenem Hsp70 erfolgte per SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels oder Western Blot Analyse.

2.9.6 Affinitätsreinigung von Aggregaten mittels Ni-NTA-Agarose

Zur Reinigung von Koaggregaten, die His₆-Ataxin3-Protein rekrutiert hatten, wurden *in vitro*-Aggregationsreaktionen mit $50\mu\text{l}$ Ni-NTA-Agarose (Qiagen) für 30 min inkubiert. Das Säulenmaterial wurde 5mal mit 20mM Tris/HCl (pH8), 2% SDS, 1M NaCl, 6M Harnstoff für 1 h schwenkend gewaschen. Gebundene Komplexe wurden mit 20mM Tris/HCl (pH8), 2% SDS, 1M NaCl, 200mM Imidazol eluiert und im Filtertest oder für das Auflösen mit Ameisensäure verwendet.

2.9.7 Auflösen von Aggregaten mit Ameisensäure

Vorversuche hatten gezeigt, daß Ameisensäure die *in vitro*-gebildeten 257cQ71-Aggregate auflöst (Filtertest), ohne die Peptidbindungen im Protein zu hydrolysieren (Western Blot Analyse).

Zellysate ($200\text{-}600\mu\text{g}$) wurden nach Benzonase-Behandlung (siehe 2.7.4) mit 2% SDS versetzt, 10 min bei RT inkubiert und SDS-resistente Aggregate bei $400.000\times g$ und 30°C für 1 h in Säure-festen Polyallomer-Zentrifugenröhrchen pelletiert. Mittels Ni-NTA-Agarose gereinigte Co-Aggregate (siehe 2.9.6), die sich in Elutionspuffer mit 2% SDS befanden, wurden ebenso zentrifugiert. Die Überstände wurde verworfen und die Pellets mit $100\mu\text{l}$ 100%iger Ameisensäure für 3 h bei 37°C und 700Upm inkubiert (Hazeki et al., 2000). Durch Vakuum und Erhitzen (*Speedvac*) wurden die Proben getrocknet, mit SDS-PAGE-Probenpuffer versetzt und mit Tris-Base neutralisiert. Western Blot Analysen wurden durchgeführt.

2.9.8 *In vitro*-Proteolyse mit Calpain II

Gereinigte Ataxin3-Proteine wurden mit gereinigtem Calpain II (Ratte, rekombinant aus *E. coli*, Calbiochem #208718) in 20mM HEPES/KOH pH 7,6, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM DTT, 1mM CaCl₂ für 5 - 30 min bei 22°C inkubiert. GST-AT3Q22 wurde, wenn erwähnt, für 30 min mit PP bei RT vorinkubiert und dann erst zugegeben.

Zum N-terminalen Ansequenzieren (Edman-Sequenzierung von Proteinen, siehe 2.9.1) der erhaltenen Fragmente wurden diese nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert (2-3 h bei 60mA pro kleinem Gel). Kontrollexperimente wurden mit Aktin (Sigma A2522 *rabbit muscle*) sowie TATA-Bindungsprotein (His₆-HA-TBP-38Q, rekombinant aus *E. coli*) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse des Aggregationsverhaltens verschiedener Ataxin3-Fragmente

3.1.1 Ataxin3-Aggregation *in vitro*

Für das Protein Huntingtin (Htt)-Exon1 mit pathologischem polyQ-Bereich ist bekannt, daß es sich aufgrund seiner starken Aggregationsneigung nicht rekombinant aus *E. coli* reinigen läßt. Wanker und Kollegen lösten dieses Problem, indem sie Htt-Exon1 als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimierten (Scherzinger et al., 1997). Eine Protease-Schnittstelle zwischen dem GST- und dem Htt-Fusionspartner ermöglicht es, Htt-Exon1 nach Reinigung des Fusionsproteins freizusetzen. Die gezielte Spaltung stellt somit den Anfang der Aggregationsreaktion dar. Man geht dabei davon aus, daß die *in vitro* gebildeten Aggregate mit denen aus Htt-transgenen Mäusen und humanen HD-Gehirnen (Huntington-Erkrankung) biochemisch vergleichbar sind (Filtertest, Elektronenmikroskopie) (Scherzinger et al., 1997; Diaz-Hernandez et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurden zur Untersuchung des *in vitro*-Aggregationsverhaltens von Ataxin3 (AT3) ebenfalls GST-Fusionsproteine hergestellt. Volllängenproteine mit 22, 43 und 71 Glutaminen (AT3Qn) wurden mit einem N-terminalen FLAG-Epitop und einem C-terminalen myc-Epitop versehen (Abb.3-1a). Eine AT3-Glutaminlänge von 22 und 43Q liegt im normalen Bereich, 71Q jedoch im pathologischen Bereich (siehe 1.1.1). Um zu überprüfen, ob auf die polyQ-Erkrankung SCA3 (Spinocerebellare Ataxie 3) die *toxic fragment*-Hypothese zutrifft, die besagt, daß eine Fragmentierung des polyQ-Volllängenproteins die Voraussetzung für dessen Aggregation ist (siehe 1.3.1), wurden GST-Fusionsproteine von C-terminalen AT3-Fragmenten (257cQn) hergestellt. M(257)QGS wurde als Start der C-terminalen Fragmente ausgewählt, da es in Mensch, Maus, Ratte und Huhn konserviert ist und laut Sekundärstruktur-Vorhersageprogramm (Internetseite: Pole Bioinformatique Lyonnais) am Übergang einer *coiled coil*-Domäne (superspiralisierte α -Helices) zu einer *random coil*-Region (vom Zufall bestimmte Knäuelkonformation) liegt. Die Fragmente (257cQn) mit 22, 43 und 71 Glutaminen wurden mit einem C-terminalen myc-Epitop zur immunologischen Detektion markiert (Abb.3-1a). Abbildung 3-2a zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der gereinigten GST-AT3-Fusionsproteine mit 22, 43 und 71Q. Konstrukte mit 121Q konnten kloniert werden, die GST-Fusionsproteine AT3Q121 und 257cQ121 ließen sich aufgrund der langen polyQ-Bereiche jedoch nicht als lösliche Proteine reinigen (Daten nicht gezeigt). N-terminale Abbauprodukte der GST-AT3Qn-Fusionen konnten in SDS-PAGE (Abb.3-2a) und

Ergebnisse

in Western Blot Analysen mit anti-GST-Antikörper (Daten nicht gezeigt) detektiert werden, was erklärt, warum sie zusammen mit den GST-AT3-Fusionsproteinen via Glutathion-Agarose gereinigt wurden.

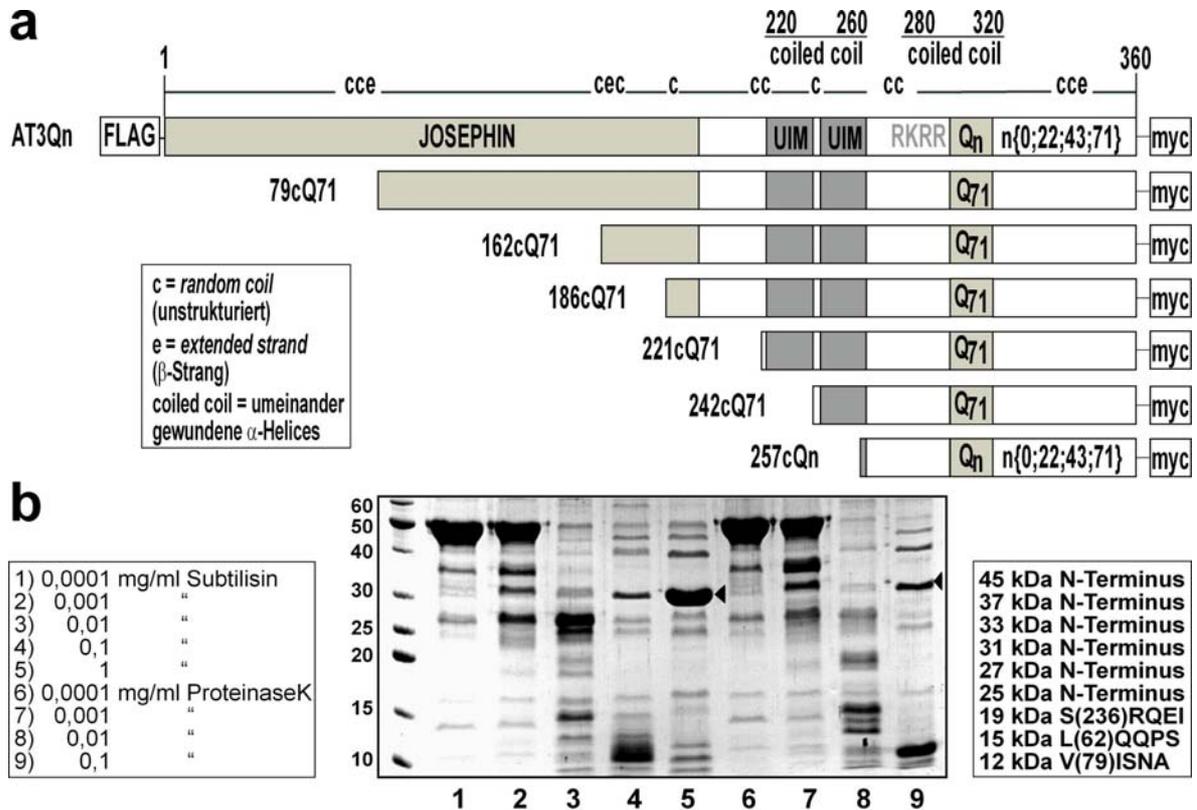


Abbildung 3-1: a) Schematische Darstellung der verwendeten Ataxin3 (AT3)-Konstrukte. Volllängenproteine (AT3Qn) besitzen ein N-terminales FLAG- sowie ein C-terminales myc-Epitop. C-terminale Deletionsmutanten wurden mit der beginnenden Aminosäure und einem „c“ benannt (z.B. 79c) und besitzen ein C-terminales myc-Epitop. Die Josephin-Domäne, beide UIMs (Ubiquitin-Interaktions-Motive), das putative Kernlokalisations-Signal mit der Sequenz RKRR und der polyQ-Bereich (Qn) mit einer Länge von 0, 22, 43 oder 71 Glutaminen sind dargestellt. Über den Konstrukten wurden die in Strukturvorhersagen als unstrukturierte (c) sowie β -Strang-ähnliche Regionen (e) gedeuteten Bereiche sowie die beiden *coiled coils* aufgelistet. Die angegebene Aminosäurennummerierung bezieht sich auf das Wildtyp-Protein mit 22 Glutaminen. b) Limitierte Proteolyse mit Subtilisin und ProteinaseK. Zunehmende Mengen der beiden Proteasen (siehe Kasten links, siehe Pfeile in der Abbildung) wurden mit His-AT3Q22 inkubiert, nach SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Coomassie angefärbt. Einzelne AT3-Fragmentbanden wurden ausgeschnitten, und deren Aminotermini mittels Sequenzierung identifiziert (siehe Kasten rechts).

Wie von anderen Gruppen bereits beschrieben (Preisinger et al., 1999), fand sich eine reduzierte elektrophoretische Mobilität der polyQ-Proteine bei der SDS-PAGE und somit ein nicht der Molekülmasse entsprechendes Laufverhalten. Zum Beispiel betrug die errechnete Molekülmasse von GST-AT3Q71 etwa 77 kDa, das Protein lief aber im Vergleich zum Größenmarker in der SDS-PAGE bei 90-100 kDa. Das Protein GST-257cQ71 war laut Berechnung 46 kDa groß, lief aber bei 55 kDa (Abb.3-2a).

Zwischen den Fusionspartnern GST und AT3 befand sich die Erkennungsequenz der *PreScission* Protease (PP). Zunächst wurde per SDS-PAGE die benötigte PP-Menge

Ergebnisse

bestimmt, die zu einer >90%igen GST-AT3-Spaltung innerhalb von 30 min führte. Die ermittelte und in allen folgenden Experimenten eingesetzte PP-Menge (siehe 2.9.2) resultierte in einer 50%igen Spaltung innerhalb von 10 min. Ohne PP-Zugabe waren die GST-AT3-Fusionsproteine über Nacht stabil (Daten nicht gezeigt). Eine typische Eigenschaft der *in vitro*- und *in vivo*- gebildeten polyQ-Aggregate (Hefe, transgene Mäuse (Scherzinger et al., 1997), humane HD-Gehirne (Diaz-Hernandez et al., 2004)) ist ihre Resistenz gegen das denaturierende Detergens Natrium-Docecylsulfat (SDS). Daher wurden die gereinigten GST-AT3-Proteine über Nacht mit PP inkubiert und mittels Slot Blot Filtertest (*filter retardation assay*) auf SDS-resistente Aggregation untersucht (Scherzinger et al., 1997). Die Detektion der auf der Membran zurückgehaltenen Aggregate erfolgte mit anti-myc-Antikörper. Die Volllängenproteine AT3Qn zeigten unabhängig von der Länge des polyQ-Bereichs keine Aggregation, ebenso die C-terminalen Fragmente 257cQ22 und 257cQ43. Das 257cQ71-Fragment aggregierte jedoch stark (Abb.3-2a). Eine Inkubation der ungeschnittenen Proteine (ohne Zugabe von PP) führte zu keiner Aggregation. SDS-PAGE zeigte, daß die PP die Erkennungsstelle zwischen GST und AT3 spezifisch spaltete, und nicht in der GST- oder AT3-Sequenz schnitt (Daten nicht gezeigt). Demnach stimmt der für die *in vitro*-Aggregation bestimmte Schwellenwert mit dem für die SCA3-Erkrankung beobachteten Schwellenwert überein: Menschen mit 22Q und 43Q zeigen keine Symptome, während Menschen mit 71Q im AT3-Protein erkranken (siehe Tabelle 1-1 in 1.1.1). Außerdem stützt die beobachtete *in vitro*-Aggregation die *toxic fragment*-Hypothese (siehe 1.3.1), da das Volllängenprotein mit pathologischem polyQ-Bereich nicht aggregiert, ein 71Q-Fragment jedoch aggregationskompetent ist.

Um zu klären, wie kurz die 71Q-enthaltenden Fragmente sein müssen, um noch aggregieren zu können, sollten weitere C-terminale AT3-71Q-Fragmente hergestellt werden. Um zusätzlich zu Sekundärstrukturvorhersagen (Pole Bioinformatique Lyonnais) Informationen über die AT3-Struktur zu bekommen, wurde eine limitierte Proteolyse mit His₆-AT3Q22 und Subtilisin bzw. Proteinase K durchgeführt (Abb.3-1b). Limitierte Proteolysen geben Auskunft über die Konformation von Proteinen wie z.B. über das Vorkommen von Proteindomänen, da die Schnittstellen vorwiegend in Proteinbereichen erhöhter Flexibilität liegen (Fontana et al., 2004). Die N-terminale Ansequenzierung der entstandenen AT3-Spaltungsprodukte zeigte, daß häufig N-terminale AT3-Fragmente generiert wurden. Der C-Terminus von AT3 war demnach von den Proteasen abgebaut worden, wohingegen N-terminale Fragmente der Josephin-Domäne relativ stabil waren. Diese Beobachtung wurde ebenfalls von anderen Autoren gemacht, die zeigten, daß AT3 aus einer globulären Josephin-Domäne sowie einem

Ergebnisse

unstrukturierten C-terminalen Bereich besteht (Masino et al., 2003). Zusätzlich zu den sechs Fragmenten mit AT3-N-Terminus konnten drei weitere Fragmente mit den N-terminalen Sequenzen L(62)QQPS, V(79)ISNA und S(236)RQEI identifiziert werden (Abb.3-1b). In der Strukturvorhersage liegt die Sequenz LQQPS am Übergang einer Helix zu einer zufällig verknäuelten Region (*random coil*), die Sequenz VISNA befindet sich am Ende einer β -Strang (*extended strand*)-ähnlichen Region und am Anfang einer Helix, und die Sequenz SRQEI liegt zwischen zwei Helices, die den beiden UIMs (223-240 und 243-260) entsprechen, welche als *coiled coil*-Struktur (~220-260) vorhergesagt wurden (Abb.3-1a, siehe auch 1.1.4). Nach Abschluß der hier dargestellten Arbeit wurden NMR-spektroskopische Daten veröffentlicht, welche die atomare Struktur der Josephin-Domäne aufklärten (Nicastro et al., 2005). Die identifizierten α -Helices (siehe Abb.1-2) bestätigen die in dieser Arbeit zu Rate gezogenen, relativ groben Sekundärstrukturvorhersagen.

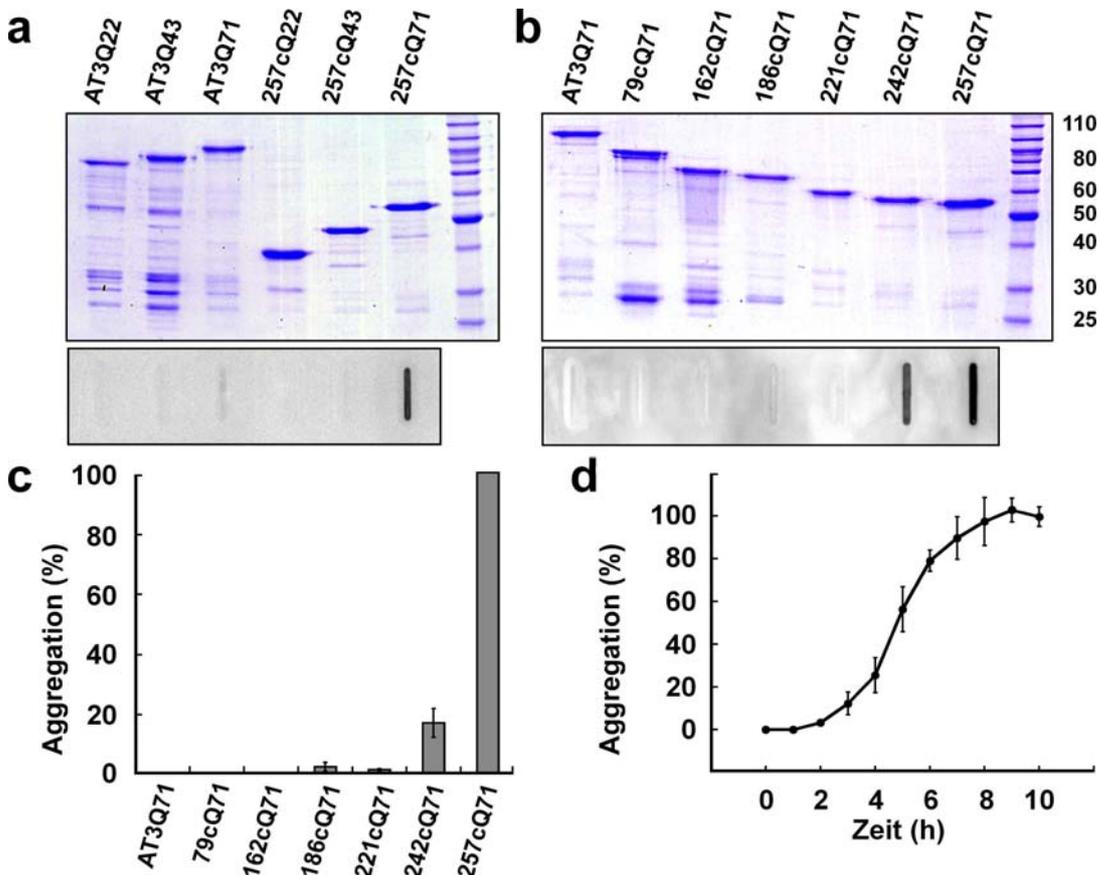


Abbildung 3-2: Analyse der SDS-resistenten *in vitro*-Aggregation mittels Filtertest

a/b) oben: SDS-PAGE der gereinigten GST-AT3-Proteine (Coomassie gefärbt). a/b) unten: Filtertest (anti-myc) der Aggregationsansätze (3 μ M, Zugabe von PP, über Nacht, 30°C). c) Quantifizierung der Filtertests (anti-myc) von seriellen Verdünnungen der Aggregationsansätze. d) 257cQ71-Aggregation (siehe c; Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 Experimenten).

Ergebnisse

Neben dem C-terminalen Fragment 79cQ71 mit Start Val79 wurden weitere AT3-71Q-Fragmente konstruiert, die alle im Vergleich zu 257cQ71 schrittweise an deren N-Terminus verlängert waren. I(162)FVVVK wurde als *extended strand*-Bereich vorhergesagt, und das 162cQ71-Fragment entspricht etwa der Hälfte der AT3-Sequenz. Bei den Fragmenten 186cQ71, 221cQ71 und 242cQ71 konnte ein in der AT3-Sequenz enthaltenes Methionin als Start-Codon verwendet werden (M(186)HRPK, M(221)LDEDE, M(242)EDEEA). Das Fragment 221cQ71 beginnt kurz vor der *coiled coil*-Region (~220-260) und enthält beide UIMs, 242cQ71 enthält nur die eine der beiden UIMs, während 257cQ71 keine UIM besitzt (Abb.3-1a). An alle AT3-Fragmente wurde ein C-terminales myc-Epitop angehängt.

Abbildung 3-2b zeigt ein Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel der gereinigten GST-AT3-71Q-Fragmente. Im Filtertest zeigte zusätzlich zu 257cQ71 nur ein weiteres Fragment, 242cQ71, das 15 Aminosäuren länger war als das bisher getestete Fragment (257cQ71), SDS-resistente Fibrillen (Abb.3-2b). Bei allen anderen AT3-71Q-Fragmenten war keine Aggregation im Filtertest nachweisbar. Selbst eine Erhöhung der Konzentration von 186cQ71 und 221cQ71 auf 24µM verstärkte die Aggregation nicht (Daten nicht gezeigt). Zur Quantifizierung der Aggregation wurden serielle 1:2-Verdünnungen der Proben im Filtertest eingesetzt, und die Phosphoimagesignale im linearen Bereich ausgewertet. Es zeigte sich, daß 242cQ71 nur zu 20% im Vergleich zu 257cQ71 aggregierte (Abb.3-2c).

Die zeitliche Zunahme der fibrillären Aggregate von 257cQ71 ist in Abb.3-2d dargestellt. Nach 2 h waren erste SDS-resistente Fibrillen auf dem Filter detektierbar (*Lag*-Phase). Die Aggregationskurve zeigte danach eine logarithmische Phase (2-8 h) und erreichte ihr Plateau nach 9-10 h. Diese experimentell-bestimmte 257cQ71-Aggregationskurve ist typisch für nukleationsabhängige Polymerisationen, wobei ein „Nukleus“ (*seed* = Aggregationskeim) als Startmolekül benötigt wird, an den sich weitere Proteine anlagern und aggregieren können (siehe 1.1.2). Typisch für amyloide, nukleationsabhängige Aggregationen ist eine Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinkonzentration und eine *Lag*-Phase, die hier detektiert wurde.

Um zwischen der Bildung SDS-resistenter und SDS-löslicher Aggregate zu unterscheiden, wurden verschiedene AT3-Proteine mit PP versetzt und entweder sofort (Zeitpunkt t_0) mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt oder für 20 h inkubiert und anschließend bei 20.000xg zentrifugiert. Nach Trennung der Überstand- und Pelletfraktionen wurden die Proben mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt und eine Western Blot Analyse durchgeführt. SDS-lösliche Aggregate sollten mit dieser Methode zunächst pelletiert werden, dann jedoch durch SDS-Zugabe in die monomeren Proteine dissoziiert werden. Man erwartet also eine Monomer-

Ergebnisse

Bande in der Pelletfraktion. Ein Vergleich der Zeitpunkte t_0 mit Überstand- und Pelletfraktionen nach 20 h ergab, daß nur sehr wenig monomeres Protein in den Pelletfraktionen detektierbar war, was darauf hindeutet, daß bei sämtlichen AT3-Fragmenten nach 20 h kaum SDS-lösliche Aggregate vorhanden waren (Abb.3-3a).

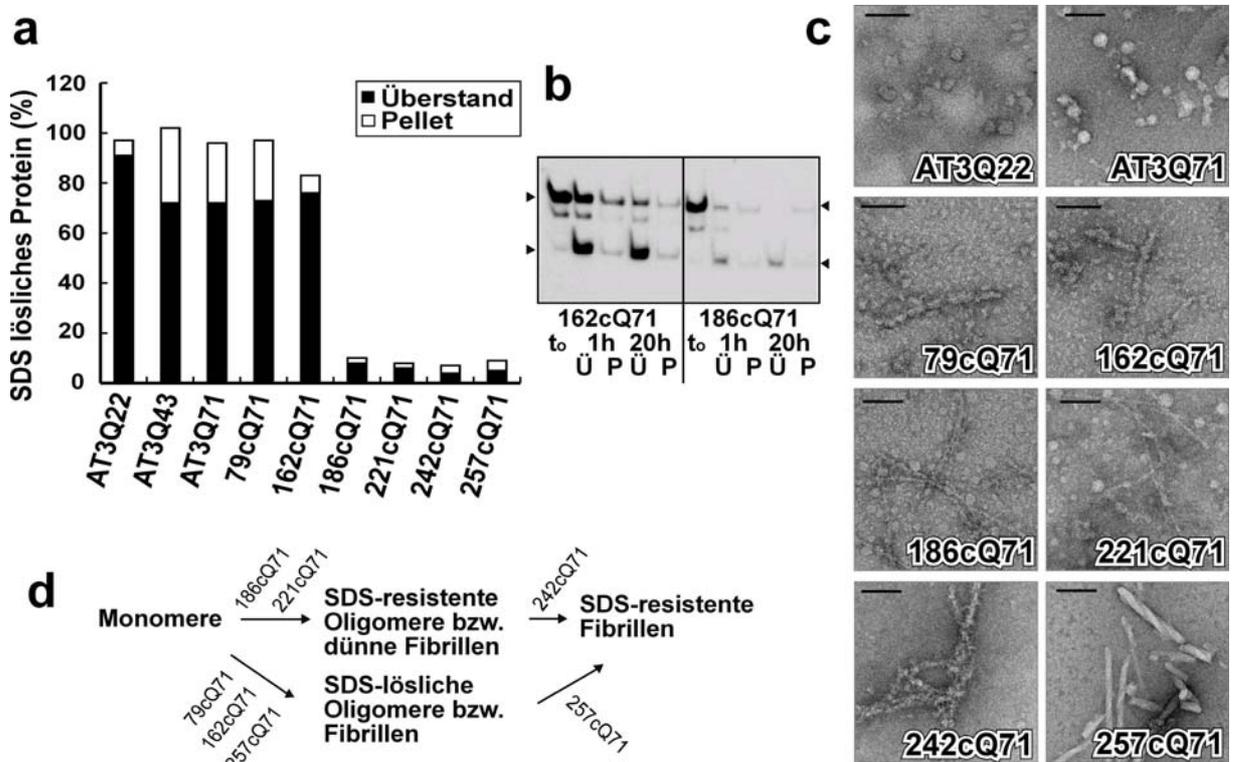


Abbildung 3-3: SDS-Löslichkeit und Fibrillen-Bildung verschiedener AT3-Konstrukte *in vitro*.

a) Aggregationsansätze ($3\mu\text{M}$) wurden entweder sofort nach Zugabe von PP mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt (t_0) oder nach einer 20 h-Inkubation für 10 min bei $20.000\times g$ zentrifugiert, und die getrennten Überstand- und Pellet-Fraktionen mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt. In Western Blot Analysen (anti-myc) wurden die Banden von ungeschnittenem GST-AT3 und freiem AT3 (= SDS-lösliches Protein) quantifiziert. Die AT3-Menge zum Zeitpunkt t_0 wurde als 100% gesetzt. b) SDS-lösliches GST-AT3 und freies AT3 (Pfeile) zum Zeitpunkt t_0 , nach 1 h und 20 h Aggregation (siehe a). c) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von über Nacht-aggregierten AT3-Proteinen, welche (ohne Zugabe von SDS) bei $400.000\times g$ pelletiert wurden. Balken stellen 100 nm dar. d) Aggregationsmodell für verschiedene 71Q-enhaltende AT3-Fragmente.

Interessanterweise waren die Fragmente 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 gleichermaßen nur noch zu circa 10% SDS-löslich (Abb.3-3a). Dies legt nahe, daß die Fragmente 186cQ71 und 221cQ71, die kein Signal im Filtertest zeigten (siehe Abb.3-2b), trotzdem zu SDS-resistenten Aggregaten (Oligomeren oder dünnen Fibrillen), die nicht mehr in das SDS-Polyacrylamid-Gel hineinlaufen konnten, aggregierten. Durch den geringen Größenunterschied von 24 Aminosäuren waren 162cQ71 und 186cQ71 in der Western Blot Analyse gut vergleichbar und zeigten bereits nach 1 h einen deutlichen Unterschied in der SDS-Löslichkeit (Abb.3-3b). In einem Kontrollexperiment wurden dieselben GST-AT3-Fusionsproteine wie in Abb.3-3a ohne Zugabe von PP für 0 h bzw. 20 h inkubiert. In Western

Ergebnisse

Blot Analysen (anti-myc) wurde bei allen Ansätzen etwa 100% des Ausgangsmaterials detektiert (Daten nicht gezeigt), was zeigt, daß die Proteine einschließlich der myc-Epitope innerhalb der 20 h Inkubation nicht abgebaut wurden, und daher das in Abb.3-3a gezeigte Ergebnis nicht das Resultat eines proteolytischen Abbaus der Proteine 186cQ71 – 257cQ71 war.

Morphologisch lassen sich amyloide und amyloid-ähnliche Aggregate durch ihre fibrilläre Form charakterisieren und weisen einen Durchmesser von 10 - 50 nm auf (Sunde et al., 1997; Scherzinger et al., 1997; Litvinovich et al., 1998; Lansbury, 1999; Serpell et al., 2000; Heiser et al., 2000; Muchowski et al., 2000; Rochet and Lansbury, 2000; Fandrich et al., 2001; Chen et al., 2002a; Poirier et al., 2002; Serag et al., 2002; Diaz-Hernandez et al., 2004). Amyloide A β -Fibrillen (Alzheimer-Erkrankung) sollen aus fünf bis sechs parallel angeordneten Protofilamenten bestehen (Serpell, 2000).

Eine Untersuchung der *in vitro*-gebildeten AT3-Aggregate im Elektronenmikroskop (ohne SDS-Behandlung) ergab bei 257cQ71 einzelne Fibrillen bzw. Bündel von zwei bis drei umeinander gewundenen Fibrillen, die einen Durchmesser von 9 bzw. 18-27 nm und eine Länge von mehreren 100 nm erreichten (Abb.3-3c). 242cQ71 zeigte ebenfalls Fibrillen, die jedoch weniger geordnet erschienen und eine rauhe Oberfläche hatten. Bei 186cQ71 und 221cQ71 wurden ebenfalls Fibrillen detektiert, die jedoch wesentlich dünner waren als die bei 242cQ71. Selbst bei 79cQ71 und 162cQ71 zeigten sich wenige kurze Fibrillen. Die Vollängenproteine AT3Q22 und AT3Q71 bildeten Klumpen-ähnliche Strukturen (Abb.3-3c). Zusammenfassend kann man ein Aggregationsmodell (Abb.3-3d) für AT3-Fragmente postulieren, in dem von einem Monomer eine Aggregation hin zu SDS-resistenten Oligomeren bzw. dünnen Fibrillen möglich ist, vorausgesetzt die Sequenz außerhalb der polyQ-Sequenz besitzt eine gewisse Länge (186cQ71, 221cQ71). Für polyQ-Fragmente mit relativ kurzer zusätzlicher Sequenz (242cQ71, 257cQ71) bleibt die Aggregation nicht auf diesem Niveau stehen, sondern es bilden sich größere SDS-resistente Fibrillen, die im Filtertest detektiert werden können. PolyQ-Fragmente mit relativ langer zusätzlicher Sequenz (79cQ71, 162cQ71) bilden SDS-lösliche fibrilläre Strukturen, die jedoch bei 20.000xg nicht pelletierbar sind. In Koaggregationsstudien mit 257cQ71 ließen sich außer den SDS-resistenten Fibrillen auch SDS-lösliche Aggregate nachweisen (pelletierbar bei 20.000xg), die als Intermediate in der Aggregationsreaktion auftraten (siehe Abb.3-17a, c).

3.1.2 Ataxin3-Aggregation in *Saccharomyces cerevisiae*

Zur *in vivo*-Analyse der AT3-Aggregation wurde ein Hefemodellsystem in *Saccharomyces cerevisiae* etabliert. Es wurden die Wildtyp-Stämme JN54 und YPH499 ausgewählt. Zur Überexpression von AT3 wurden die *in vitro*-Konstrukte ohne GST (Abb.3-1a) in Vektoren mit Kupfer-induzierbaren Promotoren (pSI215, YEp105) kloniert. Nach Induktion mit CuSO₄ und 24 h Expression wurden native Hefe-Extrakte hergestellt und Filtertests durchgeführt. Die Volllängenproteine zeigten unabhängig von der polyQ-Länge keine Aggregation. Im Gegensatz zu den größeren 71Q-Fragmenten (186cQ71, 221cQ71, 242cQ71) zeigte das kürzeste Fragment 257cQ71 starke Aggregation, die als SDS-resistentes Material auf dem Filter zurückgehalten wurde (Abb.3-4a). Das Fragment 257cQ22 zeigte keine Aggregation, 257cQ43 jedoch aggregierte wie 257cQ71. Western Blot Analysen bestätigten die Expression der AT3-Proteine (242cQ71 nur sehr schwach) und zeigten bei allen Proteinen mit pathologischer 71Q-Bereich, sogar beim Volllängen-AT3Q71, SDS-resistentes Material in den Taschen des Sammelgels (Abb.3-4d).

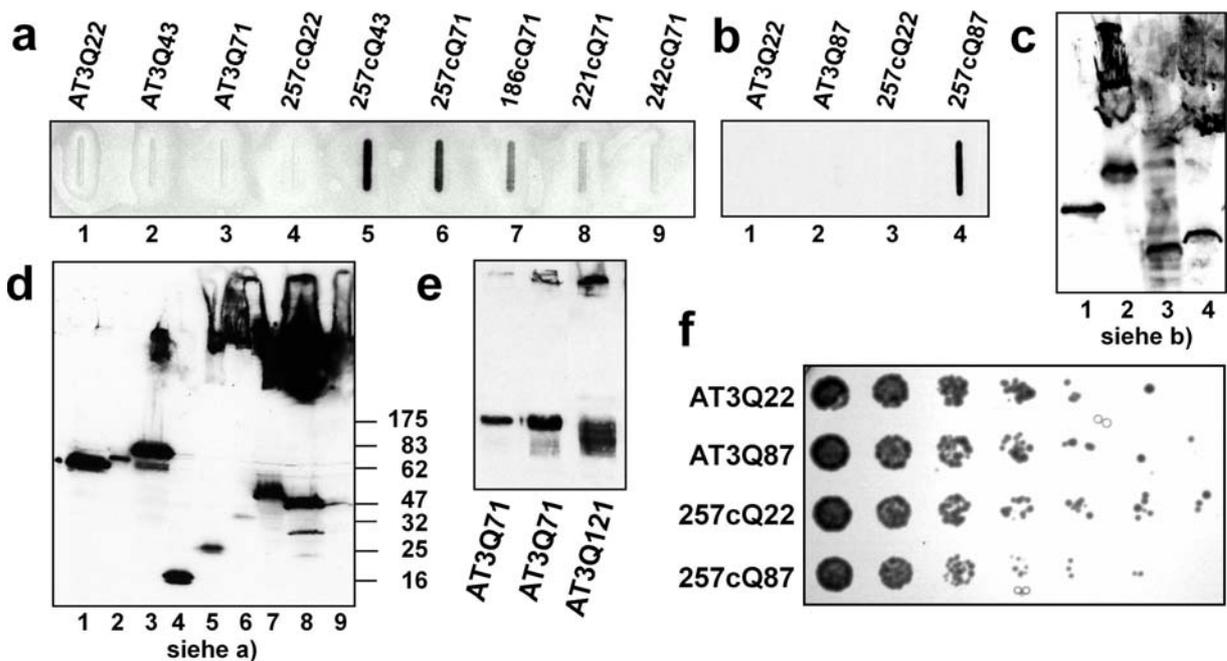


Abbildung 3-4: SDS-resistente Aggregation in Hefe.

a) Die AT3-Expression wurde durch Inkubation der Hefen (YPH499, pSI215) mit CuSO₄ für 24 h induziert. Filtertest (anti-myc) der nativen Hefe-Extrakte (inkl. 1% Triton-X100 zur Solubilisierung der Kernmembran). b) YPH499, YEp105mut1 (sonst wie a). c-d) Western Blot Analysen (anti-myc) inklusive Taschen des Sammelgels. e) Western Blot Analyse (anti-myc) nach 24 h Expression (JN54, pSI215). f) Hefe-Vitalitätstest: serielle Verdünnungen von mit CuSO₄-induzierten Flüssigkulturen (YPH499, YEp105mut1) wurden auf -TRP-Agarplatten (+CuSO₄) aufgetropft und bis zum sichtbaren Wachstum der Hefen bei 37°C inkubiert. Bei Q87 handelte es sich um alternierende CAACAG-Codons (siehe Anhang), sonst um reine CAG-Codons.

Ergebnisse

Wie bereits in der Literatur beschrieben (Michalik et al., 2001; Krobtsch and Lindquist, 2000), benötigt man alternierende CAA CAG-Wiederholungen, um eine Verkürzung des polyQ-Bereichs auf DNS-Ebene in Hefen zu verhindern. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt, da das AT3Q121-Protein aus reinen CAG-Wiederholungen in Western Blot Analysen ein Laufverhalten ähnlich dem des AT3Q71 zeigte (Abb.3-4e). Um sicherzustellen, daß die Verkürzung auf DNS- und nicht auf Protein-Ebene stattgefunden hatte, wurde die Plasmid-DNS aus fünf verschiedenen AT3Q121-Hefe-Klonen isoliert und die Anzahl der CAG-Wiederholungen durch Sequenzierung bestimmt. Es zeigte sich, daß 121 CAG-Wiederholungen auf 24, 64, 71, 72 bzw. 81 CAG-Wiederholungen verkürzt worden waren, weshalb keine weiteren Experimente mit den AT3Q121- und 257cQ121-Konstrukten durchgeführt wurden. Eine Sequenzierung von aus Hefen isolierten AT3Q71-Plasmiden ergab nur in einem von vier Fällen eine Verkürzung (auf Q43), weshalb mit den 71 CAG-Konstrukten weitergearbeitet wurde. Außerdem wurden die Konstrukte AT3Q87 und 257cQ87 mit alternierenden CAA CAG-Wiederholungen kloniert (siehe 2.5.11 und Anhang). In Western Blot Analysen zeigte AT3Q87 SDS-resistentes Material in den Taschen des Sammelgels (Abb.3-4c), in Filtertests konnten jedoch keine SDS-resistenten Fibrillen detektiert werden (Abb.3-4b). Wie erwartet zeigte 257cQ87 Aggregation im Filtertest (Abb.3-4b). Um festzustellen, ob die Expression von 257cQ87 in Toxizität und damit in einem verlangsamten Hefe-Wachstum resultiert, wurden Hefe-Vitalitätstests (Tropftests) durchgeführt, in denen das Plasmid YEp105mut1 verwendet wurde, welches im Vergleich zu pSI215 in einer stärkeren Expression resultiert (Daten nicht gezeigt). Die AT3-Expression wurde mit CuSO₄ in Flüssigkultur bei 30°C oder 37°C für 24 h oder länger induziert. Serielle Verdünnungen der Hefekulturen wurden auf Kupfer-enthaltende Selektionsplatten pipettiert. Die Agarplatten wurden bis zum sichtbaren Wachstum der Hefen bei 30°C bzw. 37°C inkubiert. Es konnte jedoch kein Unterschied im Wachstum zwischen den AT3Q22, AT3Q87, 257cQ22 und 257cQ87-exprimierenden Kulturen festgestellt werden (Abb.3-4f).

3.1.3 Ataxin3-Aggregation in Neuroblastomazellen

Zur weiteren *in vivo*-Analyse der AT3-Aggregation wurden Neuroblastomazellen verwendet, die der Situation im menschlichen Gehirn besser entsprechen sollten als Hefemodelle. Die hier beschriebenen Experimente wurden mit murinen N2a-Zellen und humanen SH-SY5Y-Zellen durchgeführt, die jeweils gut charakterisierte und bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen verwendete Modellsysteme sind (Yadavalli et al., 2004; Neumar et al., 2003;

Ergebnisse

Zander et al., 2001; Cooper et al., 1998; Goti et al., 2004; Peters et al., 1999; Tait et al., 1998). Zur Überexpression von AT3 wurden die bisher verwendeten Konstrukte ohne GST (Abb.3-1a) in Expressionsvektoren für Säugetierzellen mit CMV-Promotoren (pcDNA3.1hygro+, pTRE2hyg) kloniert. Nach transienter Transfektion wurden die N2a-Zellen für 48 h kultiviert und Zelllysate hergestellt. Western Blot Analysen bestätigten die Expression aller Konstrukte (Abb.3-5b). In Filtertests wurde die Aggregationsfähigkeit bestimmt. Wie *in vitro* wurde bei den Volllängen-AT3-Proteinen und den Fragmenten 257cQ22, 257cQ43 und 79cQ71 keine bzw. nur schwache SDS-resistente Aggregation auf dem Filter detektiert (Abb.3-5a und Daten nicht gezeigt). Die Fragmente 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 jedoch aggregierten gleichermaßen stark, 162cQ71 etwas schwächer. Bei Expression von 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 zeigten N2a-Lysate in Western Blot Analysen außer den erwarteten Fragmenten zusätzliche Banden von kleinerer Molekülmasse (Abb.3-5b), was darauf schließen läßt, daß die 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71-Fragmente proteolytisch verkürzt wurden und schließlich in der Größe von 257cQ71 aggregationsfähig wurden (siehe Abb.3-25c).

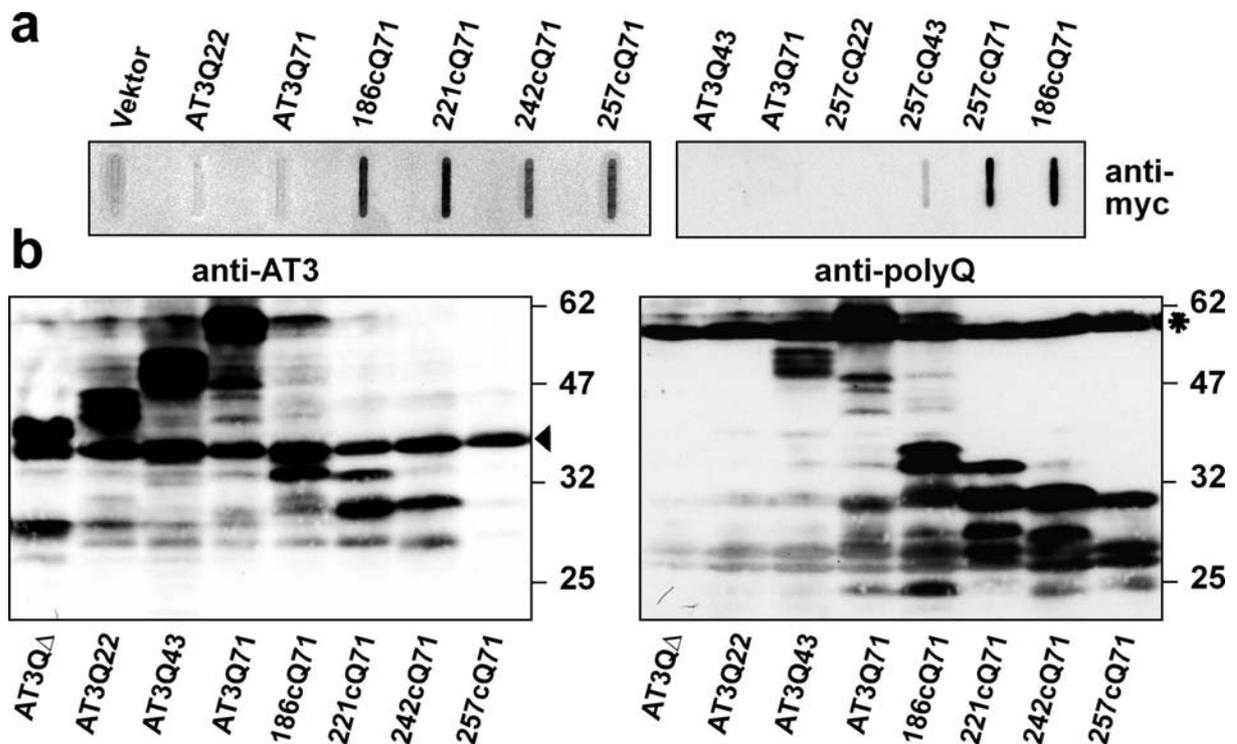


Abbildung 3-5: Expression und SDS-resistente Aggregation in N2a-Zellen.

a) Nach transienter Transfektion von N2a-Zellen (pcDNA3.1) und 48 h Expression wurden Filtertests (anti-myc) durchgeführt. b) Western Blot Analysen (anti-AT3 / anti-polyQ) nach 60 h Expression. Der Pfeil an der linken Abbildung markiert das endogene Maus-Ataxin3-Protein der N2a-Zellen. Der Stern an der rechten Abbildung markiert ein endogenes, nicht identifiziertes polyQ-Protein.

Ergebnisse

Die Morphologie und Lokalisation der Aggregate in N2a-Zellen wurde mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie bestimmt. Die Zellen wurden 24 h nach transients Transfektion fixiert, dann wurden AT3-Proteine mit Antikörpern und Zellkerne mit DAPI angefärbt. Die Transfektionseffizienz betrug circa 20%. Die Vollängen-Ataxine AT3Qn sowie die Fragmente 257cQ22 und 257cQ43 befanden sich in der gesamten Zelle verteilt im Cytoplasma und Nukleus (Abb.3-6 und Daten nicht gezeigt). Die Fragmente 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 zeigten gleichermaßen mehrere punktförmige Proteinablagerungen (Einschlüsse), die überwiegend im Zellkern oder perinukleär vorkamen (Abb.3-6). Die Konstrukte, für die in den Filtertests keine SDS-resistenten Fibrillen detektiert wurden, zeigten auch in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie keine Einschlüsse, was darauf hinweist, daß keine SDS-löslichen Aggregate in den Zellen vorlagen.

Die *toxic fragment*-Hypothese (siehe 1.3.1) konnte wie *in vitro* untermauert werden, da 71Q-Fragmente aggregierten, das Vollängenprotein AT3Q71 jedoch nicht. Da Aggregation von 257cQ71 detektiert wurde, jedoch nicht von 257cQ43, kann festgestellt werden, daß Neuroblastomazellen als Modell für das Aggregationsverhalten von Ataxin3 im Gehirn geeignet sind, wobei 43Q zu keiner Erkrankung, 71Q jedoch zur Spinocerebellären Ataxie 3 führt (siehe Tabelle 1-1 in Kapitel 1.1.1).

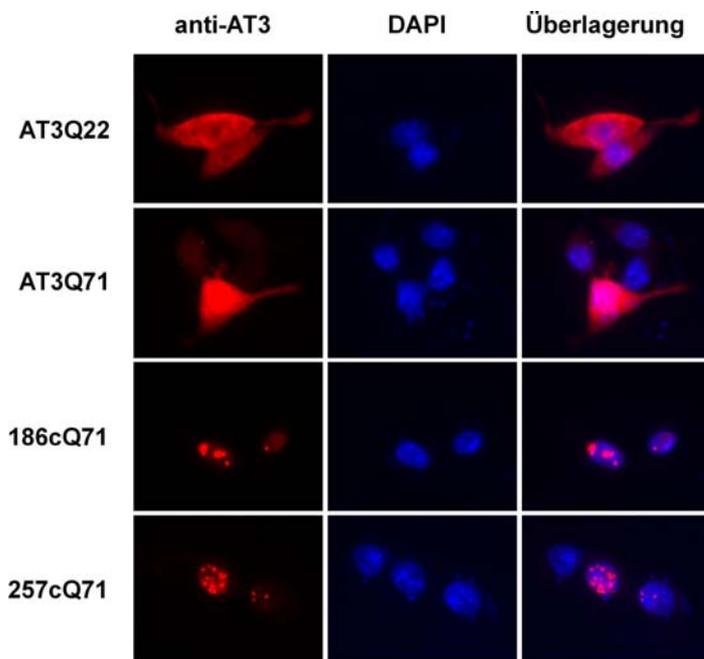


Abbildung 3-6: Immunfluoreszenz-Mikroskopie von AT3-exprimierenden N2a-Zellen.

Nach transients Transfektion (pcDNA3.1) und 24 h Expression wurden die Zellen fixiert. AT3-Proteine wurde mit anti-AT3-Antikörper und anti-Kaninchen-CY3 detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

3.2 Effekt der molekularen Chaperone Hsp70/40 auf die Ataxin3-Aggregation

Molekulare Chaperone sind an der Faltung zellulärer Proteine während der Proteinsynthese und unter Streßbedingungen, die zu partieller Entfaltung der Proteine führen, beteiligt und schützen sie so vor Aggregation (siehe 1.2.1). Außerdem stellen sie eine Verbindung zum proteasomalen Abbau von Proteinen her. Bisher konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von molekularen Chaperonen in Zellkultur, *Drosophila melanogaster* und transgenen Mäusen in einer Verringerung der Aggregation bzw. Toxizität von verschiedenen polyQ-Proteinen resultiert (siehe 1.2.2). Da in unserer Arbeitsgruppe bereits der Effekt von Chaperonen auf Htt-Exon1 untersucht worden war (Muchowski et al., 2000; Schaffar et al., 2004), wurde in dieser Arbeit ein möglicher Effekt auf das polyQ-Protein Ataxin3 analysiert.

3.2.1 Inhibition der Ataxin3-Aggregation durch Hsp70/40 *in vitro*

Um den Effekt von Chaperonen auf die Aggregation von AT3 zu testen, wurden zunächst die bakteriellen Hsp70/40-Chaperone DnaK/DnaJ zusammen mit dem Nukleotid-Austauschfaktor GrpE verwendet. Aggregationsreaktionen von 257cQ71 wurden mit den jeweiligen Chaperonen in 2,5-fachem Überschuß angesetzt. Als Negativkontrolle diente die Zugabe von Ovalbumin.

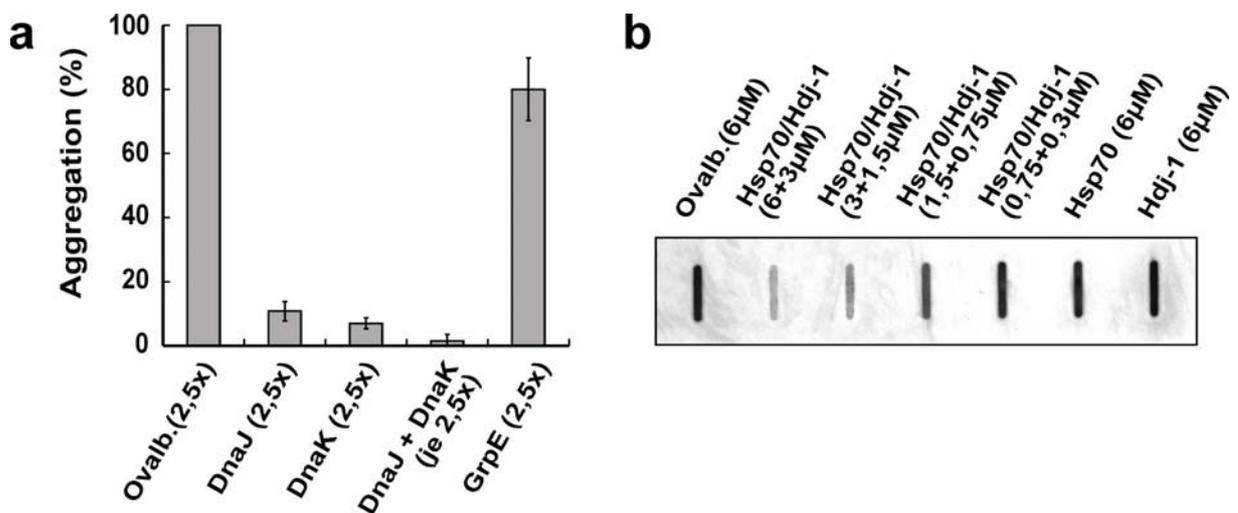


Abbildung 3-7: Inhibition der SDS-resistenten 257cQ71-Aggregation durch molekulare Chaperone *in vitro*.

a) Aggregationsansätze von 257cQ71 (3µM) mit Ovalbumin oder gereinigten Chaperonen (7,5µM) sowie ATP-regenerierendem System für 8 h. Quantifizierung von Filtertests (anti-myc), wobei die Aggregation bei Ovalbumin-Zugabe gleich 100% gesetzt wurde. b) Filtertests mit 257cQ71-Aggregationsansätzen mit gereinigtem Rinder-Hsc/Hsp70 und rekombinantem, humanen Hdj1 (8h, mit ATP-regenerierendem System).

Ergebnisse

Nach 8-stündiger Aggregation wurde ein Filtertest durchgeführt, um SDS-resistente Fibrillen zu detektieren. Abbildung 3-7a zeigt, daß DnaK bzw. DnaJ die Aggregation auf etwa 10% hemmten. Wurden beide Chaperone kombiniert, verstärkte sich der inhibitorische Effekt (~2% Aggregation). Der Nukleotid-Austauschfaktor GrpE zeigte keinen Effekt auf die Aggregation. Diese Resultate entsprechen den Beobachtungen, die bereits für Htt-Exon1-53Q gemacht worden waren (Schaffar, 2004). Weitere Versuche der genannten Arbeit hatten gezeigt, daß die *PreScission* Protease spezifisch für GST-Fusionsproteine ist und andere Proteine wie molekulare Chaperone nicht schneidet.

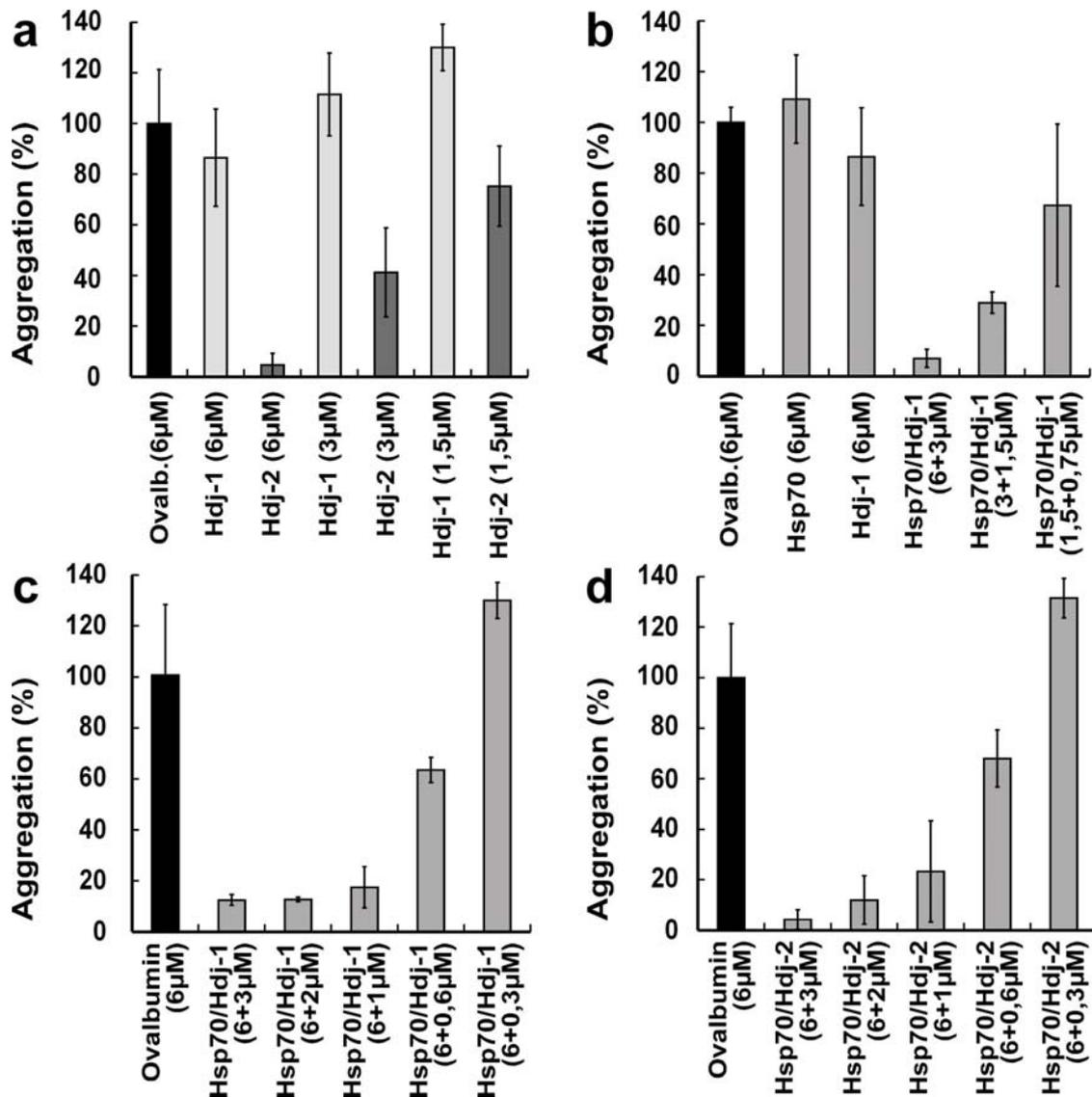


Abbildung 3-8: Inhibition der SDS-resistenten 257cQ71-Aggregation durch molekulare Chaperone *in vitro*.

Aggregationsansätze von 257cQ71 (3µM) und Ovalbumin oder gereinigtem Rinder-Hsc/Hsp70 und rekombinantem, humanen Hdj1/2 (8h, mit ATP-regenerierendem System) wurden mittels Filtertest (anti-myc) analysiert. Die SDS-resistente Aggregation bei Ovalbumin-Zugabe wurde als 100% gesetzt.

Ergebnisse

Da es sich bei AT3 um ein humanes Protein handelt, wurden Experimente mit den Säugetier-Chaperonen Hsc/Hsp70 (konstitutive Form und Hitzeschockprotein, gereinigt aus Rinderhirn) und den beiden Hsp40-Homologen Hdj1 (humane His₆-Fusion, rekombinant aus *E. coli*) und Hdj2 (human, rekombinant aus SF9-Zellen) durchgeführt. Die Chaperone wurden in verschiedenen Konzentrationen zusammen mit 257cQ71 und ATP-regenerierendem System in 8-stündigen Aggregationsreaktionen getestet (Abb.3-7b, 3-8). Wie die Auswertung der Filtertests zeigt, führte ein 2-facher Überschuß von Hsp70 zusammen mit Hdj1 oder Hdj2 zu einer Reduzierung der SDS-resistenten Aggregation auf ~10% des Ovalbumin-Kontrollwertes (Abb.3-8 b-d). Eine zunehmende Verringerung der eingesetzten Chaperon-Konzentrationen verringerte schrittweise den inhibitorischen Effekt, bis die Aggregation das Niveau der Ovalbumin-Kontrolle erreichte (Abb.3-7b, 3-8 c-d). Die Inhibition der Aggregation war sehr effizient, da äquimolare Hsp70-Konzentrationen (mit substöchiometrischen Hsp40-Konzentrationen) die 257cQ71-Aggregation um ~70% hemmten (Abb.3-8b).

Für sich hatte Hsp70 keinen inhibitorischen Effekt, sondern benötigte eines der beiden Hsp40-Ko-Chaperone (Abb.3-7b, 3-8b). Auch das Ko-Chaperon Hdj1 zeigte allein keinen Effekt (Abb.3-7b, 3-8 a-b). Hdj2 alleine führte jedoch, wie DnaJ, zu einer Hemmung der Aggregation (Abb.3-8a). Selbst bei Hdj2, welches alleine eine Aggregationshemmung zeigt, ließ sich die Inhibition der Aggregation durch Kombination mit Hsp70 verstärken (Abb.3-8d).

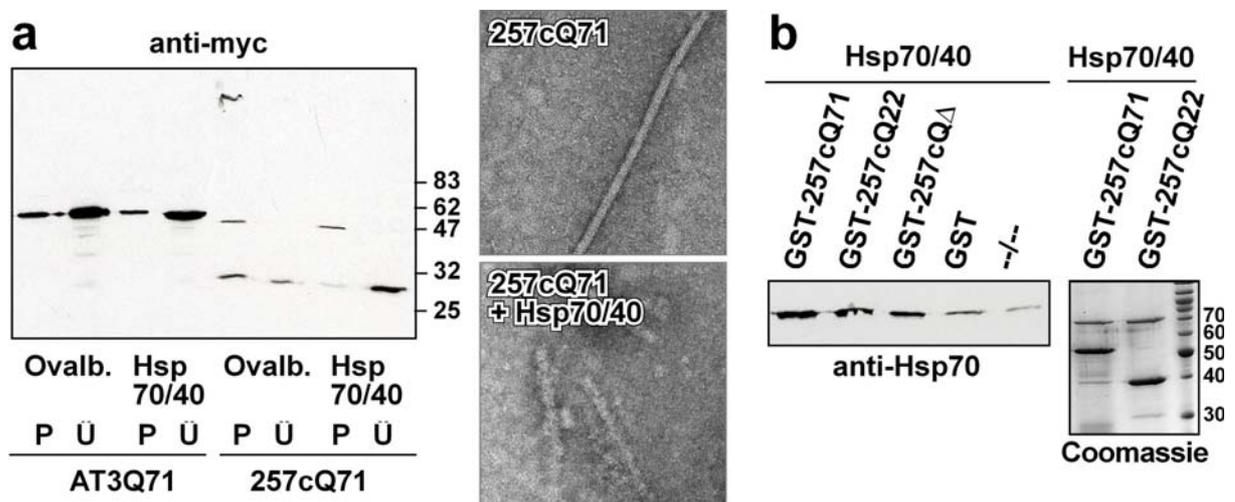


Abbildung 3-9: SDS-Löslichkeit und Interaktion von molekularen Chaperonen mit AT3 *in vitro*.

a) links: Aggregationsansätze von AT3Q71 oder 257cQ71 (3µM) mit Ovalbumin (6µM) oder Hsp70/Hdj1 (6+3µM) (8h, ATP-regenerierendes System) wurden bei 20.000xg für 10 min zentrifugiert. Überstand- und Pellet-Fractionen wurden getrennt, mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt und für eine Western Blot Analyse verwendet. rechts: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von 257cQ71-Aggregationsansätzen mit und ohne Hsp70/Hdj1 (ohne Zugabe von SDS), die bei 400.000xg pelletiert wurden. b) Nach Inkubation von Hsp70/Hdj1 mit GST-AT3 wurde letzteres an Glutathion-Agarose gebunden, gewaschen, mit SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und für Western Blot Analysen (anti-Hsp70: 70 kDa-Bande) oder SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) eingesetzt. SDS-PAGE des gereinigten GST-257cQΔ: siehe Abb.3-14.

Ergebnisse

Um zu analysieren, ob Hsp70/Hdj1 die SDS-resistenten Aggregate in SDS-lösliche Aggregate umwandelt und deshalb die Menge der SDS-resistenten Fibrillen im Filtertest reduziert, wurden Aggregationsansätze bei 20.000xg zentrifugiert, die getrennten Überstand- und Pellet-Fractionen mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt und für Western Blot Analysen verwendet. Bei Existenz SDS-löslicher Aggregate erwartet man in der Pellet-Fraktion eine Verstärkung der AT3-Bande (Monomer). Die Zugabe von Hsp70/40 hatte keinen Effekt auf die Verteilung des nicht-aggregierenden Volllängenproteins AT3Q71 (Abb.3-9a links). Die 257cQ71-Menge in der Pelletfraktion wurde durch Chaperon-Zugabe ebenfalls nicht erhöht, was schlußfolgern läßt, daß nicht vermehrt SDS-lösliche Aggregate gebildet wurden bzw. die gebildeten SDS-löslichen Aggregate (Oligomere) bei 20.000xg nicht pelletiert werden konnten.

Statt SDS-löslichen Aggregaten im Pellet wurde eine erhöhte Menge an SDS-löslichem 257cQ71 im Überstand detektiert (Abb.3-9a links). Das gezeigte Experiment deutet also darauf hin, daß die Chaperone die Aggregation verhinderten, indem sie einen großen Anteil des 257cQ71-Proteins in monomerer bzw. oligomerer (nicht bei 20.000xg pelletierbarer) Form löslich hielten. Aggregationsansätze wurden ohne SDS-Zugabe bei 400.000xg pelletiert und im Elektronenmikroskop untersucht. Die wenigen Aggregate, die bei Inkubation von 257cQ71 (3µM) mit Hsp70/Hdj1 (6/3µM) dennoch entstehen (10% im Filtertest), zeigen im Elektronenmikroskop eine veränderte fibrilläre Morphologie mit rauher Oberfläche (Abb.3-9a rechts).

Eine Inhibition der Aggregation setzt eine Interaktion der Chaperone mit AT3 voraus. Daher wurde die Bindung von Hsp70/Hdj1 an GST-AT3 mittels GST-Präzipitationsexperimenten (*pull down assays*) untersucht. Unter optimalen Bedingungen des Experiments fand nur eine sehr schwache Bindung der Chaperone an GST oder an Säulenmaterial statt (Negativkontrollen: Abb.3-9b). Hsp70 wurde von verschiedenen GST-AT3-Proteinen präzipitiert, es konnte jedoch keine Abhängigkeit der Hsp70-Interaktion mit AT3 von der polyQ-Länge festgestellt werden (Abb.3-9b).

Da das zelluläre Milieu eine hohe makromolekulare Dichte aufweist, entsprechen die *in vitro*-Experimente der gereinigten Proteine mit eingesetzten Konzentrationen von 0,2 mg/ml nicht der *in vivo*-Situation. In *E. coli* liegt eine Makromolekül-Konzentration (Proteine, Nucleinsäuren) von 300-400 mg/ml, in Säugetierzellen von 150-200 mg/ml vor, was zu einem als *Macromolecular Crowding* bezeichneten Effekt führt. Bei diesem Volumenausschluß-Effekt ist ein bestimmter Teil des Zellvolumens von Proteinen und anderen Makromolekülen besetzt und deshalb nicht für andere Proteine frei verfügbar. *Macromolecular Crowding* begünstigt Strukturen mit kleinstmöglichem Volumen und eine Assoziation von

Ergebnisse

Makromolekülen, und sollte daher in gesteigerten thermodynamischen Aktivitäten, einer erhöhten Aggregationsneigung, aber auch in erhöhten Chaperon-Aktivitäten resultieren (Ellis, 2001). Das ideale *Crowding*-Reagenz sollte eine Molekülmasse von 50-200 kDa besitzen, gut wasserlöslich sein und eine geringe Selbstaggregationstendenz haben. Ficoll-70 entspricht diesen Vorgaben, ist ein neutrales Saccharose-Polymer mit stark verzweigter Struktur und ist bei neutralem pH-Wert stabil. Eine 15%ige Ficoll-70-Lösung entspricht etwa einer Proteinkonzentration von 150 mg/ml. Um den *Crowding*-Effekt auf die Aggregation von verschiedenen AT3-Proteinen zu untersuchen, wurden steigende Konzentrationen von Ficoll-70 zu *in vitro*-Aggregationsreaktionen zugegeben. Wie in Abbildung 3-10a erkennbar, erhöhte ein schrittweise zunehmender *Crowding*-Effekt die Aggregation von AT3Q71. Das Fragment 257cQ43 mit nicht-pathologischem, aber verlängertem polyQ-Bereich verhielt sich wie das Volllängenprotein AT3Q71 und zeigte bei 15% Ficoll-70 deutliche Aggregation. Die Proteine mit 22 Glutaminen aggregierten jedoch nicht (Abb.3-10a).

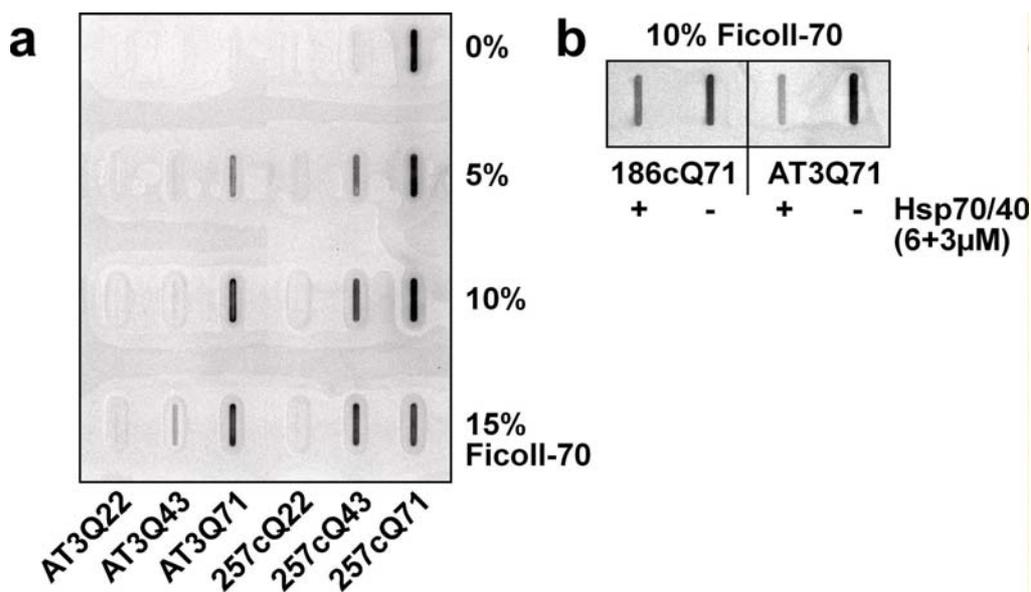


Abbildung 3-10: Inhibition der SDS-resistenten *in vitro*-Aggregation unter *Macromolecular Crowding*-Bedingungen durch molekulare Chaperone.

a) Filtertest (anti-myc) von Aggregationsansätzen (3µM, über Nacht) ohne bzw. mit Zugabe von 5-15% Ficoll-70 (*Crowding*-Reagenz). b) Filtertest (anti-myc) von Aggregationsansätzen (3µM, 8h, ATP-regenerierendes System) mit 10% Ficoll-70 und Rinder-Hsp70 / humanem Hdj1 oder Ovalbumin.

Um den Effekt von Hsp70 (Rind) und humanem Hdj1 unter *Crowding*-Bedingungen zu untersuchen, wurde 10% Ficoll-70 in die Aggregationsreaktionen mit Hsp70/40 eingesetzt. Filtertests zeigten, daß die Chaperone in der Lage waren, die durch den *Crowding*-Effekt verstärkte Aggregation von AT3Q71 und 186cQ71 beträchtlich zu reduzieren (Abb.3-10b). Somit konnte unter Bedingungen, die der intrazellulären Umgebung mehr ähneln als

Ergebnisse

verdünnte Pufferlösungen, eine Inhibition der Aggregation durch molekulare Chaperone gezeigt werden.

3.2.2 Inhibition der Aggregation und Verstärkung des Abbaus von Polyglutamin-Proteinen durch Hsp70/40 in Neuroblastomazellen

Um den Effekt von molekularen Chaperonen in N2a-Zellen untersuchen zu können, wurde humanes Hsp70 (= Hitzeschockprotein Hsp72, Accession Number NM_005345, Locus HSPA1A) und humanes Hdj1 (Accession Number P25685) in Expressionsvektoren für Säugetierzellen (pcDNA3.1hygro+) kloniert. Zur Überexpression wurden N2a-Zellen transient kotransfiziert mit 257cQ71, Hsp70 und Hdj1. Nach 24-48 h Kultivierung wurden Zellysate hergestellt und Filtertests durchgeführt. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten hatte in N2a-Zellen die alleinige Überexpression von Hsp70 bzw. Hdj1 einen inhibitorischen Effekt, wobei die Aggregation von 257cQ71 wurde auf ~20% bzw. 8% gehemmt wurde (Abb.3-11a). Dieses Resultat läßt sich dadurch erklären, daß Zellen aufgrund der konstitutiven Expression von Hdj1/2 bzw. Hsc70 mit einer gewissen Menge dieser Chaperone ausgestattet sind, welche mit den überexprimierten Chaperonen Hsp70 bzw. Hdj1 interagieren konnten.

Als Kontrolle zur gemeinsamen Hsp70/Hdj1-Kotransfektion wurden N2a-Zellen zusätzlich zum 257cQ71-Plasmid mit Plasmiden für die β -Galaktosidase- (pcDNA3.1-*lacZ*) und Luciferase-Expression (Plasmid mit Promotor des Aktin-Gens) transfiziert. Im Vergleich zu dieser β -Gal/Luc-Kontrolle konnte eine deutliche Reduktion der SDS-resistenten 257cQ71-Aggregation bei Hsp70/Hdj1-transfizierten Zellen auf 0-10% festgestellt werden (Abb.3-11a). Da die Zellen mit drei Plasmiden kotransfiziert und demnach drei verschiedene Proteine überexprimiert wurden, kann davon ausgegangen werden, daß der beobachtete Effekt nicht durch verschiedene Expressionsniveaus des 257cQ71-Proteins hervorgerufen wurde.

Die Expression einer Deletionsmutante des Hitzeschockfaktors 1 (Δ HSF1 = Δ 202-316), welche konstitutiv aktiv ist, an alle Promotoren mit Hitze-Schock-Element (HSE) bindet und die Expression von Hitzeschockproteinen induziert (Winklhofer et al., 2001), konnte die Aggregation von 257cQ71 ebenfalls auf ~5% reduzieren (Abb.3-11b). Ähnliches wurde bereits von anderen Autoren berichtet (Rimoldi et al., 2001).

Um den Chaperon-Effekt auf AT3 mit dem auf ein anderes polyQ-Protein vergleichen zu können, wurden N2a-Zellen mit einem Htt-Exon1-51Q-Konstrukt, welches wie 257cQ71 ein C-terminales myc-Epitop exprimierte, transfiziert (siehe Anhang). Überexpression von Htt

zusammen mit Hsp70/Hdj1 verringerte die Htt-Aggregation auf ~10% (Abb.3-11c). Somit ist dieser Effekt mit dem auf das AT3-Fragment 257cQ71 vergleichbar.

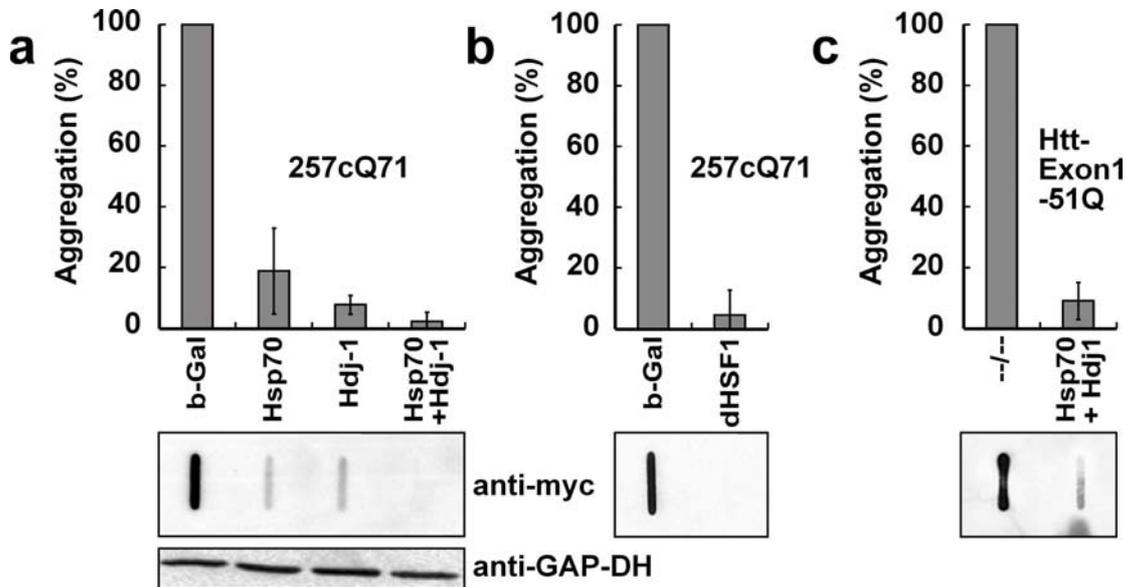


Abbildung 3-11: Inhibition der polyQ-Aggregation durch molekulare Chaperone in N2a-Zellen.

a) N2a-Zellen wurden transient mit Konstrukten für 257cQ71, β -Galaktosidase, humanem Hsp70 und humanem Hdj1 transfiziert. Nach 24 h Expression wurden Filtertests (anti-myc) durchgeführt und quantifiziert, wobei die SDS-resistente Aggregation bei Koexpression mit β -Galaktosidase gleich 100% gesetzt wurde. Western Blot Analysen (anti-GAP-DH) dienen als Auftragskontrolle. b) Filtertest (anti-myc) nach Koexpression von 257cQ71 und β -Galaktosidase oder eines konstitutiv aktiven Hitzeschockfaktors (Δ HSF1). c) Filtertest (anti-myc) nach transienter Transfektion und Koexpression von Htt-Exon1-51Q und Hsp70/Hdj1.

Da sich die Frage stellte, ob die molekularen Chaperone die Konzentration von monomerem 257cQ71 erhöhten oder die SDS-resistenten in SDS-lösliche Aggregate umwandelten, wurden Western Blot Analysen durchgeführt, bei denen keine verstärkte, sondern eine reduzierte 257cQ71-Bande detektiert wurde (Abb.3-12a). Anstelle der erwarteten erhöhten SDS-Löslichkeit befanden sich also bei Chaperon-Überexpression geringere Mengen von SDS-löslichen Aggregaten und löslichem Monomer in den Zellen.

Auch bei Htt-Exon1-51Q wurde die Menge an SDS-löslichem Htt-Protein durch Chaperon-Überexpression verringert (Abb.3-12b). Die Expression der Δ HSF1-Mutante führte ebenfalls zu geringerer 257cQ71-Monomer-Konzentration in der Zelle (Abb.3-12c). Um zu testen, ob der proteasomale Abbau von nicht-aggregiertem Protein zu der beobachteten Verringerung der Monomer-Konzentration führte, wurden transfizierte Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 inkubiert. In Abbildung 3-12a wird ersichtlich, daß sich die Konzentration von SDS-löslichem 257cQ71 in Chaperon-überexprimierenden N2a-Zellen durch MG132-Zugabe erhöhen ließ. Gleiches gilt für das nicht-aggregierende Fragment 257cQ22 (Daten nicht gezeigt). Die Resultate deuten darauf hin, daß eine Chaperon-Überexpression zu verstärktem

Ergebnisse

Abbau von polyQ-Proteinen über das Ubiquitin-Proteasom-System führt. Durch die bekannte Verbindung von Chaperon-assistierter Proteinfaltung mit proteasomaler Proteindegradation, den beiden Hauptkomponenten der Proteinqualitätskontrolle im Cytoplasma (siehe 1.2.1), läßt sich der verstärkte Abbau der polyQ-Proteine bei Hsp70/40-Überexpression erklären.

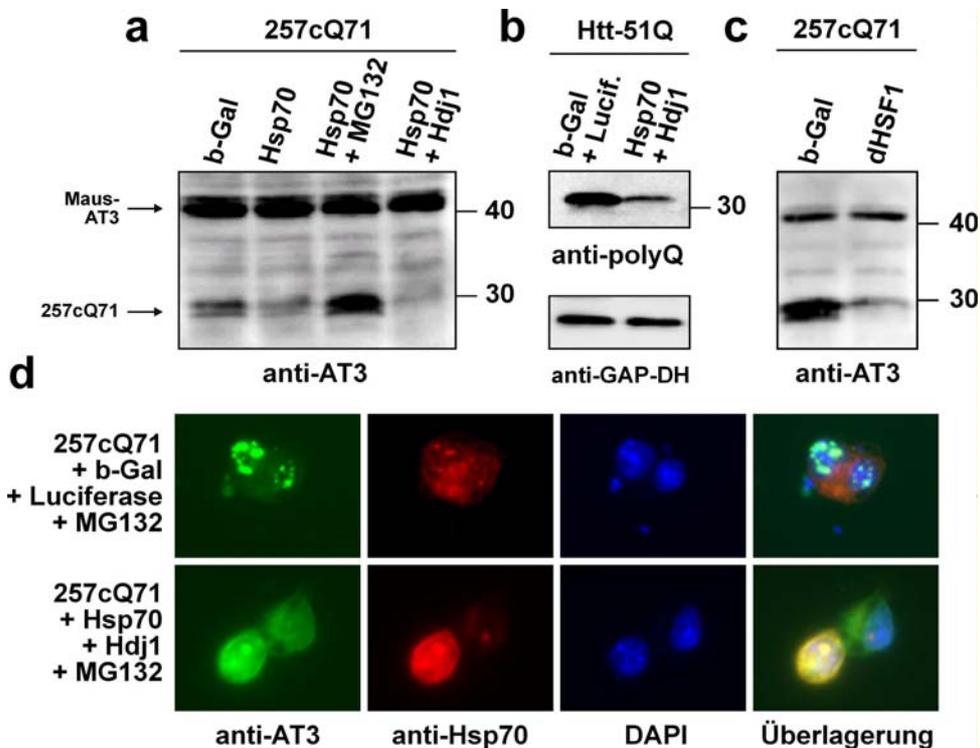


Abbildung 3-12: Verstärkter proteasomaler Abbau von polyQ-Proteinen durch Hsp70/40 in N2a-Zellen.
a) N2a-Zellen wurden transient mit Konstrukten für 257cQ71, β -Galaktosidase, humanem Hsp70 und humanem Hdj1 transfiziert. Nach ~20 h Expression wurden die Zellen, wenn angegeben, für 5 h mit 20 μ M MG132 inkubiert. Die Western Blot Analyse (anti-AT3) zeigt das 257cQ71-Fragment sowie das endogene Maus-AT3, welches als Auftragskontrolle dient. b) Transiente Transfektion mit Htt-Exon1-51Q, β -Galaktosidase und Luciferase oder Htt-Exon1-51Q, Hsp70 und Hdj1 und Expression für 24 h. Western Blot Analyse (anti-polyQ) zur Detektion von Htt-Exon1-51Q. Auftragskontrolle mit derselben Membran (anti-GAP-DH). c) Transfektion mit bisherigen Konstrukten oder mit dem eines konstitutiv aktiven Hitzeschockfaktors (Δ HSF1). Western Blot Analyse wie in a). d) Immunfluoreszenz-Mikroskopie von N2a-Zellen. Transfektion und MG132-Behandlung wie in a). AT3 wurde mit anti-AT3-Antikörper und anti-Kaninchen-FITC, Hsp70 wurde mit anti-Hsp70 (c92) und anti-Maus-CY3 detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Um nochmals die Hypothese, Chaperone würden SDS-resistente in SDS-lösliche Aggregate umwandeln, zu untersuchen, wurden Zellen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Wenn Chaperon-Überexpression in der Ausbildung von SDS-löslichen Aggregaten resultierte, wären diese in Immunfluoreszenz-Aufnahmen genauso wie die SDS-resistenten Aggregate als zelluläre Proteinablagerungen (Einschlüsse) sichtbar. Dies war jedoch nicht der Fall, sondern die punktförmigen Einschlüsse in 257cQ71-exprimierenden N2a-Zellen verschwanden bei Chaperon-Überexpression, und bei Inkubation der Zellen mit MG132 wurde diffuse Lokalisation des 257cQ71-Proteins detektiert (Abb.3-12d).

Die in Abbildung 3-12 gezeigten Experimente weisen also darauf hin, daß Hsp70/40-Überexpression in N2a-Zellen nicht in einer Modulation der 257cQ71-Aggregation hin zu SDS-löslichen Aggregaten, sondern in einem verstärkten proteasomalen Abbau des AT3-Fragments resultierte.

3.3 Modulation der Ataxin3-Aggregation durch p97 *in vitro*

Das Protein p97, das auch VCP (*valosin-containing protein*) genannt wird und dessen Hefehomolog CDC48 ist, wurde in Säugetierzell-Extrakten als Interaktionspartner von AT3 gefunden (siehe 1.1.4). p97 gehört wie Hsp104 zur Familie der AAA-Proteine, liegt als ringförmiges Homohexamer vor (DeLaBarre and Brunger, 2003), ist sehr stark konserviert, essenziell und in hohen zellulären Konzentrationen vorhanden. p97 zeigt Chaperon-Aktivität und spielt unter anderem eine Rolle bei Membranfusionen, im Ubiquitin-Proteasom-System und im ER-assoziierten Degradationssystem (ERAD) (siehe 1.2.1). Da AT3 eine deubiquitylierende Aktivität besitzt, und außerdem zwei Ubiquitin-Interaktionsmotive (UIM) in AT3 vorkommen, nimmt man eine Rolle des AT3 zusammen mit p97 im Ubiquitin-Proteasom-System an.

Abgesehen von der physiologischen p97-Funktion, an der AT3 beteiligt sein könnte, wurde der Einfluß des Chaperons p97 auf die polyQ-Aggregation untersucht. In *Caenorhabditis elegans* konnte die Koexpression zweier *C. elegans* - p97-Homologe die Aggregation von GFP-polyQ in Muskelzellen unterdrücken (Yamanaka et al., 2004). Ebenso reduzierte die Hsp104-Koexpression die Aggregation und die polyQ-induzierte Entwicklungsverzögerung in *C. elegans* (Satyal et al., 2000). Die Überexpression von Torsin, welches entfernte Sequenz-Ähnlichkeiten mit AAA-Proteinen aufweist, verringerte ebenfalls die polyQ-Aggregation in *C. elegans* (Caldwell et al., 2003).

Eine erhöhte p97-Konzentration im Serum von Alzheimer-Patienten wurde beobachtet (Jefferies et al., 2001), außerdem wurde p97 in neuronalen Einschlüssen in Creutzfeldt-Jakob, Alzheimer-, Parkinson-, Huntington- und SCA3-Gehirnen detektiert (Hirabayashi et al., 2001; Mizuno et al., 2003).

3.3.1 Effekt von p97 auf verschiedene Ataxin3-Fragmente *in vitro*

In Kooperation mit Annett Boeddrich aus der Arbeitsgruppe von Prof. Erich Wanker (Max-Delbrück-Center, Berlin) und mit Nikolay Tzvetkov wurde die Interaktion von AT3 mit p97

Ergebnisse

näher untersucht. Bindungsstudien zeigten, daß eine Interaktion von AT3 mit der N-Domäne von p97 stattfindet. Eine polyQ-Deletionsmutante von AT3 (AT3Q Δ) zeigte deutlich schwächere p97-Bindung als AT3Q22 oder AT3Q71 (siehe (Matsumoto et al., 2004)), die p97-Bindungsregion in AT3 konnte jedoch mittels GST-Präzipitationsexperimenten (*pull down assays*) sowie Peptid-Bindungsanalysen (*peptide array* mit 15mer-Peptiden) auf die Sequenz kurz vor dem polyQ-Bereich (277-291) eingegrenzt werden. Eine Interaktion zwischen p97 und 257cQ71-RKRR>HNHH (282-285), 281cQ27 oder Htt-Exon1-(17 bis 68Q) fand nicht statt. Die Bindung von p97 an Volllängen-AT3 war nukleotidabhängig und fand im ATP-, nicht jedoch im ADP-Zustand, statt. Im Gegensatz dazu war die Interaktion von p97 mit den C-terminalen AT3-Fragmenten 186cQ71, 257cQ71, 257cQ22 nukleotidunabhängig (Daten nicht gezeigt).

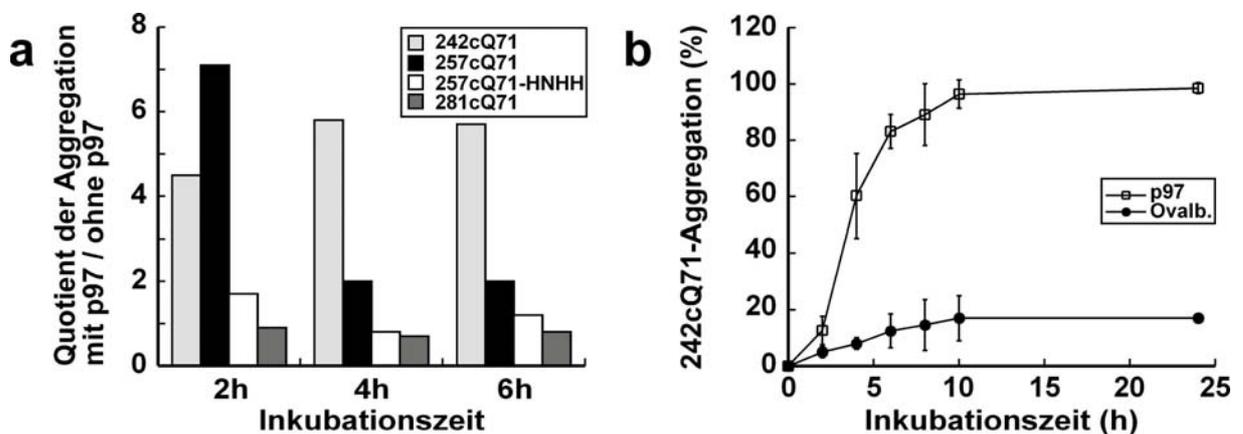


Abbildung 3-13: Verstärkung der SDS-resistenten 242cQ71- und 257cQ71-Aggregation durch p97 *in vitro*. a) Aggregationsansätze von AT3-Proteinen (3 μ M) mit p97 (1 μ M) wurden nach den angegebenen Inkubationszeiten mit SDS/DTT erhitzt, im Filtertest (anti-myc) eingesetzt und quantifiziert. Die Aggregation ohne p97-Zugabe wurde gleich 1 gesetzt, worauf die Aggregation bei p97-Zugabe bezogen wurde. b) Aggregation von 242cQ71 (3 μ M) bei p97 (1 μ M)- oder Ovalbumin (1 μ M)-Zugabe. Quantifizierung von Filtertests (anti-myc) wobei das stärkste Signal im Phosphoimager bei p97-Zugabe (berechnet aus den 1:2-Verdünnungen der Aggregationsansätze) gleich 100% gesetzt wurde.

In Aggregationsansätzen wurde humanes p97 (His₆-Fusion, rekombinant aus *E. coli*) mit verschiedenen AT3-Proteinen inkubiert und anschließend deren Aggregation in Filtertests analysiert. Die Zugabe von p97 (1 μ M Hexamer; mit bzw. ohne ATP-regenerierendem System) hatte keinen Effekt auf die nicht-aggregierenden Proteine AT3Q71, 186cQ71, 221cQ71 (3 μ M) (Daten nicht gezeigt, vergleiche mit Abb.3-2b Filtertest).

Die Aggregation der AT3-Fragmente 242cQ71 und 257cQ71 wurde jedoch durch p97 verstärkt (Abb.3-13a). Da in Vorversuchen festgestellt worden war, daß der p97-Effekt auf die 242cQ71-Aggregation unabhängig von ATP-regenerierendem System war (genauso wie

Ergebnisse

die Interaktion zwischen p97 und AT3-Fragment), wurden alle weiteren Experimente ohne ATP durchgeführt.

Eine Analyse der Aggregation von 242cQ71 mit p97 (-24 h) zeigte eine 5-fache Aggregationsverstärkung (Abb.3-13b). Die Aggregation der Mutante 257cQ71-RKRR>HNHH (Abb.3-14a), bei der die Sequenz RKRR (282-285) durch HNHH ausgetauscht worden war, und die Aggregation des AT3-Fragments 281cQ71 (Abb.3-14a) wurden von p97 jedoch nicht verändert (Abb.3-13a, 3-14b), was der Tatsache entspricht, daß jene Fragmente keine Interaktion mit p97 in den Proteinpräzipitationsexperimenten zeigten (siehe oben). Die Aggregationsstudien untermauern daher die Ergebnisse der Bindungsanalysen, die auf die AT3-Sequenz 277-291 als p97-Bindungsstelle hindeuteten.

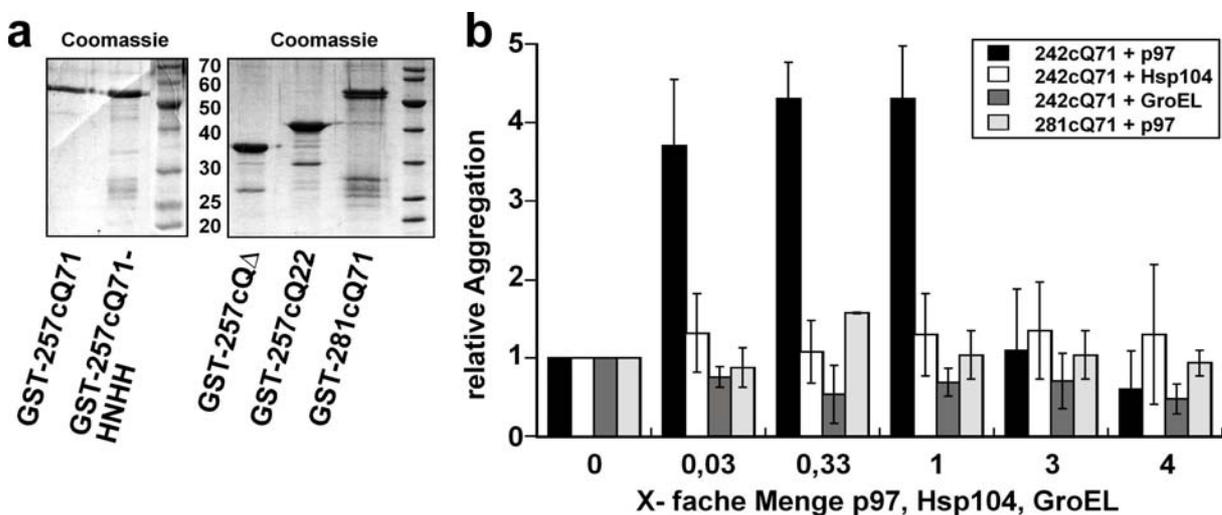


Abbildung 3-14: Konzentrationsabhängige Modulation der SDS-resistenten 242cQ71-Aggregation durch p97 *in vitro*.

a) SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der gereinigten GST-AT3-Proteine. b) Aggregation von 242cQ71 (3µM) mit verschiedenen Konzentrationen (0,1-12µM Hexamer bzw. Heptamer) von p97, Hsp104 oder GroEL-SRI-D87K für 6 h. Aggregation von 281cQ71 (2µM) mit p97 (0,06-8µM Hexamer) für 6 h. Filtertests (anti-myc) wurden quantifiziert, wobei die SDS-resistente Aggregation bei p97-Zugabe auf die Aggregation ohne p97 bezogen wurde (ohne p97: Aggregation = 1).

3.3.2 Konzentrationsabhängigkeit des p97-Effekts *in vitro*

Um zu analysieren, ob eine Konzentrationsabhängigkeit des p97-Effekts existiert, wurde die Aggregation von 242cQ71 (3µM) in Anwesenheit verschiedener p97-Konzentrationen untersucht. Es zeigte sich, daß geringere bis äquimolare p97-Konzentrationen (0,1-3µM) die Aggregation etwa 5-fach verstärkten, höhere p97-Konzentrationen (9µM) jedoch keinen Einfluß auf die 242cQ71-Aggregation hatten bzw. die Aggregation schwach hemmten (12µM p97) (Abb.3-14b).

Ergebnisse

Ein ähnlicher konzentrationsabhängiger Effekt auf die Aggregation war bereits für Hefeprionen in Anwesenheit von Hsp104 beschrieben worden. Sowohl die Überexpression als auch die Deletion von Hsp104 eliminieren den [PSI⁺]-Prionzustand und verringern ebenfalls die polyQ-Aggregation (Lindquist, 1997; Krobitch and Lindquist, 2000; Meriin et al., 2002; Kimura et al., 2001). Das Chaperon Hsp104 aus *Saccharomyces cerevisiae* ist wie p97 ein AAA-Protein, liegt als ringförmiges Homohexamer vor und kann Proteine entfalten bzw. Proteinaggregate auflösen (siehe 1.2.1).

Um zu analysieren, ob der Effekt von p97 auf 242cQ71 spezifisch ist, oder durch andere ringförmige Komplexe hervorgerufen werden kann, wurden *S. cerevisiae*-Hsp104 (His₆-Fusion, rekombinant aus *E. coli*) und der ringförmige homoheptamere Komplex GroEL-SRI (*Single Ring*-Mutante des GroEL (Weissman et al., 1995) mit zusätzlicher D87K-Mutation) in die 242cQ71-Aggregationsreaktionen eingesetzt. Beide Kontrollproteine Hsp104 und GroEL-SRI zeigten keinen Effekt auf die 242cQ71-Aggregation (Abb.3-14b), weshalb der beobachtete p97-Effekt als spezifisch angesehen werden kann. In Experimenten mit Htt-Exon1-51Q und Hsp104 (3+1µM) wurde jedoch eine Verstärkung der Htt-Aggregation auf das 2,5-fache beobachtet (unabhängig von ATP-regenerierendem System, Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, daß das gereinigte Hsp104-Protein aktiv war und darüberhinaus der Effekt spezifisch für Htt-Exon1 war. Die Zugabe von p97 (1µM) hatte keinen Effekt auf die Aggregation von Htt-Exon1-51Q (3µM) (Daten nicht gezeigt), was mit den Bindungsstudien übereinstimmt (siehe oben). Die gezeigten Daten weisen daher darauf hin, daß es sich bei den beiden hexameren AAA-Proteinen p97 und Hsp104 nicht um polyQ-interagierende Proteine handelt, und deshalb auch keine generelle Modulation der polyQ-Aggregation und polyQ-Pathogenese wie durch Hsp70/40 zu erwarten ist.

3.4 Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 mit Polyglutamin-Fragmenten

Ein dominant negativer Effekt durch Interaktion der fehlgefalteten polyQ-Proteine mit anderen zellulären Proteinen wird als Ursache der polyQ-Erkrankungen angenommen. Ein Modell zur Erklärung der polyQ-Toxizität basiert auf der Inaktivierung essenzieller Proteine durch Hineinziehen (Rekrutierung) in polyQ-Aggregate (siehe 1.1.3). Durch Immunfluoreszenz-Mikroskopie konnte man neben den jeweils aggregierenden polyQ-Proteinen Chaperone, Ubiquitin, Proteasomenbestandteile sowie Transkriptionsfaktoren, die ebenfalls einen polyQ-Bereich besitzen, in den neuronalen Proteinablagerungen humaner Gehirne nachweisen. Zusätzlich zur Inaktivierung durch Koaggregation wird von einer

direkten Inaktivierung ausgegangen, die aus der Wechselwirkung von Transkriptionsfaktoren mit polyQ-Monomeren bzw. oligomeren Aggregationsintermediaten resultiert (siehe 1.1.3).

3.4.1 PolyQ-abhängige Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 *in vitro*

Vollängen-AT3 (AT3Qn) zeigte unabhängig von der Länge des polyQ-Bereichs keine Aggregation (Abb.3-2a), daher stellte sich die Frage, ob es in 257cQ71-Aggregate hineingezogen werden kann. Um dies zu analysieren, wurden Aggregationsreaktionen von AT3Qn mit 257cQ71 angesetzt und Filtertests durchgeführt. Mit anti-myc-Antikörper wurde die totale Aggregation detektiert, mit anti-FLAG-Antikörper die Koaggregation der verschiedenen AT3-Vollängenproteine. Es folgte die Berechnung von Quotienten (anti-FLAG / anti-myc) der im Phosphoimager erhaltenen Werte.

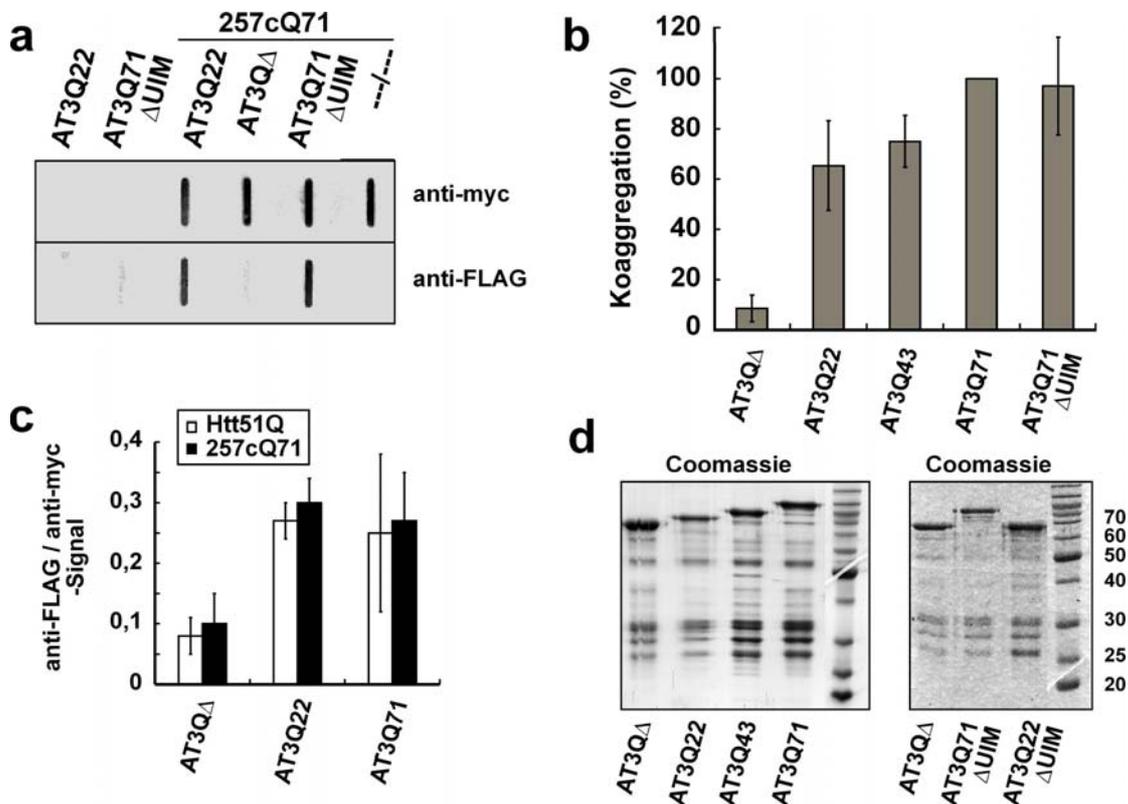


Abbildung 3-15: PolyQ-abhängige Koaggregation von AT3-Vollängenprotein mit polyQ-Fragmenten.

a) Aggregationsansätze von 257cQ71 (3 μ M) und AT3-Vollängenprotein (0,3 μ M) bzw. von AT3-Vollängenprotein allein (3 μ M) wurden nach über Nacht-Aggregation im Filtertest analysiert, wobei anti-myc-Antikörper zur Detektion der totalen Aggregation und anti-FLAG-Antikörper zur Analyse der Koaggregation der Vollängenproteine eingesetzt wurde. b) Analyse der Koaggregation mittels Quantifizierung von Filtertests (siehe a; serielle Verdünnungen; Mittelwert \pm Standardabweichung von 5 Experimenten). Der berechnete anti-FLAG/anti-myc-Quotient der Kontrolle 257cQ71 ohne AT3Qn wurde von den anderen Quotienten subtrahiert. Der Quotient für 257cQ71 + AT3Q71 wurde als 100% gesetzt. c) Vergleich der Koaggregation von AT3Qn mit 257cQ71 oder Htt-Exon1-51Q im Filtertest. d) SDS-PAGE (Coomassie-Färbung) der gereinigten GST-AT3-Vollängenproteine.

Ergebnisse

Das Wildtyp-Protein AT3Q22 koaggregierte bereits stark, und AT3Q43 sowie AT3Q71 wurden entsprechend ihrer polyQ-Länge verstärkt rekrutiert (Abb.3-15 a-b). Die polyQ-Deletionsmutante AT3Q Δ zeigte annähernd keine Koaggregation. Eine 71Q-Mutante, der beide UIMs fehlten (AT3Q71 Δ UIM), wurde genauso stark in Aggregate hineingezogen wie AT3Q71, aggregierte ohne 257cQ71-Zugabe jedoch nicht (Abb.3-15 a-b). Vollängen-AT3 zeigt also eine polyQ-abhängige Rekrutierung in Aggregate, die aus AT3-71Q-Fragmenten gebildet werden. Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Paulson und Kollegen (Paulson et al., 1997b; Perez et al., 1998) war für die SDS-resistente Koaggregation kein pathologischer polyQ-Bereich im Vollängen-AT3 nötig, sondern das Wildtyp-Protein AT3Q22 wurde in SDS-resistente Fibrillen hineingezogen, die mittels Filtertest detektiert werden konnten.

Eine Koaggregation von Vollängen-AT3 mit Htt-Exon1-51Q (siehe Anhang) zeigte dieselbe Effizienz wie die Koaggregation von Vollängen-AT3 mit 257cQ71 (Abb.3-15c). Der Transkriptionsfaktor TBP (His₆-HA-TBP-38Q, rekombinant aus *E. coli*), der in Htt-Aggregate rekrutiert wird, koaggregierte ebenfalls mit 257cQ71 (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, daß die Koaggregation von polyQ-enthaltenden Proteinen (TBP, AT3) mit verschiedenen pathologischen polyQ-Proteinen gleichermaßen effizient stattfindet, deutet zusätzlich zu den Untersuchungen mit der polyQ-Deletionsmutante auf eine polyQ-Abhängigkeit der Koaggregation hin.

Um zu testen, ob es sich um gemischte Aggregate aus Vollängen-AT3 und 257cQ71 handelte, wurden Koaggregate einer Affinitätsreinigung mittels Ni-NTA-Agarose unterzogen. Da polyQ-Aggregate in 2% SDS und 6M Harnstoff unlöslich (stabil) sind, Protein-Wechselwirkungen diesen Bedingungen jedoch nicht standhalten, wurde die Ni-NTA-Agarose mit diesen Substanzen gewaschen. *In vitro*-Aggregationsreaktionen von His₆-AT3Q22 bzw. PP-geschnittenem GST-FLAG-AT3Q22-myc (Negativkontrolle) wurden zusammen mit 257cQ71-myc angesetzt. Nach Reinigung der Aggregate via Ni-NTA wurde ein Filtertest (anti-myc) durchgeführt, um aggregiertes 257cQ71 zu detektieren (Abb.3-16a). FLAG-AT3Q22-myc-Koaggregate wurden unspezifisch an das Ni-NTA-Säulenmaterial gebunden und während der stringenten Wasch-Schritte (W1-5) entfernt. His₆-AT3Q22-Koaggregate wurden kaum im Waschpuffer detektiert, blieben also während der Waschschrte (W1-5) an das Säulenmaterial gebunden und konnten spezifisch mit Imidazol eluiert werden (E). Die Reinigung via His₆-Epitop des Vollängenproteins und die Detektion des myc-Epitops von 257cQ71 im Filtertest beweisen das Vorkommen beider Proteine in den Koaggregaten. Dies belegt, daß das koaggregierende Vollängenprotein stabil in die 257cQ71-

Ergebnisse

Aggregate integriert wurde, und es sich nicht um getrennt und unabhängig voneinander vorkommende Aggregate handelte.

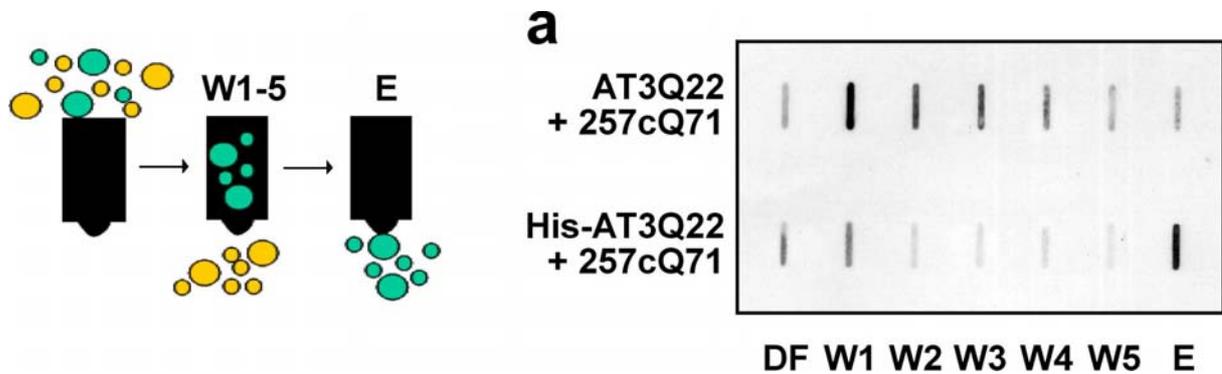


Abbildung 3-16: Stabile Koaggregation des AT3Q22-Vollängenproteins mit dem 257cQ71-Fragment.

Links: Schematische Abbildung der Ni-NTA-Reinigung von His-Koagregaten und monomeren His-AT3Q22. a) Koaggregationsansätze von 257cQ71 (3µM) mit His-AT3Q22 oder PP-geschnittenem GST-AT3Q22 (0,5µM) wurden mit Ni-NTA-Agarose inkubiert und danach der Durchfluß (DF) von dem Säulenmaterial getrennt. Nach stringenterm Waschen (W1-5) der Ni-NTA-Agarose wurden gebundene Proteine mit Imidazol eluiert (E). SDS-resistente Aggregate der aufgefängenen Fraktionen wurden im Filtrertest (anti-myc) detektiert.

3.4.2 Rekrutierung von Vollängen-Ataxin3 in frühe Aggregationsintermediate *in vitro*

Um die Zeitabhängigkeit der AT3-Koaggregation zu analysieren, wurden *in vitro*-Aggregationsexperimente mit AT3Q22 und 257cQ71 angesetzt. Nach PP-Zugabe wurden die Proben für 2, 4, 6 oder 8 h inkubiert, bei 20.000xg zentrifugiert und die Überstand- und Pellet-Fractionen mittels Western Blot Analyse auf das Vorkommen von AT3Q22 untersucht (Abb.3-17 oben). Es zeigte sich, daß bereits nach 2 h nur noch 6% des AT3Q22 im Überstand und 49% im SDS-löslichen Pellet zu finden waren (Abb.3-17a). Die restlichen 45% mussten sich demnach als SDS-resistentes Material im Sammelgel befinden. Nach 8 h befanden sich nur noch 2% im Überstand und 26% SDS-löslich im Pellet, was 72% in SDS-resistenten Aggregaten entsprach. Im Laufe der Koaggregationsreaktion nahm also die Menge des monomeren AT3-Proteins im Überstand sowie die Menge der SDS-löslichen Aggregationsintermediate im Pellet zugunsten der SDS-resistenten Aggregate ab (siehe Abb.3-15a, 3-16a). Die Resultate legen daher einen Mechanismus der Koaggregation mit früher AT3Q22-Rekrutierung in SDS-lösliche Aggregationsintermediate und anschließender Umwandlung in SDS-resistente fibrilläre Koaggregate nahe. Die Koaggregation von AT3Q22 mit 257cQ71 zu SDS-resistenten Fibrillen läßt sich somit mit der Aggregation von 257cQ71 alleine vergleichen (siehe Abb.3-2d, 3-3a). Kontrollexperimente wurden mit AT3Q22 und dem nicht-aggregierenden Fragment 257cQ22 durchgeführt (Abb.3-17b). Wie erwartet

Ergebnisse

blieben 90-100% des AT3Q22 während der 8-stündigen Inkubation im Überstand, und nur eine geringe AT3Q22-Menge (7%) fand sich im SDS-löslichen Pellet. Um den Koaggregations-mechanismus näher zu untersuchen, wurden frühe Zeitpunkte analysiert. Aggregationsansätze mit 257cQ71 und AT3Q22 wurden für 0, 30, 60, 90 oder 120 min nach PP-Zugabe inkubiert und anschließend zentrifugiert. Bei sofortiger Zentrifugation (Inkubationszeit 0 min) fand sich nur 36% des AT3Q22 im Überstand, und die Menge nahm bis zum Zeitpunkt 120 min kontinuierlich ab (Abb.3-17c). Die AT3Q22-Menge im SDS-löslichen Pellet blieb während der 120 min relativ konstant bei 40-60%, was für eine Zunahme der SDS-resistenten Aggregate während dieser 2 h spricht. Die gezeigten Daten weisen daher darauf hin, daß die Umwandlung von monomerem Protein in SDS-resistente Fibrillen über eine während der *Lag*-Phase konstant bleibende Menge von SDS-löslichen Aggregationsintermediaten geschieht (Abb.3-17c, siehe Abb.3-3d).

Um zu testen, ob solch ein Effekt auf AT3Q22 auch durch das 186cQ71-Fragment hervorgerufen werden kann, welches SDS-resistente Oligomere bzw. dünne Fibrillen bildet (siehe Abb.3-2b, 3-3 a-d), wurde 186cQ71 mit AT3Q22 im oben beschriebenen Experiment inkubiert. Abb.3-17d zeigt, daß die AT3Q22-Menge im Überstand bei 2-stündiger Inkubation mit 186cQ71 deutlich auf ~34% abnimmt (vergleiche mit Abb.3-17b), es findet sich jedoch nur sehr wenig AT3Q22 im SDS-löslichen Pellet. Der Effekt, den 186cQ71 auf das Vollängen-AT3 ausübt, ist somit nachweisbar, jedoch nicht mit dem durch 257cQ71 vergleichbar. Die geringe Menge von SDS-löslichen Aggregaten spricht außerdem für einen anderen Aggregationsmechnismus, bei dem monomeres Protein direkt in SDS-resistentes Material verwandelt wird.

Die PP-Spaltungkinetik wurde mit denselben Western Blot-Membranen (anti-myc) bestimmt. Es zeigte sich, daß 50-60% des GST-257cQ71 nach 10 min geschnitten waren, wobei die Spaltung während der Zentrifugation fortschritt. Für GST-186cQ71 ließ sich eine 50%ige Spaltung innerhalb von 15 min detektieren (Daten nicht gezeigt).

Die PP-Spaltungkinetik und die Daten aus Abb.3-17c lassen auf eine AT3Q22-Interaktion mit dem Fragment 257cQ71 schließen, sobald dieses vom GST abspalten wurde.

Darüberhinaus führte die Interaktion von 257cQ71 mit AT3Q22 zu einer Konformationsänderung von AT3Q22, die in Kooperation mit Raina Boteva mittels intramolekularen FRET-Analysen (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) gezeigt werden konnte. Interessanterweise findet man eine Konformationsänderung der N-terminalen Josephin-Domäne von AT3, die an Cys14 und Cys172 mit den Fluoreszenz-Farbstoffen 1,5-IAEDANS und IANBD-Ester (Molecular Probes) markiert worden war. Der Abstand der beiden Farbstoffe nahm bei

Ergebnisse

Inkubation mit 257cQ71 von ~ 30 Å auf ~ 40 Å zu, bei Inkubation mit 257cQ22 fand jedoch keine Konformationsänderung statt. Die Strukturänderung erreichte ihr Halbmaximum nach ~ 20 min, was den Resultaten des Zentrifugationsexperiments (Abb.3-17c) entsprach (Daten nicht gezeigt). Der Effekt des polyQ-Fragments 257cQ71 auf AT3Q22 ist somit vergleichbar mit dem Effekt von Htt-Exon1-53Q auf TBP (Schaffar et al., 2004).

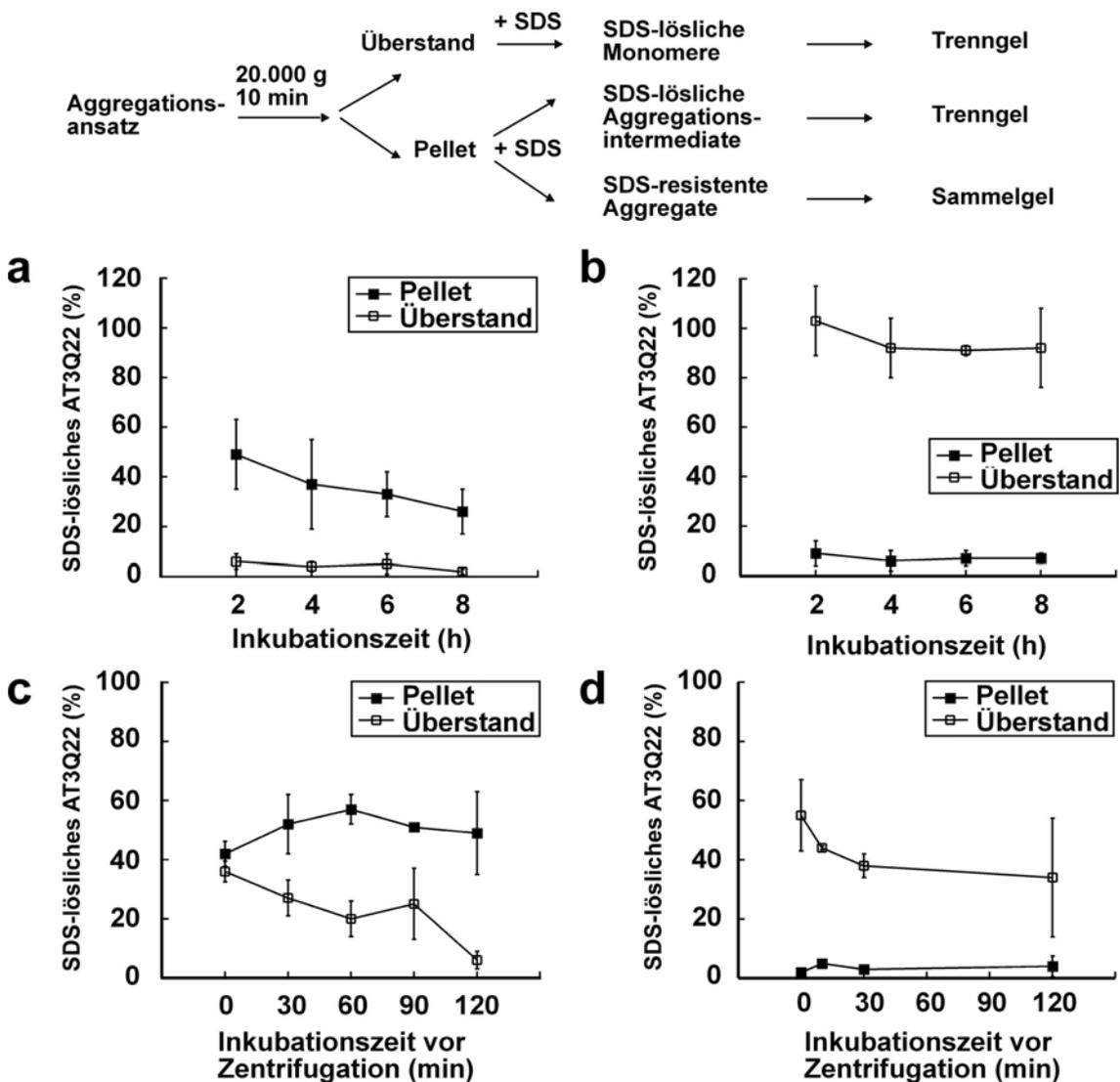


Abbildung 3-17: Rekrutierung von AT3Q22 in SDS-lösliche 257cQ71-Aggregationsintermediate.

Oben: Schematische Darstellung des Experiments. a) Aggregationsansätze von 257cQ71 ($2\mu\text{M}$) mit AT3Q22 ($0,1\mu\text{M}$) wurden sofort nach PP-Zugabe mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt (t_0) oder für 2-8 h inkubiert, dann bei $20.000\times g$ für 10 min zentrifugiert und die getrennten Überstand- und Pellet-Fractionen in Western Blot Analysen (anti-FLAG) eingesetzt. SDS-lösliches AT3Q22 im Trenngel (Monomer-Bande bei ~ 50 kDa) nach 2-8 h wurde quantifiziert und mit GST-AT3Q22 und freiem AT3Q22 vom Zeitpunkt t_0 verglichen (Gesamtmenge bei $t_0 = 100\%$). b) Experiment mit 257cQ22 (wie in a). c) Aggregationsansätze von 257cQ71 mit AT3Q22 wurden sofort nach PP-Zugabe mit SDS-PAGE-Probenpuffer erhitzt (t_0) oder sofort nach PP-Zugabe für 10 min zentrifugiert (0 min) bzw. für 30-120 min inkubiert und dann für 10 min zentrifugiert. Quantifizierung von SDS-löslichem AT3Q22 im Trenngel (wie in a). d) Experiment mit 186cQ71 (wie in c).

3.4.3 Koaggregation in *Saccharomyces cerevisiae*

In Hefen wurde eine mögliche Koaggregation durch Ko-Expression des 257cQ71-Fragments (pSI215-Vektor) mit AT3Qn (pSI216) von Plasmiden mit Kupfer-induzierbaren Promotoren untersucht. Nach Induktion für 24 h wurden native Hefe-Extrakte für Western Blot Analysen und Filtertests hergestellt. Die Expression der AT3Qn-Proteine konnte bestätigt werden (Abb.3-18a). Der Quotient der anti-FLAG / anti-myc-Signale wurde berechnet. Wie *in vitro* wurde eine polyQ-abhängige Rekrutierung von Vollängen-AT3 beobachtet, wobei AT3Q Δ nur zu sehr geringen Mengen koaggregierte (Abb.3-18b).

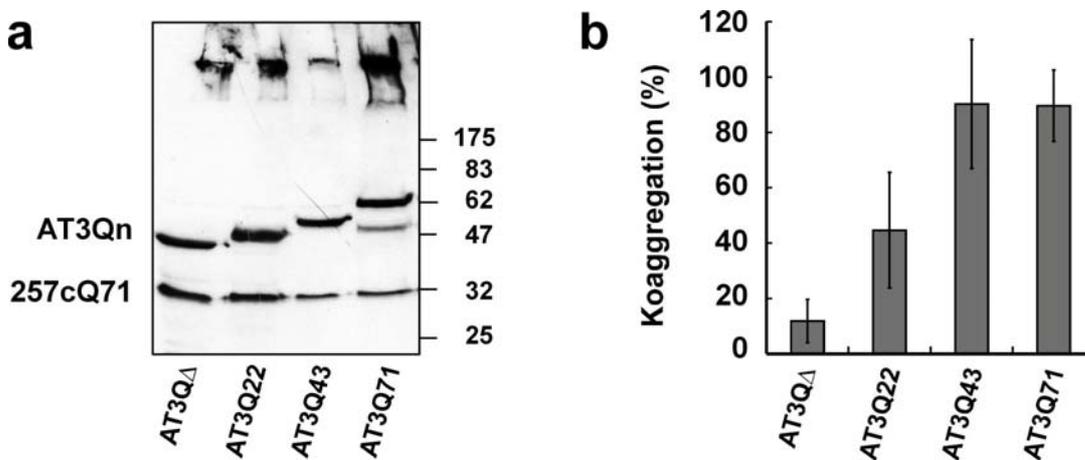


Abbildung 3-18: PolyQ-abhängige SDS-resistente Koaggregation in Hefe.

a) Die Expression von AT3Qn (pSI216) und 257cQ71 (pSI215) wurde durch Inkubation der Hefen (YPH499) mit CuSO₄ für 24 h induziert und in Western Blot Analysen (anti-myc) untersucht. b) Analyse der Koaggregation mittels Quantifizierung von Filtertests, wobei anti-myc-Antikörper zur Detektion der totalen Aggregation und anti-FLAG-Antikörper zur Detektion der Koaggregation von Vollängen-AT3 eingesetzt wurde. Der anti-FLAG/anti-myc-Quotient wurde berechnet und für 257cQ71 + AT3Q71 als 100% gesetzt.

3.4.4 PolyQ-abhängige Koaggregation und Verringerung der Ataxin3-Konzentration in Neuroblastomazellen

Zur Untersuchung der Koaggregation in Neuroblastomazellen wurden N2a-Zellen mit 257cQ71 und AT3Qn (pcDNA3.1hygro+) kotransfiziert (siehe Abb.3-5). Nach 48 h wurden Zellysate hergestellt und Filtertests zur Detektion der SDS-resistenten Aggregate durchgeführt (Abb.3-19a). Deren Quantifizierung weist auf eine lineare Abhängigkeit der Koaggregation von der Länge des polyQ-Bereichs (Quotient anti-FLAG / anti-myc) hin (Abb.3-19b). Wie *in vitro* (siehe Abb.3-15) wurde AT3Q71 Δ UIM genauso stark in 257cQ71-Aggregate rekrutiert wie AT3Q71. Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen bestätigten die biochemischen Daten der Filtertests. AT3Q22, AT3Q71 und AT3Q71 Δ UIM fanden sich nicht wie bei alleiniger Expression diffus im Cytoplasma und im Nukleus (siehe

Ergebnisse

Abb.3-6) sondern überwiegend in 257cQ71-Einschlüssen, wohingegen AT3 Δ Q nicht mit 257cQ71-Ablagerungen kolokalisierte (Abb.3-19c).

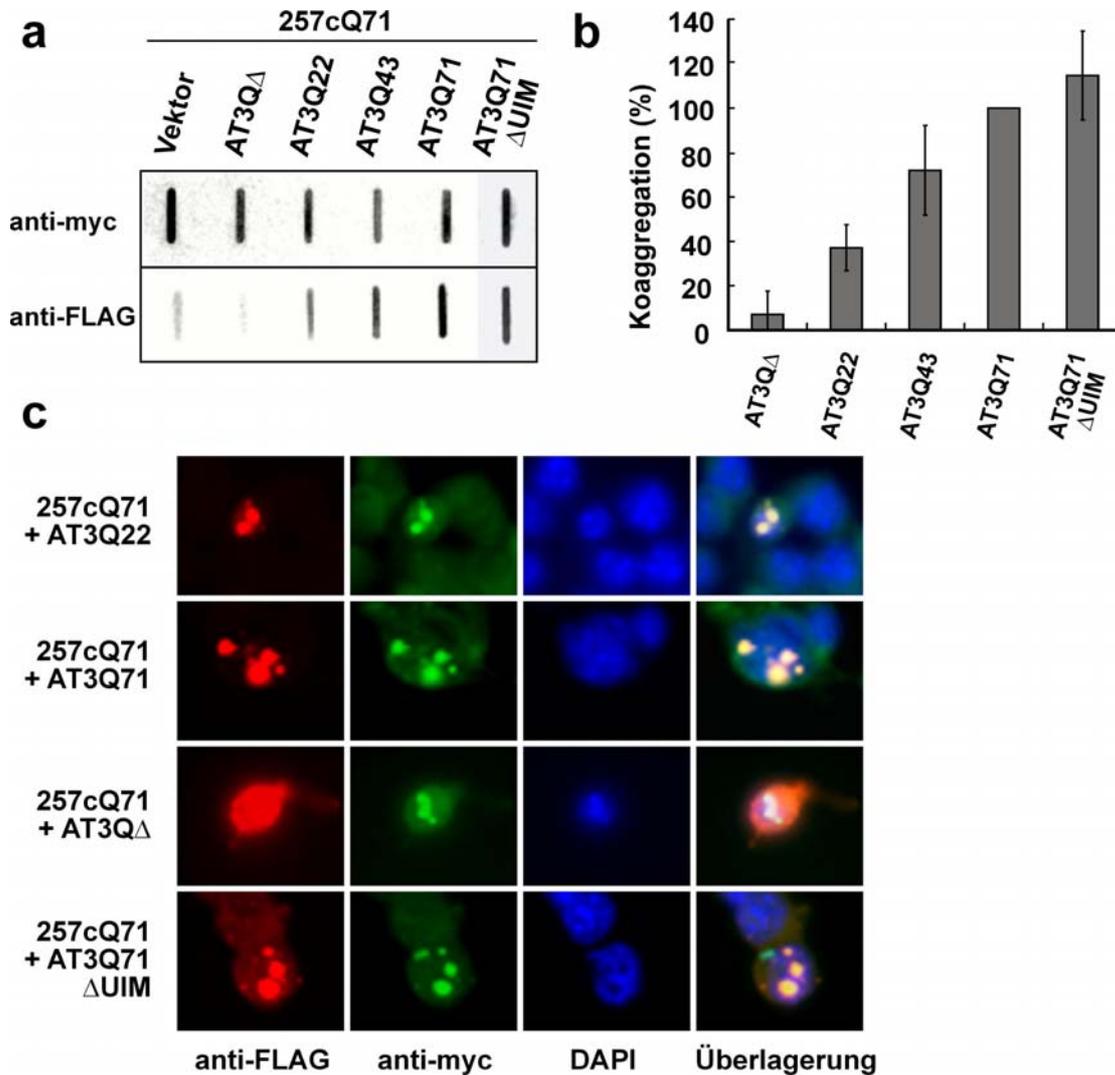


Abbildung 3-19: PolyQ-abhängige Koaggregation von AT3-Vollängenprotein in N2a-Zellen.

a) Nach transienter Transfektion von N2a-Zellen (pcDNA3.1) und 48 h Expression wurden Filtertests durchgeführt, wobei anti-myc-Antikörper zur Detektion der totalen Aggregation und anti-FLAG-Antikörper zur Analyse der Koaggregation der Vollängenproteine eingesetzt wurde. b) Analyse der Koaggregation mittels Quantifizierung von Filtertests (siehe a). Der berechnete anti-FLAG/anti-myc-Quotient der Kontrolle 257cQ71 (ohne Expression von AT3Qn) wurde von den anderen Quotienten subtrahiert. Der Quotient für 257cQ71 + AT3Q71 wurde als 100% gesetzt. (Mittelwert \pm Standardabweichung von 4 Experimenten) c) Immunfluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von N2a-Zellen nach 24 h Koexpression. Vollängen-AT3 wurde mit anti-FLAG-Antikörper und anti-Kaninchen-CY3 detektiert. Vollängen-AT3 und 257cQ71 wurden mit anti-myc und anti-Maus-FITC detektiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Andere Autoren hatten die Hypothese aufgestellt, Vollängen-AT3 würde durch Interaktion seiner UIMs mit Ubiquitin in ubiquitinylierte Aggregate hineingezogen (Donaldson et al., 2003). Da im Rahmen dieser Doktorarbeit jedoch kein Unterschied zwischen AT3Q71 und AT3Q71 Δ UIM detektiert wurde, kann diese Hypothese, die mittels Fluoreszenzmikroskopie

Ergebnisse

von GFP- und CFP-Fusionsproteinen aufgestellt worden war und nicht auf biochemischen Daten beruht, nicht bestätigt werden.

Um festzustellen, ob auch endogenes, nicht pathogenes humanes AT3 in Aggregate hineingezogen werden kann, wurden SH-SY5Y-Zellen transient mit 257cQ71 transfiziert. Zellysate wurden hergestellt, SDS-resistente Aggregate pelletiert und mit Ameisensäure aufgelöst (Hazeki et al., 2000). Vorversuche hatten gezeigt, daß Ameisensäure die *in vitro*-Aggregate von 257cQ71 auflöst (Filtertest), nicht aber die Peptidbindungen im Protein hydrolysiert (Western Blot Analyse; Daten nicht gezeigt). Western Blot Analysen zeigten das exprimierte 257cQ71-Protein bei 32 kDa sowie eine Bande bei ~40 kDa, die der humanen AT3-Bande in der Kontrollspur, in der Zellysate von untransfizierten Zellen aufgetragen wurden, entsprach (Abb.3-20a). Endogenes Wildtyp-AT3 konnte also in Aggregate, die durch 257cQ71-Expression gebildet wurden, rekrutiert werden. Als Kontrolle wurde dieselbe Membran nach *Stripping* mit anti-GAP-DH-Antikörper inkubiert. Es konnten keine Banden detektiert werden (Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, daß dieses zelluläre Protein nicht koaggregierte bzw. pelletiert wurde. Mit 257cQ22-transfizierten SH-SY5Y-Zellen wurde das gleiche Experiment durchgeführt, wobei keine Reaktion mit anti-AT3-Antikörper beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

Da Vollängen-AT3 in 257cQ71-Aggregate hineingezogen wird (Abb.3-19), stellte sich die Frage, in welchem Maße die Menge an löslichem Wildtyp-AT3 in der Zelle reduziert würde. Ein Modell zur Erklärung der Toxizität von polyQ-Proteinen basiert auf der Inaktivierung essenzieller zellulärer Proteine durch Wechselwirkung der polyQ-Bereiche bzw. durch Rekrutierung in polyQ-Aggregate (siehe 1.1.3). Ob AT3 eine essenzielle Rolle in der Zelle spielt, ist noch nicht bekannt, da bisher noch kein AT3-*knock out* untersucht wurde. Wenn dies der Fall wäre, sollte eine Verringerung der zellulären AT3-Konzentration zu einem AT3-Funktionsverlust (*loss of function*) und Toxizität führen.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden N2a-Tet-off-Zellen herangezogen, die den Tetrazyklin-kontrollierten Transaktivator (tTA) stabil exprimieren (Schaffar et al., 2004). Durch Zugabe von Doxyzyklin zum Kulturmedium wurde die Tet-regulierbare Expression vom pTRE2hyg-Plasmid (Promotor enthält *Tetracycline Response Element*) unterdrückt, während die Expression von einem pcDNA3.1-Plasmid nicht beeinflusst wurde. N2a-Tet-off wurden kotransfiziert mit pTRE2hyg-257cQ71 und pcDNA3.1-AT3Q22 und jeweils mit und ohne Doxyzyklin für 12, 24 und 48 h kultiviert. Zellysate wurden hergestellt und zur Überprüfung des Systems die Koaggregation im Filtertest mit anti-FLAG-Antikörper untersucht (Abb.3-20b oben). Bei Zugabe von Doxyzyklin (+DOX) fand nur sehr geringe

Ergebnisse

Aggregation statt. Wurden die Zellen ohne Doxyzyklin (-DOX) kultiviert, konnte deutliche Koaggregation detektiert werden. Im eigentlichen Experiment wurden Zelllysate mittels Western Blot Analyse auf die Menge von SDS-löslichem AT3Q22 untersucht. Die vorhandene SDS-lösliche AT3Q22-Menge bei +DOX Lysaten (keine 257cQ71-Expression) wurde als 100% gesetzt, worauf die Menge bei -DOX Lysaten (257cQ71-Expression) bezogen wurde. Die Expression von 257cQ71 (-DOX) führte zu einer deutlichen Abnahme der SDS-löslichen AT3Q22-Menge auf ~50% (Abb.3-20b unten). Als Kontrolle wurde das gleiche Experiment mit pTRE2hyg-257cQ22 und pcDNA3.1-AT3Q22 durchgeführt, wobei sich zeigte, daß die Expression von 257cQ22 die SDS-lösliche AT3Q22-Menge nicht verringerte (Abb.3-20c).

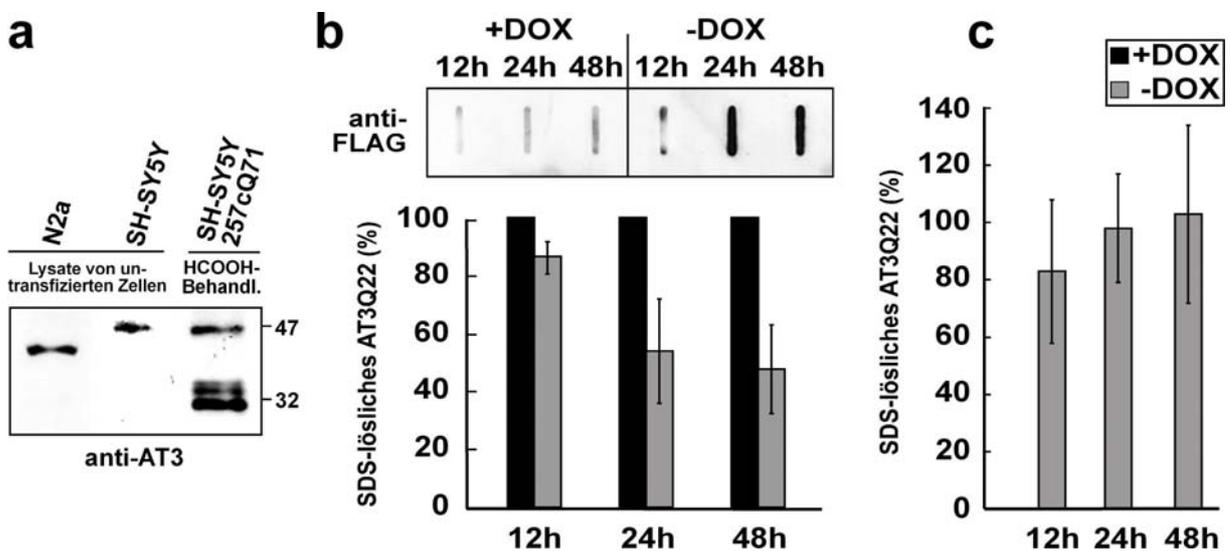


Abbildung 3-20: Koaggregation von endogenem AT3 in humanen Neuroblastoma-Zellen und Reduktion von SDS-löslichem AT3Q22 bei Koexpression mit 257cQ71 in N2a-Zellen.

a) Humane SH-SY5Y-Zellen wurden 60 h nach Transfektion mit 257cQ71 lysiert. SDS-resistente Aggregate wurden für 1 h bei 400.000xg pelletiert und mit Ameisensäure aufgelöst. Western Blot Analyse (anti-AT3) mit Lysaten von untransfizierten N2a- und SH-SY5Y-Zellen als Kontrollen. b) N2a-Tet-off-Zellen wurden kotransfiziert mit pTRE2hyg-257cQ71 und pcDNA3.1-AT3Q22 und jeweils mit und ohne Doxyzyklin (DOX) kultiviert. Analyse der SDS-resistenten Koaggregation im Filtertest (anti-FLAG; oben). Die in Western Blot Analysen (anti-AT3) detektierte SDS-lösliche AT3Q22-Menge wurde bei +DOX Lysaten als 100% gesetzt, worauf die Menge bei -DOX Lysaten bezogen wurde. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen wurden dieselben Membranen mit anti-GAP-DH-Antikörper behandelt und die Phosphoimager-Signale verrechnet. (Graphik unten; Mittelwert +/- Standardabweichung von 4 unabhängigen Transfektionen). c) Experiment mit pTRE2hyg-257cQ22 und pcDNA3.1-AT3Q22 (wie in b).

Trotz der Tatsache, daß man aus diesem Experiment nicht schlußfolgern kann, ob der von 257cQ71-ausgeübte Effekt auf die AT3Q22-Konzentration ausschließlich durch Koaggregation oder auch durch verstärkten proteasomalen Abbau des möglicherweise inaktivierten, in seiner Konformation veränderten AT3Q22 hervorgerufen wurde, kann man festhalten, daß die Expression des Fragments 257cQ71 in einer deutlichen Verringerung der

SDS-löslichen AT3Q22-Menge in der Zelle resultiert, was einer partiellen Inaktivierung von AT3 entsprechen sollte.

3.5 Einfluß der zellulären Lokalisation auf das Aggregationsverhalten

Für Htt liegen verschiedene Beobachtungen vor, die dessen Aggregationsverhalten und Toxizität abhängig von der zellulären Lokalisation beschreiben. In HEK293T führte die Fusion eines Kernlokalisierungssignals (NLS) bzw. eines Kernexportsignals (NES) mit Htt-(1-548) bzw. Htt-(1-151)-128Q zu keiner Veränderung der Gesamtmenge an Aggregaten bzw. der Toxizität (Hackam et al., 1999). In primären Neuronen zeigte NES-Htt-(1-171)-68Q keine Aggregation und resultierte in verringerter Apoptose im Gegensatz zu dem entsprechenden Konstrukt ohne NES (Saudou et al., 1998). Die Fusion einer NLS mit Htt-(1-63)-75Q hatte in N2a-Zellen keinen Effekt auf die Aggregation, führte jedoch zu verstärktem Zellverlust im Vergleich zum Konstrukt ohne NLS. Ein entsprechendes NES-Konstrukt resultierte in leicht verringerter Aggregation sowie reduziertem Zellverlust (Peters et al., 1999). In unserer Arbeitsgruppe wurde festgestellt, daß NLS-Htt-Exon1(=1-87)-53Q bzw. 96Q in Hefen deutlich schwächer und in N2a-Zellen geringfügig schwächer aggregiert als Htt ohne NLS-Sequenz (Schaffar, 2004; Schaffar et al., 2004)). Schließlich konnte bei transgenen Mäusen kein Unterschied im Phänotyp zwischen Htt-(1-171)-87Q und NLS-Htt-(1-171)-87Q festgestellt werden (Schilling et al., 2004). Für Ataxin1-(82Q) konnte gezeigt werden, daß dessen Kernlokalisierung eine Voraussetzung für Aggregation und Pathogenese bei transgenen Mäusen ist (Klement et al., 1998). Da für AT3 bisher keine experimentellen Beobachtungen, die Abhängigkeit der Aggregation von der Lokalisation betreffend, publiziert wurden, sollten in dieser Studie NLS- und NES-Fusionen von AT3 analysiert werden.

3.5.1 Aggregation von Ataxin3 mit Kernlokalisierungssignal in Hefe

Zur Überexpression von NLS-AT3 wurde vor (*upstream*) die bisher benutzten Konstrukte im pSI215-Vektor die Sequenz des Kernlokalisierungssignals des SV40 *large* T-Antigens in doppelter Ausführung (2xNLS = PPKKKRKVDPKKKKRKV) kloniert. Nach Induktion mit CuSO₄ wurden native Hefe-Extrakte hergestellt und Filtertests durchgeführt. Die Vollängen-Proteine NLS-AT3Qn zeigten wie die Konstrukte ohne NLS (siehe Abb.3-4a) keine SDS-resistenten Aggregate, die auf dem Filter zurückgehalten wurden (Abb.3-21a). Auch für NLS-257cQ22 war kein Unterschied im Vergleich zu 257cQ22 detektierbar. Die Fragmente NLS-

Ergebnisse

186cQ71, NLS-221cQ71 und NLS-242cQ71 zeigten im Gegensatz zu den Konstrukten ohne NLS deutliche Aggregation im Filtertest. Das Fragment 257cQ71 aggregierte mit NLS-Sequenz genauso stark wie ohne NLS. Western Blot Analysen bestätigten die Expression der AT3-Proteine (Ausnahme: NLS-AT3Q22) und zeigten bei den 71Q-Fragmenten (NLS-186cQ71, NLS-221cQ71, NLS-242cQ71, NLS-257cQ71) und auch beim Vollängenprotein (NLS-AT3Q71) SDS-resistentes Material in den Taschen des Sammelgels (Abb.3-21b).

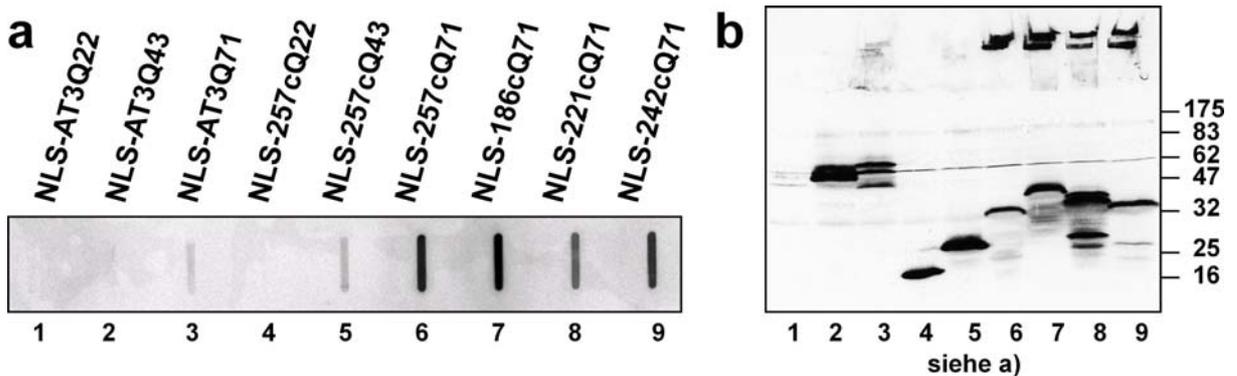


Abbildung 3-21: SDS-resistente Aggregation in Hefe.

- a) Die AT3-Expression wurde durch Inkubation der Hefen (YPH499, pSI215) mit CuSO_4 für 24 h induziert. Filtertest (anti-myc) der nativen Hefe-Extrakte (inkl. 1% Triton-X100 zur Solubilisierung der Kernmembran).
b) Western Blot Analyse (anti-myc) inklusive Taschen des Sammelgels.

Der Vergleich der NLS-Konstrukte (Abb.3-21a) mit denen ohne Kernlokalisierungssignal (Abb.3-4a) zeigt, daß die AT3-Fragmente 186cQ71, 221cQ71 und 242cQ71 mit NLS stärker aggregierten. Diese Unterschiede könnten durch das normale Aggregationsverhalten von AT3 erklärt werden, welches in N2a-Zellen überwiegend im Zellkern aggregierte (Abb.3-6). In Hefe könnte im Vergleich zu der Situation in N2a-Zellen der Kern-Transport von Konstrukten ohne NLS wesentlich ineffizienter ablaufen und deshalb die Aggregation verringert sein.

3.5.2 Ataxin3 mit Kernlokalisations- und Kernexportsignal in N2a-Zellen

Um die Kernlokalisierung von AT3 in N2a-Zellen zu bewerkstelligen, wurde die 2xNLS-Konstrukte aus den Hefe-Vektoren (pSI215) in pcDNA3.1-Plasmide kloniert.

Immunfluoreszenz-Mikroskopie von transient transfizierten N2a-Zellen zeigte, daß sich NLS-AT3Q22, NLS-AT3Q71 und NLS-257cQ22 ausschließlich im Zellkern befanden (Abb.3-22 links), Proteinablagerungen waren jedoch nicht zu beobachten. In NLS-257cQ71-exprimierenden Zellen fanden sich genauso wie in 257cQ71-exprimierenden Zellen Einschlüsse im Nukleus.

Ergebnisse

Im Filtertest wurden keine deutlichen Unterschiede zwischen der SDS-resistenten fibrillären Aggregation der NLS-AT3-Proteine und der entsprechenden Proteine ohne NLS detektiert (Abb.3-23 a-b). Durch Transport in den Zellkern ließ sich das pathologische Volllängenprotein (NLS-AT3Q71) also nicht zur Aggregation bringen, was zeigt, daß die Aggregation von AT3 nicht von der zellulären Lokalisation sondern von der Länge der N-terminalen Proteinsequenz abhängig ist.

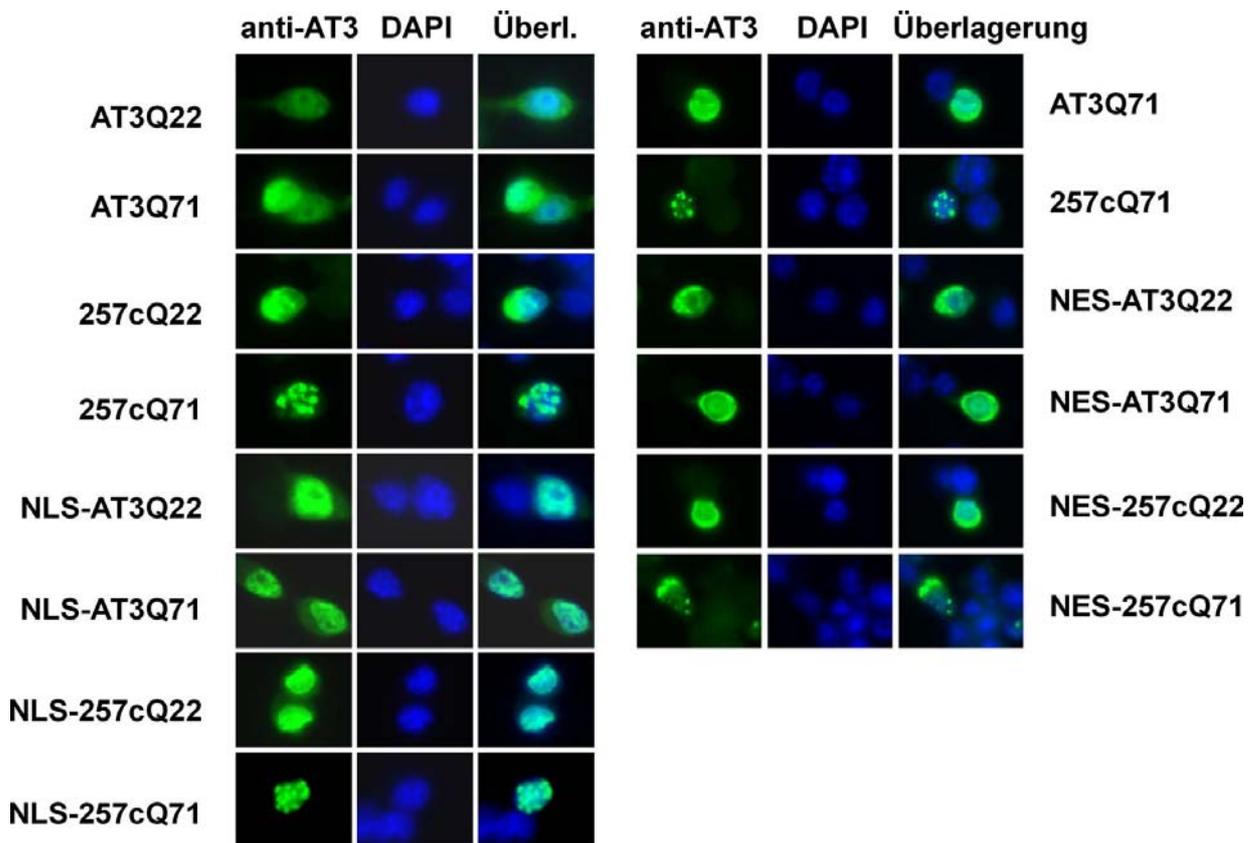


Abbildung 3-22: Immunfluoreszenz-Mikroskopie von NLS- und NES-AT3-exprimierenden N2a-Zellen. Nach transienter Transfektion mit pcDNA3.1-Plasmiden und 24 h Expression wurden die N2a-Zellen fixiert. AT3-Proteine wurde mit anti-AT3-Antikörper und anti-Kaninchen-FITC, Zellkerne mit DAPI detektiert.

Zur Überexpression von cytoplasmatischen AT3-Proteinen wurde die 2xNLS-Sequenz (*upstream* = N-terminal) der bisher benutzten Konstrukte durch das Kernexportsignal (NES = LALKLAGLDI) des Proteinkinase Inhibitors Alpha ersetzt. Bei Immunfluoreszenz-Mikroskopie der transient transfizierten N2a-Zellen zeigte sich überwiegend cytoplasmatische Lokalisation der Proteine NES-AT3Q22, NES-AT3Q71 und NES-257cQ22. Proteinablagerungen konnten nicht detektiert werden. Das Protein NES-257cQ71 aggregierte überwiegend im Cytoplasma. Im Gegensatz zu 257cQ71 zeigte NES-257cQ71 nur selten mehrere punktförmige, voneinander getrennte Einschlüsse, stattdessen einander berührende Proteinablagerungen (Abb.3-22 rechts).

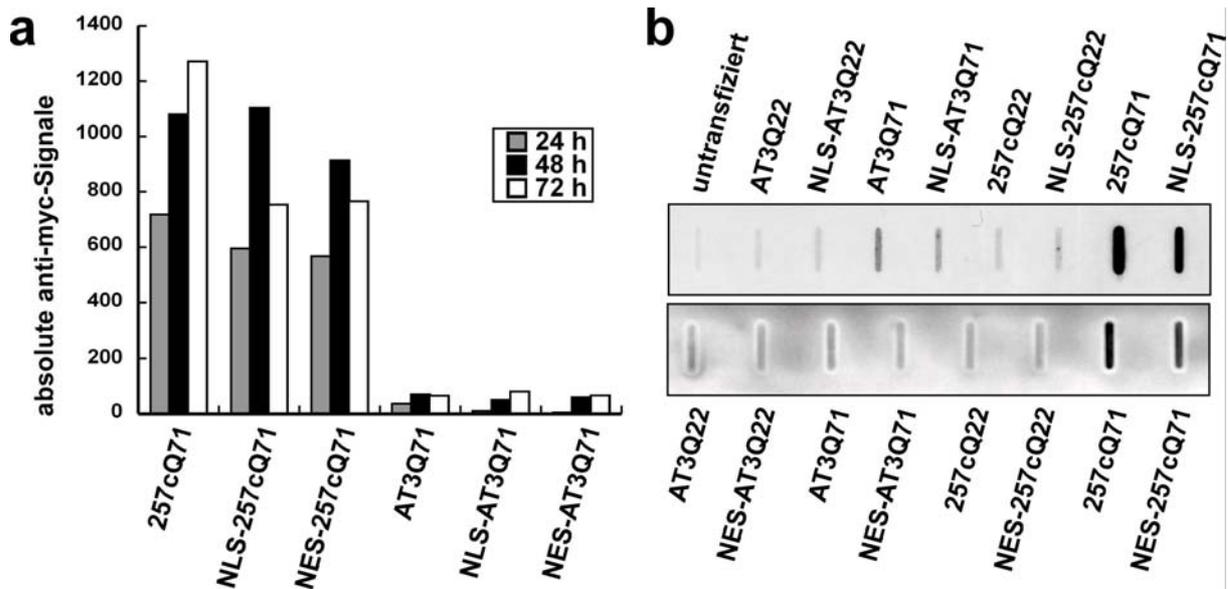


Abbildung 3-23: NLS- und NES-Sequenzen beeinflussen die AT3-Aggregation in N2a-Zellen nicht.

a) Quantifizierung der SDS-resistenten Aggregation im Filtertest (anti-myc) mit Lysaten von transient transfizierten N2a-Zellen (pcDNA3.1). b) Filtertests (anti-myc) nach 48 h Expression.

Die SDS-resistente Aggregation der NES-AT3-Proteine wurde mit Hilfe von Filtertests analysiert, wobei sich kein Unterschied in der Aggregationsmenge im Vergleich zu den entsprechenden Konstrukten ohne Signalsequenz oder mit NLS ergab (Abb.3-23 a-b). Dies läßt die Schlußfolgerung zu, daß 257cQ71 im Cytoplasma genauso effizient aggregiert wie im Nukleus und für seine Aggregation keine Kernlokalisierung nötig ist, was die bisher gemachte Annahme unterstützt, daß die Aggregation von AT3 nicht von der zellulären Lokalisation sondern von der Länge der N-terminalen Proteinsequenz abhängig ist.

3.5.3 Analyse von Ataxin3-Mutanten des endogenen putativen Kernlokalisierungssignals in Neuroblastomazellen

Die AT3-Sequenz RKRR (282-285), die N-terminal des polyQ-Bereichs liegt, wird als putatives Kernlokalisierungssignal angesehen (*PSORT II prediction*, (Albrecht et al., 2004)). Da endogenes AT3 und überexprimiertes AT3Qn sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern (Daten nicht gezeigt und Abb.3-6), die aggregierten Fragmente von 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 jedoch fast ausschließlich im Nukleus detektiert wurden, besteht die Möglichkeit, daß die endogene Kernlokalisationssequenz (RKRR) im Vollängenprotein maskiert wird, jedoch im Fragment frei zugänglich ist und so den Kerntransport auslöst.

Um zu überprüfen, ob die Sequenz RKRR tatsächlich die Kernlokalisierung von 257cQ71 hervorruft, sollte sie mittels zielgerichteter Mutagenese durch eine andere Sequenz ersetzt

Ergebnisse

werden. Ein Austausch von Arginin (R) gegen Glutamin (Q) oder Histidin (H) und von Lysin (K) gegen Asparagin (N) sollte laut Dayhoff-Mutationsmatrix möglichst wenige Strukturveränderungen bewirken. Da die Sequenz RKRR nur 6 Aminosäuren vom polyQ-Bereich entfernt ist, wurde R nicht gegen Q sondern gegen H ausgetauscht, was in der Sequenz HNHH resultierte. Für die normale AT3-Vollängensequenz wurde die Sequenz RKRR als NLS vorhergesagt, in der AT3-Vollängensequenz mit der Mutation HNHH wurde jedoch keine NLS erkannt (*PSORT II prediction* auf der Seite <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp>). Zellysate von 257cQ71- und 257cQ71-RKRR>HNHH-exprimierenden N2a-Zellen wurden hergestellt. Filtertests ergaben gleiche Mengen an SDS-resistenten Aggregaten (Daten nicht gezeigt). In Western Blot Analysen konnte jedoch ein abweichendes Bandenmuster von 257cQ71-RKRR>HNHH im Vergleich zu 257cQ71 festgestellt werden (Abb.3-24a). Ein Vergleich von N2a-Lysaten mit gereinigten, PP-geschnittenen GST-AT3-Proteinen mittels Western Blot Analyse zeigte, daß verschiedene AT3-Fragmente zusätzlich zur erwarteten Bande im Gel sowohl schnelleres als auch langsames Laufverhalten zeigten, was auf Modifikationen sowie Degradationen hinweist (Abb.3-24c). Zusätzlich zur gemeinsamen Modifikationsbande von 257cQ71 und 257cQ71-RKRR>HNHH weist letzteres noch eine weitere Bande bei einer größeren Molekülmasse auf, über die jedoch keine weitere Aussage gemacht werden kann.

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurde die Lokalisation von 257cQ71- und 257cQ71-RKRR>HNHH-Einschlüssen in N2a-Zellen untersucht. Dabei wurden Zellen den drei Kategorien (1. überwiegend nukleäre Aggregate, 2. überwiegend cytoplasmatische Aggregate oder 3. Aggregate gleichermaßen in Cytoplasma und Nukleus) zugeordnet und gezählt. Der prozentuale Anteil der Zellen in diesen drei Kategorien wurde berechnet. In der Lokalisation von 257cQ71- und 257cQ71-RKRR>HNHH-Aggregaten war kein deutlicher Unterschied zu beobachten (Abb.3-24b links). Da die Histidine in der Sequenz HNHH ebenfalls basisch sind und somit noch 3 von 4 basischen Aminosäuren vorlagen, wäre dieser geringe Effekt auf die Lokalisation der Aggregate durch die Wahl der Mutation denkbar.

Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde die Sequenz RKRR im 71Q-Fragment deletiert (257cQ71- Δ RKRR). Ein Vergleich der Aggregationsmenge von 257cQ71- Δ RKRR mit 257cQ71 im Filtertest ergab, daß die SDS-resistente Aggregation nicht durch die Deletion der Sequenz RKRR beeinflusst wurde (Daten nicht gezeigt). Für 257cQ71- Δ RKRR wurde in Western Blot Analysen ein abweichendes Bandenmuster im Vergleich zu 257cQ71 festgestellt (Abb.3-24a), das dem von 257cQ71-HNHH entsprach. Somit kann eine

Ergebnisse

spezifische Modifikation der Sequenz HNHH als Ursache der Entstehung der zusätzlichen Bande bei ~45kDa ausgeschlossen werden.

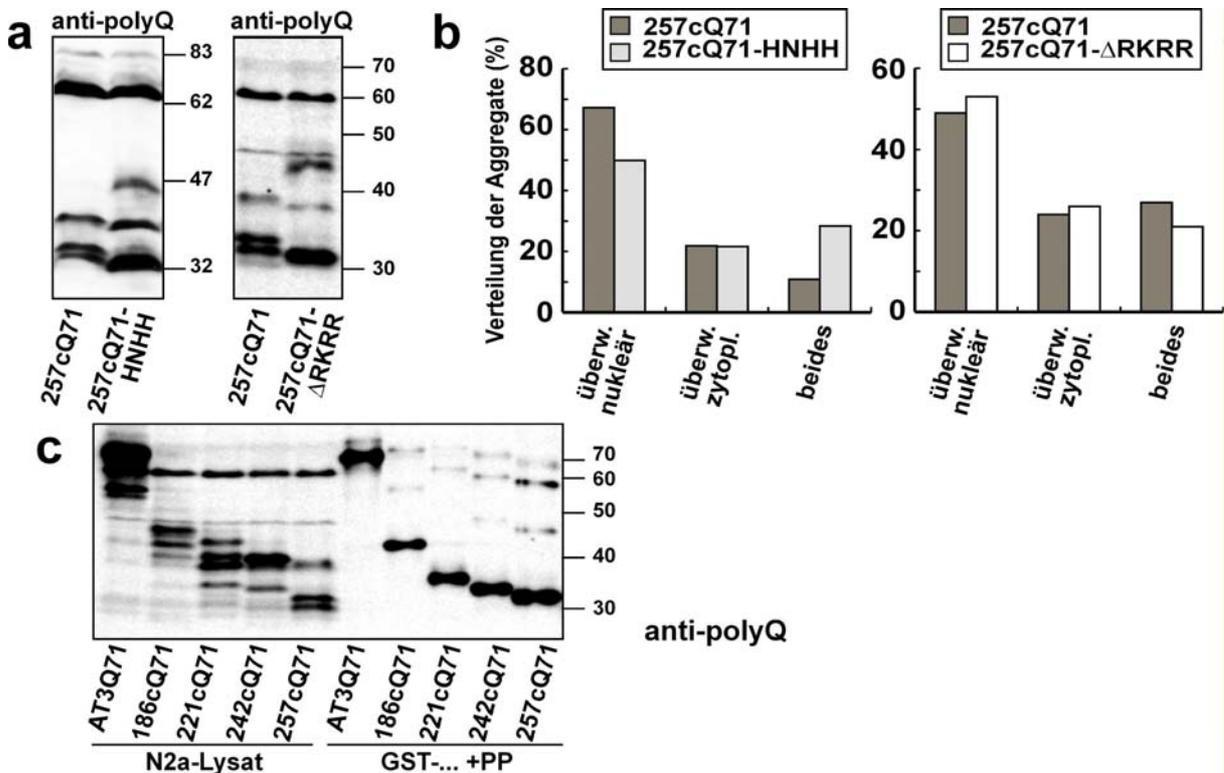


Abbildung 3-24: RKRR-Mutationen beeinflussen die Lokalisation von Aggregaten in N2a-Zellen nicht.

a) N2a-Zellen wurden transient transfiziert mit pcDNA3.1-257cQ71, 257cQ71-(RKRR>HNHH) oder 257cQ71-ΔRKRR. Western Blot Analysen (anti-polyQ) nach 24 h Expression. b) Lokalisierung der zellulären Einschlusskörperchen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie. AT3-Proteine wurde mit anti-myc-Antikörper und anti-Maus-FITC detektiert. Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Zellen (~70 pro Konstrukt) wurden zu den Kategorien 1. (überwiegend nukleäre Einschlüsse), 2. (überwiegend cytoplasmatische Einschlüsse) oder 3. (Einschlüsse in Kern und Cytoplasma) zugeordnet und gezählt. Die prozentuale Verteilung wurde berechnet. c) Western Blot Analyse (anti-polyQ) mit N2a-Zelllysaten und gereinigten, PP-geschneitenen GST-AT3-Proteinen.

Mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie wurden N2a-Zellen, die Einschlusskörperchen zeigten, wiederum den drei Kategorien zugeordnet (1. überwiegend nukleäre Aggregate, 2. überwiegend cytoplasmatische Aggregate oder 3. Aggregate gleichermaßen in Cytoplasma und Nukleus) und gezählt. Dabei wurden in diesem Versuch weniger nukleäre 257cQ71-Aggregate detektiert als in vorherigen Experimenten (vergleiche Abb.3-24b links und rechts). Auch die Deletion der RKRR-Sequenz verursachte keine Änderung in der Lokalisation der Proteinablagerungen (Abb.3-24b rechts). Somit ist davon auszugehen, daß es sich bei der RKRR-Sequenz nicht um ein Kernlokalisierungssignal handelt, sondern daß der Transport in den Zellkern durch eine andere Sequenz oder durch Diffusion hervorgerufen wird.

3.6 Einfluß der proteolytischen Ataxin3-Spaltung auf das Aggregationsverhalten

Wie bereits in Filtertests mit gereinigten GST-AT3-Proteinen *in vitro* sowie in Hefe und in Zellkultur (Kapitel 3.1) festgestellt wurde, zeigen die Vollängen-AT3-Proteine eine sehr geringe Neigung zur Aggregation. Mit der Expression von AT3 im menschlichen Gehirn als Vollängenprotein könnte der Krankheitsbeginn im fortgeschrittenen Alter durch die verzögerte proteolytische Spaltung des Vollängenproteins zum polyQ-enhaltenden Fragment erklärt werden. Somit wäre die Proteolyse der Auslöser der Erkrankung, da erst durch sie die veränderten Eigenschaften des „toxischen Fragments“ und letztendlich die Aggregation hervorgerufen würden (siehe 1.3 und 1.4).

3.6.1 Aggregation von pathologischem Vollängen-Ataxin3 in N2a-Zellen

In Western Blot Analysen mit N2a-Lysaten von AT3Q22- bzw. AT3Q71-exprimierenden Zellen zeigte sich ein Muster von Abbaubanden, die sich in der Pellet-Fraktion (20.000xg-Zentrifugation) anreichern ließen (Abb.3-25a links). In AT3Q71-exprimierenden N2a-Zellen ließen sich 72 h nach Transfektion polyQ-enhaltende Fragmente detektieren, die in SDS-PAGE bei etwa 30 kDa liefen und somit kleiner als das aggregationskompetente 257cQ71-Fragment (~32 kDa) waren (Abb.3-25a rechts). Filtertests mit AT3Q71 und 257cQ71 zeigten, daß mit zunehmender Expressionszeit des Vollängenproteins dessen Aggregation zunahm (Abb.3-25b). Eine Quantifizierung der Filtertests ergab, daß AT3Q71 zu 5-10% im Vergleich zu 257cQ71 aggregierte (Abb.3-25f). Auszählungen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie lieferten ein ähnliches Ergebnis. Es wurden mehrere punktförmige Proteinablagerungen bei 5-10% der AT3Q71-exprimierenden N2a-Zellen detektiert. Von allen 257cQ71-exprimierenden N2a-Zellen zeigten ~90% Einschlüsse (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu der Reaktion mit anti-myc-Antikörper ließen sich die Aggregate von AT3Q71 im Filtertest sowie in Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit anti-FLAG-Antikörper detektieren, was auf ein Vorhandensein des Vollängenproteins mit N-terminalem FLAG-Epitop hinweist (Daten nicht gezeigt und Abb.3-25d).

Um die Zusammensetzung der AT3Q71-Aggregate zu analysieren, wurden SDS-resistente Aggregate in den Zelllysaten pelletiert und anschließend mit Ameisensäure aufgelöst. Als Kontrolle wurden aufgelöste Aggregate von 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71-exprimierenden Zellen benutzt. In Western Blot Analysen mit anti-AT3- und anti-polyQ-

Ergebnisse

Antikörpern zeigte sich, daß die AT3Q71-Aggregate aus Volllängenprotein und mehreren polyQ-enthaltenden AT3-Fragmenten bestanden (Abb.3-25c).

Die bei 30-50 kDa detektierten Fragmente wurden wiederholt in voneinander unabhängigen Experimenten beobachtet, was auf eine spezifische Spaltung des Volllängen-AT3 in N2a-Zellen hindeutet. Die kleinsten Fragmente besaßen exakt dieselbe Größe wie die exprimierten 257cQ71-Fragmente. Die aufgelösten Aggregate der 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71-exprimierenden Zellen zeigten Banden in der erwarteten Größe, die in der Reihenfolge 221cQ71 bis 257cQ71 in ihrer Größe abnahmen, zusätzlich jedoch auch kleinere Fragmente, die auf eine proteolytische Spaltung dieser Proteine hinweisen (Abb.3-25c, siehe Abb.3-5b). Ein Test auf Rekrutierung von anderen zellulären Proteinen wie Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (anti-GAP-DH) ergab kein Signal in der Western Blot Analyse (Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, daß dieses in der Zelle hochkonzentrierte Protein nicht koaggregierte oder bei der Ultrazentrifugation pelletiert wurde.

Die gezeigten experimentellen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß das AT3Q71-Volllängenprotein von einer bislang unbekanntem Protease geschnitten wird, und die dabei entstandenen polyQ-Fragmente beginnen zu aggregieren. Mit stattfindender Aggregation wird eine Koaggregation des ungespaltenen AT3Q71 möglich (siehe Abb.3-19).

Um letztendlich einen Zusammenhang zwischen proteolytischer Spaltung und Aggregation zu beweisen, wurde in Kooperation mit Peter Breuer und Nikolay Tzvetkov ein AT3Q71T-Konstrukt hergestellt, welches aus der AT3-Volllängensequenz mit 71Q und einer zwischen den Aminosäuren 260 und 261 eingefügten TEV (*tobacco etch virus*)-Protease-Schnittstelle (Sequenz ENLYFQG) besteht. Ein entsprechendes Konstrukt mit 22Q wurde ebenfalls kloniert. Die AT3Q22T- und AT3Q71T-Proteine wurden zusammen mit der TEV-Protease in N2a-Zellen exprimiert.

In Western Blot Analysen wurde eine vollständige Spaltung von AT3Q22T und AT3Q71T detektiert, die bisher benutzten Proteine AT3Q22 und AT3Q71 (ohne TEV-Schnittstelle) wurden jedoch nicht gespalten (Abb.3-25e), was zeigt, daß die TEV-Protease die TEV-Schnittstelle effizient und spezifisch schneidet. Mit dieser Methode wurde also in den Zellen ein ~261cQ71-Fragment durch proteolytische Spaltung des Volllängenproteins generiert. Zur Bestimmung der SDS-resistenten Aggregation wurden Zellysate von N2a-Zellen, die AT3Q71, AT3Q71T bzw. 257cQ71 mit der TEV-Protease koexprimiert hatten, in Filtertests eingesetzt. Eine Quantifizierung ergab, daß AT3Q71T (bei Koexpression mit TEV-Protease) annähernd die gleiche Aggregation wie 257cQ71 zeigte, wohingegen AT3Q71 zu 5-10% im Vergleich zu 257cQ71 aggregierte (Abb.3-25f). Zusammenfassend kann man also feststellen,

Ergebnisse

daß eine intrazelluläre proteolytische Spaltung von AT3-Volllängenprotein mit pathologischem polyQ-Bereich in einer Aggregation der generierten polyQ-Fragmente resultiert, was die *toxic fragment*-Hypothese (siehe 1.3.1) unterstützt.

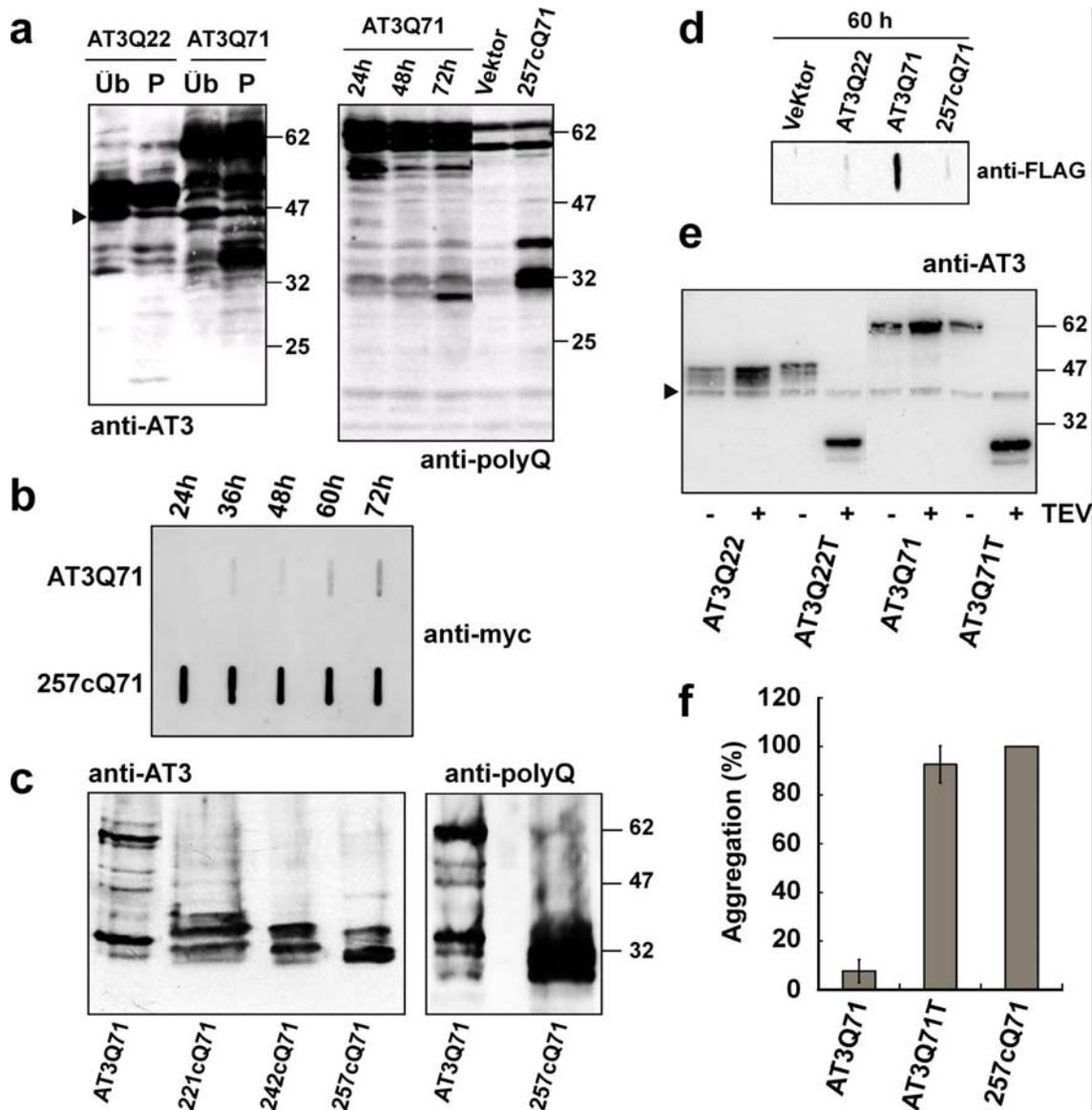


Abbildung 3-25: Proteolytische Spaltung von AT3Q71 resultiert in N2a-Zellen in Aggregation.

a) Links: N2a-Zelllysate (60 h Expression) wurden für 1 h bei 20.000xg zentrifugiert. Western Blot Analyse (anti-AT3) mit Überstand-Fraktionen und 4-facher Menge der resuspendierten Pellet-Fraktionen. Die endogene Maus-AT3-Bande ist mit einem Pfeil markiert. Rechts: Western Blot Analyse (anti-polyQ) mit N2a-Lysaten. b) SDS-resistente Aggregation im Filtertest (anti-myc) von N2a-Lysaten 24-72 h nach Transfektion. c) SDS-resistente Aggregate in N2a-Lysaten (nach 60 h Expression) wurden für 1 h bei 400.000xg pelletiert und mit Ameisensäure aufgelöst. Western Blot Analysen (anti-AT3/-polyQ). d) SDS-resistente Aggregation im Filtertest (anti-FLAG). e) N2a-Zellen wurden mit Plasmiden für die genannten Konstrukte (bisheriges AT3Qn oder AT3QnT = AT3Qn mit TEV-Schnittstelle an Position 260) mit oder ohne TEV-Protease-Plasmid (siehe 2.7.3) transfiziert. Western Blot Analyse nach 48 h Koexpression (anti-AT3). Der Pfeil markiert die Maus-AT3-Bande. f) Die genannten Proteine wurden zusammen mit der TEV-Protease für 72 h koexprimiert. Es folgte eine Quantifizierung der SDS-resistenten Aggregate im Filtertest (anti-myc), wobei die Aggregation von 257cQ71 als 100% gesetzt wurde.

3.6.2 Einfluß von Staurosporin auf die Ataxin3-Spaltung in Säugetierzellen

Da es Hinweise auf die Spaltung von polyQ-Proteinen durch Caspasen gibt (siehe 1.3.3), wurde der Effekt von Staurosporin auf die AT3-Spaltung in Zellkultur untersucht. Staurosporin aus *Streptomyces* sp. ist ein zellpermeabler Inhibitor von Proteinkinasen, führt zu einem Zellzyklusarrest am G₁-Kontrollpunkt (*checkpoint*) und induziert programmierten Zelltod (Apoptose) via Caspase-Aktivierung. Die Zugabe von Staurosporin zum Medium induzierte bzw. verstärkte die Fragmentierung von AT3Q22 und AT3Q71 (Abb.3-26 a-b). In Lysaten von AT3Q71-exprimierenden N2a-Zellen konnte in Western Blot Analysen ein polyQ-enhaltendes Fragment bei etwa 33 kDa detektiert werden, und mit anti-AT3-Antikörper wurden mehrere Fragmentbanden bei 22, 24, 28, 31, 33 kDa detektiert (Abb.3-26b). Bei Expression von 257cQ71 wurde eine Doppelbande bei 30 kDa beobachtet. Es stellte sich daher die Frage, ob das etwa 3 kDa größere polyQ-Fragment aggregationskompetent ist. In Filtertests mit verschiedenen Antikörpern (anti-myc, anti-AT3, anti-polyQ) zeigte sich keine verstärkte Aggregation von AT3Q71 bei Staurosporin-Behandlung (Daten nicht gezeigt). Gründe dafür könnten die für die Aggregation zu kurze Zeitspanne von 3 - 14 h (>14 h: Staurosporin toxisch) oder die zu geringe Konzentration des Fragments in der Zelle gewesen sein.

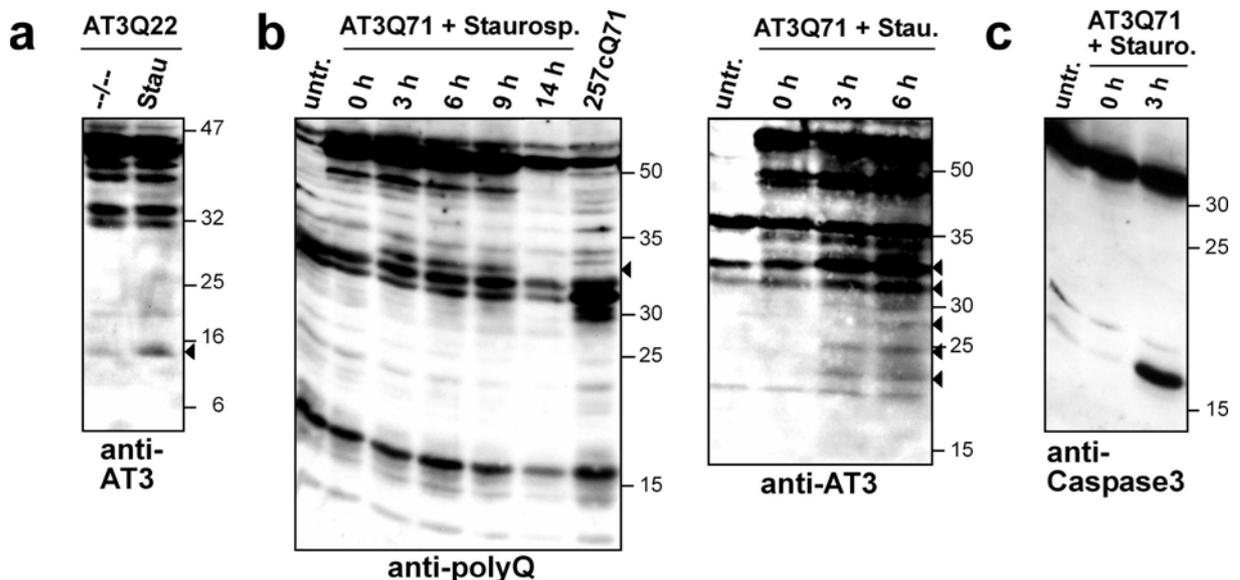


Abbildung 3-26: Staurosporin induziert proteolytische Spaltung von Vollängen-AT3 in N2a-Zellen.

a) N2a-Zellen wurde mit pcDNA3.1-AT3Q22 transient transfiziert und mit 1 μ M Staurosporin für 5 h inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3). Das induzierte Fragment ist mit einem Pfeil markiert. b) AT3Q71-exprimierende N2a-Zellen wurden für 0-14 h mit 1 μ M Staurosporin kultiviert. Western Blot Analysen (anti-polyQ/-AT3) zusammen mit Lysaten von untransfizierten oder 257cQ71-exprimierenden Zellen. Pfeile markieren die durch Staurosporin-induzierten AT3-Fragmente. c) Western Blot Analyse (anti-Caspase-3) mit Lysaten von untransfizierten oder AT3Q71-transfizierten Zellen, die für 0-3 h mit 1 μ M Staurosporin kultiviert wurden.

Ergebnisse

Caspasen aktivieren sich gegenseitig durch proteolytische Spaltung, wobei ein Schnitt die Prodomäne (N-Peptid) entfernt, und ein zweiter Schnitt die große und kleine Caspase-Untereinheit voneinander trennt. Caspase-3 steht am Ende dieser Aktivierungskaskade, ist für die meisten apoptotischen Effekte verantwortlich und sollte letztendlich aktiviert werden, unabhängig davon, wo die Kaskade ihren Ursprung nahm (siehe 1.3.3). Western Blot Analysen sollten zeigen, ob in Staurosporin-behandelten N2a-Zellen eine Aktivierung der Caspase-3 stattfand, wobei die Procaspase zu p20, p17 und p11-Fragmenten gespalten würde. Eine Aktivierung der Caspase-3 bei Staurosporin-Behandlung wurde bestätigt, da die Procaspase (32 kDa) sowie das p17-Fragment (17 kDa) detektiert werden konnten (Abb.3-26c, 3-27a). Die Expression von AT3Q71 oder 257cQ71 ohne Staurosporin-Zugabe führte jedoch nicht zur Caspase-3 Aktivierung (Abb.3-26c und Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß die Expression eines aggregierenden Proteins mit pathologischem polyQ-Bereich nicht ausreicht, um Toxizität und Apoptose in N2a-Zellen zu induzieren.

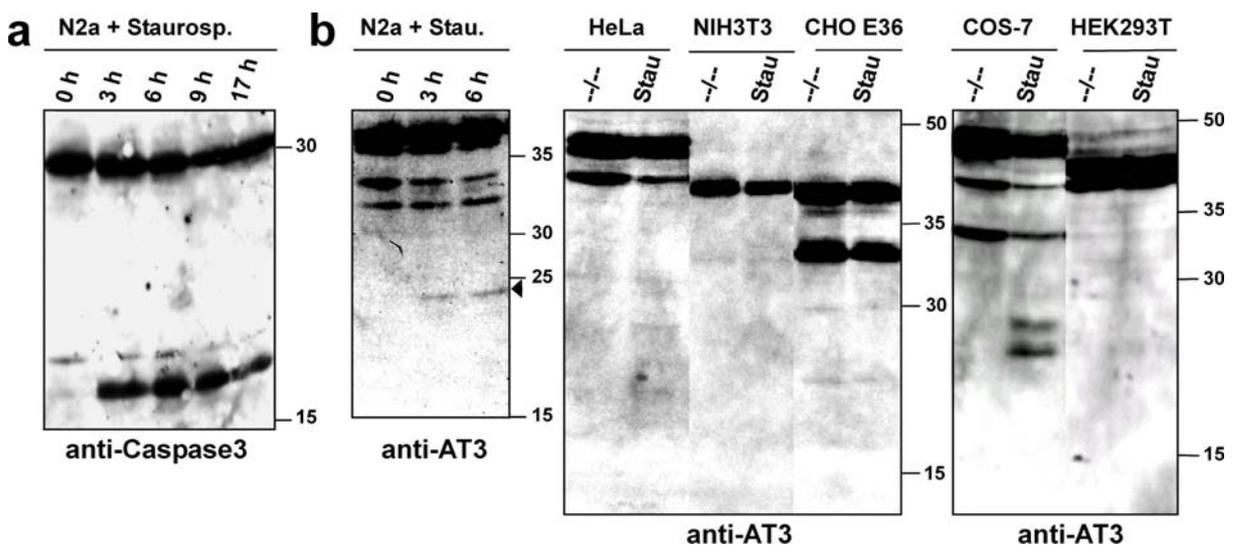


Abbildung 3-27: Staurosporin induziert Fragmentierung von endogenem AT3 in N2a- und COS-7-Zellen.
a) Untransfizierte N2a-Zellen wurden mit 1 μ M Staurosporin für 0-17 h kultiviert. Western Blot Analyse (anti-Caspase-3). b) Untransfizierte Zellen verschiedener Zelllinien wurden mit 1 μ M Staurosporin für 6 h inkubiert. (N2a-Zellen für 3 bzw. 6 h). Western Blot Analysen (anti-AT3).

Der Effekt von Staurosporin auf die Spaltung von endogenem AT3 wurde außer in Maus-Neuroblastomazellen (N2a) in Maus-Fibroblasten (NIH3T3), humanen Nierenzellen (HEK293T), humanen Cervixkarzinomazellen (HeLa), epithelialen Affenzellen (COS-7) sowie in Hamster-Ovarzellen (CHO E36) untersucht. N2a-Zellextrakte zeigten ein 24 kDa-Fragment des Maus-Ataxins mit schwachem Signal (Abb.3-27b). Nur in COS-7-Zellen zeigte sich eine deutliche Spaltung von AT3 (Abb.3-27b), was ebenfalls von anderen Autoren festgestellt wurde (Berke et al., 2004). In HeLa-Zellen war nur in wenigen Experimenten ein

Fragment erkennbar. Eine Aktivierung der Caspase-3 bei Staurosporin-Behandlung konnte außer in N2a in COS-7 und HeLa-Zellen beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 Proteolytische Spaltung von Ataxin3 *in vitro* mit zellulären Lysaten

Da Fragmente von AT3Q71 in unbehandelten N2a-Zellen detektiert werden konnten (Abb.3-5b, 3-25a), ist davon auszugehen, daß auch ohne Caspase-Aktivierung eine oder mehrere AT3-schneidende Proteasen aktiv waren bzw. unter diesen Bedingungen exprimiert wurden. Um Hinweise auf diese Proteasen zu erhalten, wurden *in vitro*-Experimente mit postnukleären Überständen durchgeführt, die durch Aufquellen von N2a-Zellen in Saccharose und Zellaufschluß im Homogenisator erhalten wurden. Die Zellkerne wurden abgetrennt, die Membranbestandteile waren jedoch noch enthalten und wurden durch 250mM Saccharose stabilisiert. Somit sollten sich im postnukleären Überstand vorwiegend cytoplasmatische Proteine befinden und Proteasen aus anderen Kompartimenten wie z.B. den Lysosomen sollten weitgehend innerhalb der Membranvesikel separiert bleiben.

Jeweils 100µg N2a-postnukleärer Überstand (frisch hergestellt) wurde mit 50ng PP-geschnittenem GST-AT3Q22 für 1 h bei 30°C inkubiert. In Western Blot Analysen zeigte sich ein 23 kDa-Fragment, welches nur in Kombination von postnukleärem Überstand und humanem AT3Q22 detektiert werden konnte, nicht jedoch bei AT3Q22 allein oder N2a-postnukleärem Überstand allein (Abb.3-28a). Ein Test von verschiedenen Bedingungen zeigte, daß die Zugabe von ATP-regenerierendem System oder das Einstellen eines niedrigen pH-Wertes keinen Einfluß auf die Fragmentierung von AT3 hatten. Die Zugabe von Calcium jedoch führte zu einer deutlich verstärkten Spaltung von AT3 (Abb.3-28b). In allen Experimenten konnte eine 29 kDa-Bande detektiert werden, die auch ohne AT3Q22-Zugabe im N2a-postnukleären Überstand auftrat (Abb.3-28c), was folgern läßt, daß es sich um ein Maus-AT3 Fragment handelte bzw. ein Fragment der homologen Josephin-Domäne. Als His-AT3Q22 zum postnukleären Überstand zugegeben wurde, konnte eine 29 kDa-Bande mit anti-His-Antikörper detektiert werden, was für ein N-terminales Josephin-Fragment spricht (Daten nicht gezeigt). Mindestens zwei weitere Banden (etwa 20 und 34 kDa) traten nur bei Zugabe von humanem AT3Q22 zu N2a-postnukleären Überstand auf (Abb.3-28c).

Während Calcium-Zugabe wurden verschiedene Inhibitoren getestet, wobei sich zeigte, daß der Calpain- und Proteasom-Inhibitor ALLN, Calcium-Chelator EGTA, Cystein- und Serinprotease-Inhibitor Leupeptin, der Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK sowie der Proteasom-Inhibitor MG132 die Entstehung der Calcium-abhängigen 20 und 29 kDa-Banden verhindern

Ergebnisse

konnten (Abb.3-29a und Daten nicht gezeigt). Der Cysteinprotease-Inhibitor E-64 führte zu einer schwachen Inhibition der AT3-Spaltung. Der Aspartylprotease-Inhibitor Pepstatin und der Serinprotease-Inhibitor Aprotinin hatten keinen Effekt auf den Calcium-abhängigen Abbau von AT3. Wieder konnte die Calcium-unabhängige 23 kDa-Bande detektiert werden, die bei keinem der verschiedenen Inhibitoren vollständig verschwand (Abb.3-29a), weshalb eine Aussage über diese unbekannte Protease schwer fällt. Die Auswertung der Inhibitor-Experimente für die Calcium-abhängige Protease deutet auf Calpaine als AT3-schneidende Protease. Calpaine sind cytoplasmatische Cysteinproteasen, die sich von ALLN und Leupeptin, jedoch auch von MG132 (Lee and Goldberg, 1998) und Z-VAD-FMK hemmen lassen (Waterhouse et al., 1998).

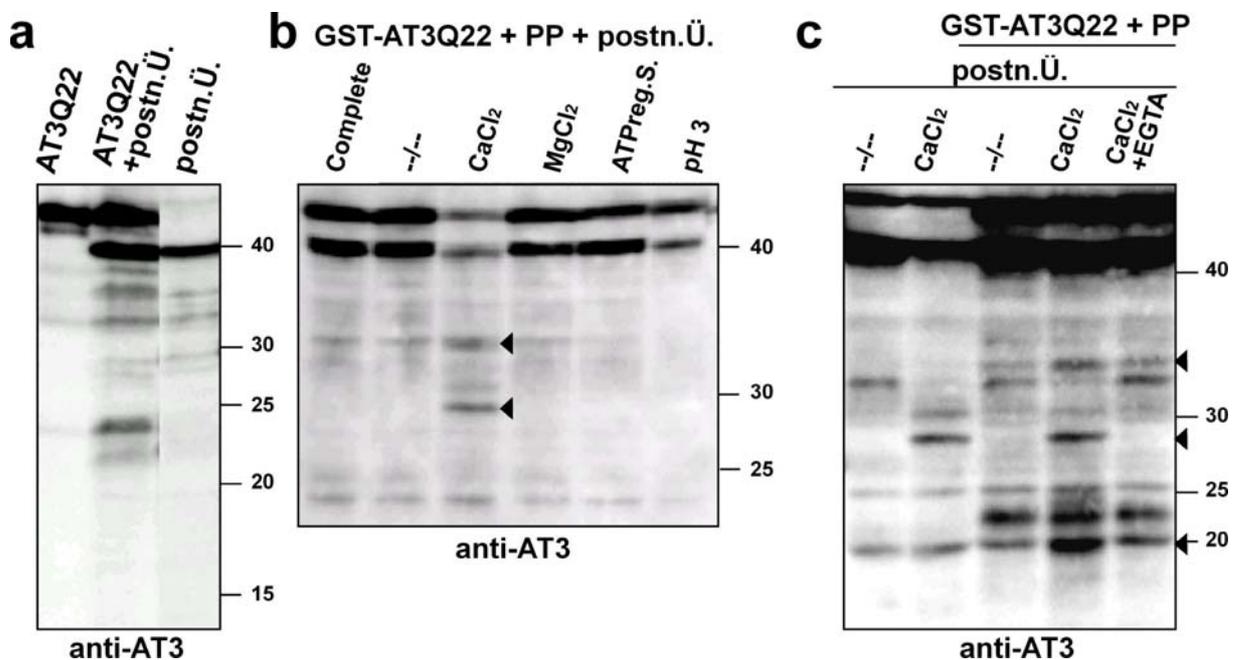


Abbildung 3-28: Proteolytische Spaltung von AT3Q22 mit N2a-postnukleärem Überstand *in vitro*.

a) PP-geschnittenes GST-AT3Q22 (50ng) wurde allein oder mit postnukleärem Überstand (100µg) für 1 h bei 30°C inkubiert. Ebenso postnukleärer Überstand allein. Western Blot Analyse (anti-AT3). b) PP-geschnittenes GST-AT3Q22 wurde mit N2a-postnukleärem Überstand und Protease-Inhibitor-Mischung (Complete), CaCl₂, MgCl₂, ATP-regenerierendem System oder bei einem pH-Wert von 3 für 1 h bei 30°C inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3). c) N2a-postnukleärer Überstand wurde mit und ohne PP-geschnittenem GST-AT3Q22, wenn angegeben mit CaCl₂ und EGTA, inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3). Pfeile markieren die AT3-Fragmente, die durch eine Calcium-abhängige Protease generiert wurden.

Da Calpaine cytoplasmatische Proteasen sind, wurden Fraktionierungen des postnukleären Überstandes vorgenommen und auf deren proteolytische Aktivität untersucht. Dabei geht man davon aus, daß Zellkerne bei 1.000xg, Mitochondrien sowie die Mehrheit der Cytoplasmamembran bei 10.000xg und alle weiteren Membranbestandteile (ER, Golgi, Lysosomen) bei 100.000xg pelletiert werden (Graham and Sandall, 1979). Eine Calcium-

Ergebnisse

abhängige AT3-Spaltung konnte in allen drei Überständen (1.000xg, 10.000xg, 100.000xg) nachgewiesen werden (Abb.3-29b). Dies führt zur Schlußfolgerung, daß es sich um eine cytoplasmatische Protease handelte, was als ein weiterer Hinweis auf Calpaine angesehen werden kann.

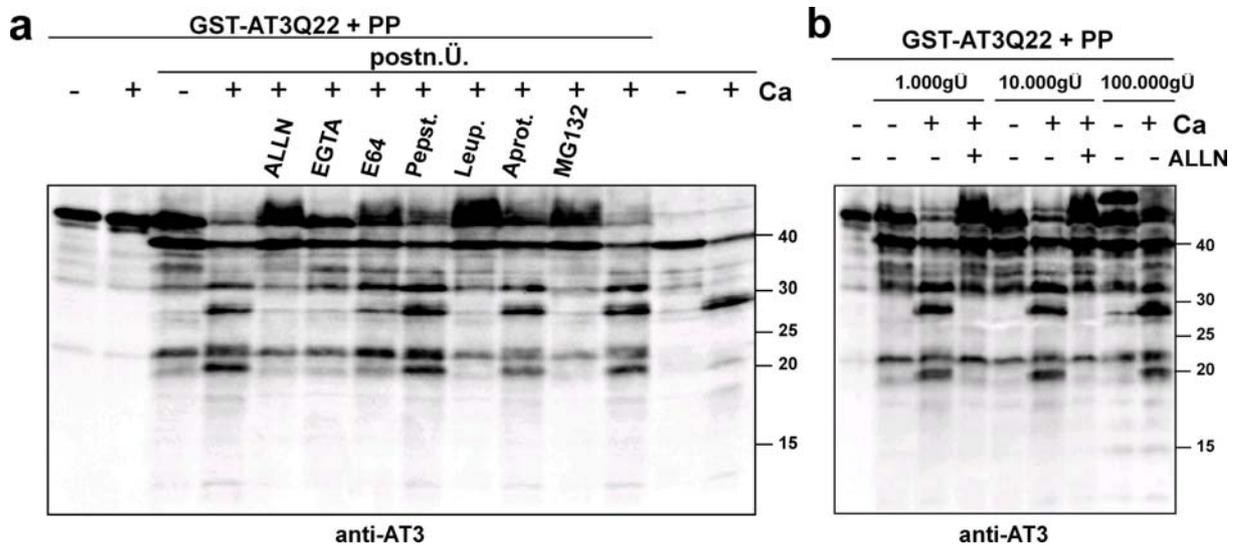


Abbildung 3-29: Calcium-abhängige Spaltung von AT3Q22 in N2a-postnukleärem Überstand *in vitro*.

a) PP-geschnittenes GST-AT3Q22 (50ng) wurde allein oder mit postnukleärem Überstand (100µg) für 1 h bei 30°C inkubiert. Ebenso postnukleärer Überstand allein. Wenn angegeben wurden CaCl₂, der Calcium-Chelator EGTA oder verschiedene Protease-Inhibitoren wie Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin zugegeben. Western Blot Analyse (anti-AT3). b) PP-geschnittenes GST-AT3Q22 wurde allein oder mit postnukleärem Überstand (=1.000xg-Ü), N2a-10.000xg-Überstand oder N2a-100.000xg-Überstand für 1 h, wenn angegeben mit CaCl₂ und ALLN, inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3).

Um die Beteiligung von Caspasen an der AT3-Fragmentierung zu untersuchen, wurden HEK293T-Lysate zur *in vitro*-Caspase-Aktivierung hergestellt (Bartke et al., 2004). Durch Zugabe von Cytochrom C und dATP zum 16.000xg-Überstand konnten Caspasen aktiviert werden, was durch Western Blot Analysen mit anti-Caspase3-Antikörper bestätigt wurde (17 kDa-Fragment, Abb.3-30a). Der generelle Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK konnte die Caspase-Aktivierung unterdrücken (Abb.3-30a). Bei Experimenten mit HEK293T-Lysaten wurde kein gereinigtes GST-AT3Q22 zugegeben, da es sich um humane Zellen handelte, die endogenes AT3 exprimierten. Um die Fragmentierung von endogenem humanem AT3 zu untersuchen, wurde dieselbe Western Blot-Membran mit anti-AT3-Antikörper behandelt. Es konnten drei Fragmente bei 22, 27 und 30 kDa detektiert werden, die bei Zugabe von Z-VAD-FMK nicht auftraten (Abb.3-30a, d). Eine PonceauS-Färbung der Western Blot-Membranen vor der Antikörper-Behandlung ergab kein abweichendes Bandenmuster (außer den zusätzlichen Cytochrom C-Banden; Daten nicht gezeigt), was vermuten läßt, daß nicht alle zellulären Proteine unspezifisch abgebaut wurden. Die Caspase-Inhibitoren Z-DEVD-FMK

Ergebnisse

und Ac-YVAD-CHO unterdrückten die proteolytische Spaltung von AT3 sowie von Procaspase-3 (32 kDa) genauso wie Z-VAD-FMK (Abb.3-30b und Daten nicht gezeigt). MG132 und ALLN, die zusätzlich zu Cytochrom C und dATP zugegeben wurden, hatten keinen Effekt im *in vitro*-Caspase-Aktivierungsassay (Abb.3-30b und Daten nicht gezeigt), was darauf hindeutet, daß tatsächlich Caspasen an der AT3-Spaltung beteiligt waren, und nicht Proteasomen oder Calpaine.

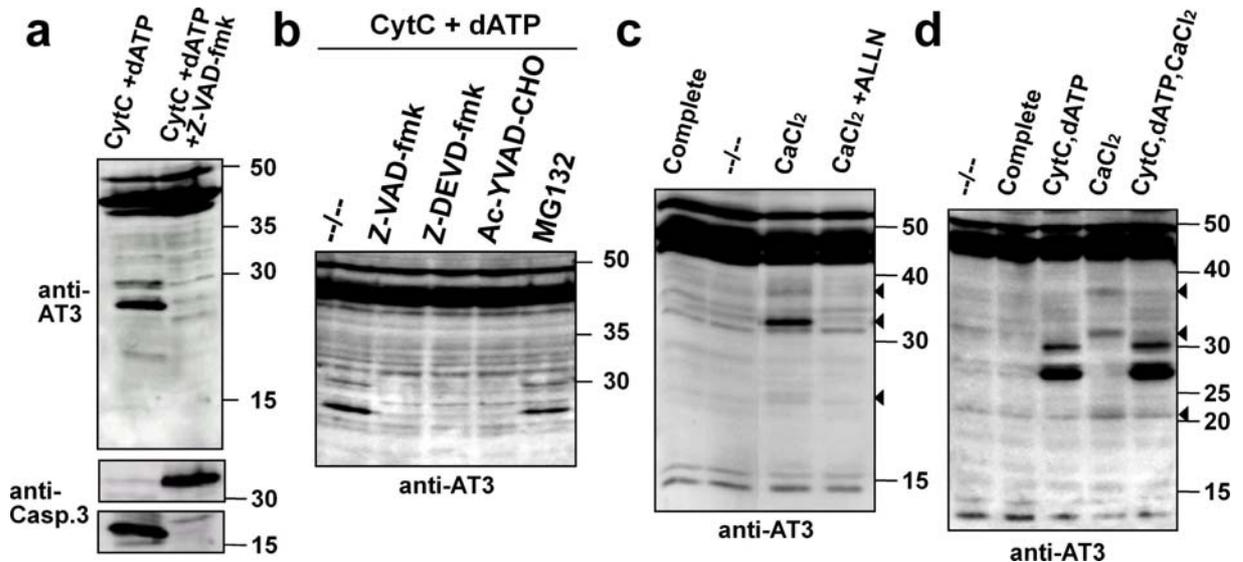


Abbildung 3-30: Spaltung von endogenem, humanem AT3 bei *in vitro*-Caspase-Aktivierung oder Calcium-Zugabe zu HEK293T-Lysaten *in vitro*.

a) HEK293T-Lysat wurde mit Cytochrom C und dATP mit oder ohne Zugabe des Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK für 1 h bei 30°C inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3) und mit derselben Membran (anti-Caspase-3). b) HEK293T-Lysat wurde mit Cytochrom C und dATP und, wenn angegeben, mit den Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK, Z-DEVD-FMK und Ac-YVAD-CHO oder dem Proteasom-Inhibitor MG132 für 1 h bei 30°C inkubiert. Western Blot Analyse (anti-AT3). c) Inkubation von HEK293T-Lysat mit Protease-Inhibitor-Mischung (Complete), CaCl₂ oder ALLN. Western Blot Analyse (anti-AT3). d) Kombinierte Zugabe von Cytochrom C, dATP und CaCl₂ zum HEK293T-Lysat. Western Blot Analyse (anti-AT3). Pfeile markieren die AT3-Fragmente, die bei CaCl₂-Zugabe entstanden.

Eine AT3-Fragmentierung nach Calcium-Zugabe wurde ebenfalls mit HEK293T-Lysaten (16.000xg-Überstand) untersucht. Die Expression von endogenem Calpain I in HEK293T-Zellen wurde bereits experimentell bestätigt (Guttmann et al., 2002). In Western Blot Analysen wurden Calcium-induzierte schwache 38 und 21 kDa-Banden sowie eine deutliche AT3-Bande von etwa 32 kDa detektiert (Abb.3-30 c-d), die bei Zugabe von ALLN, EGTA und Leupeptin nicht beobachtet wurden (Abb.3-30c und Daten nicht gezeigt). Z-VAD-FMK und MG132 hemmten diese Calcium-abhängige Spaltung von AT3 ebenfalls (siehe oben). Pepstatin und Aprotinin konnten die Entstehung der AT3-Fragmente jedoch nicht verhindern (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Inhibitor-Experimente zusätzlich zur Calcium-Abhängigkeit deuten, wie bei den N2a-postnukleären Überständen, auf Calpaine als AT3-

schneidende Proteasen in den HEK293T-Lysaten hin. Eine Spaltung der Procaspase-3 zum aktiven 17 kDa-Fragment fand bei Calcium-Zugabe nicht statt (Daten nicht gezeigt). Durch die Übereinstimmung der Inhibitor-Studien von N2a-postnukleären Überständen (plus gereinigtem AT3Q22) und HEK293T-Lysaten (endogenes, humanes AT3) kann man mit großer Wahrscheinlichkeit von derselben Calcium-abhängigen Protease in humanen und in Maus-Zellen ausgehen.

Da in HEK293T-Lysaten bei Calcium-Zugabe andere AT3-Fragmente entstanden als durch die *in vitro*-Caspase-Aktivierung (Abb.3-30d), kann man schlußfolgern, daß humanes endogenes AT3 *in vitro* sowohl von Caspasen als auch von den postulierten Calpainen geschnitten werden kann, und daß es sich um unterschiedliche Schnittstellen handeln muß.

3.6.4 Auswirkungen von Ionomycin auf die Ataxin3-Spaltung in Säugetierzellen

Da die *in vitro*-Experimente mit N2a-postnukleärem Überstand und HEK293T-Lysaten Hinweise auf Calpaine als AT3-schneidende Proteasen geliefert hatten (Abb.3-28, 3-29, 3-30), sollte nun die Calpain-abhängige Fragmentierung in Zellkultur untersucht werden. Erste Experimente wurden mit Thapsigargin durchgeführt, welches ein Inhibitor der ER-Ca²⁺-ATPase ist und ER-Streß sowie eine erhöhte cytoplasmatische Ca²⁺-Konzentration induziert. Eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Cytoplasma sollte in einer Aktivierung von Calpainen resultieren. Mit verschiedenen Thapsigargin-Konzentrationen (10nM – 10µM) im Kulturmedium und unterschiedlichen Inkubationszeiten (1 – 24 h) wurde in Western Blot Analysen kein Effekt auf die AT3-Fragmentierung (AT3Q22 oder AT3Q71) festgestellt. Auch die Kombination von Thapsigargin mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 oder dem lysosomalen Inhibitor Ammoniumchlorid, welche AT3-Fragmente in den Zellen stabilisieren sollten, brachte keinen Effekt. Zusätzlich zu den N2a-Zellen wurden NIH-3T3, HEK293T, HeLa, COS-7 sowie CHO E36-Zellen untersucht, wobei kein Einfluß von Thapsigargin auf die Fragmentierung von endogenem AT3 festgestellt wurde (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Experimenten wurde das Polyether-Antibiotikum Ionomycin aus *Streptomyces globatus* eingesetzt. Ionomycin extrahiert divalente Kationen aus einer wäßrigen Phase hinein in eine andere (über eine organische Phase hinweg). Bei einem pH von 7 – 9,5 bindet Ionomycin Ca²⁺ wesentlich effektiver als Mg²⁺ (Liu and Hermann, 1978). Somit wirkt Ionomycin als Ionophor (*ion carrier*) und transportiert bei einer erhöhten Ca²⁺-Konzentration im Medium Ca²⁺-Ionen über die Zellmembran in das Cytoplasma der Zelle hinein. Dies sollte genauso wie Thapsigargin zu einer Aktivierung von Calpainen führen.

Ergebnisse

In Western Blot Analysen wurde bei humanen Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) eine Fragmentierung des endogenen AT3 nach einer Inkubation der Zellen mit Ionomycin und CaCl_2 festgestellt (Abb.3-31 a-b). SH-SY5Y-Zellen, die mit AT3Q71 transfiziert worden waren, zeigten dasselbe (endogene) sowie ein weiteres Ionomycin-induziertes Fragment (wahrscheinlich von AT3Q71 abstammend), das mit zunehmender Ionomycin-Konzentration verstärkt wurde (Abb.3-31 a-b). In N2a-Zellen konnte ebenfalls eine Ionomycin-induzierte Fragmentierung festgestellt werden (Abb.3-34a).

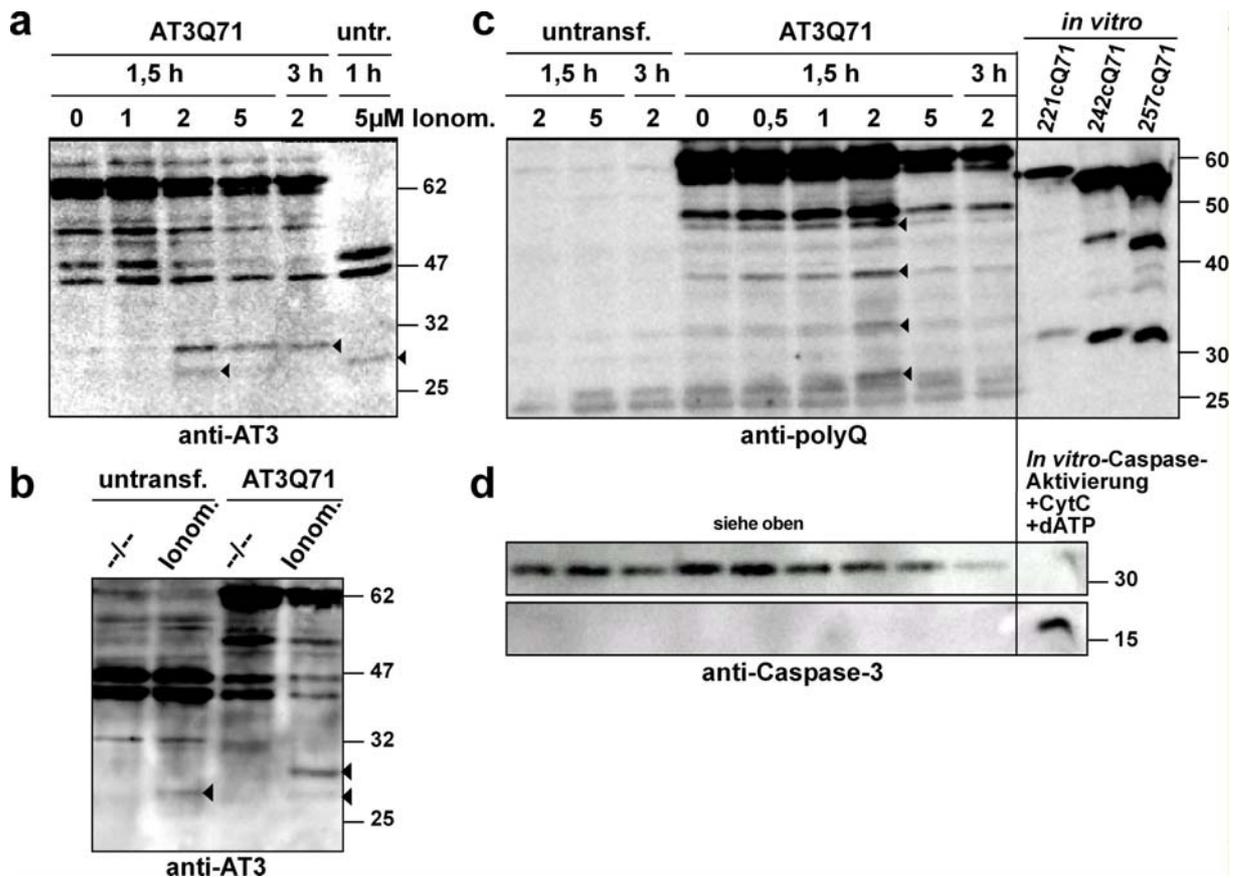


Abbildung 3-31: Der Calcium-Ionophor Ionomycin induziert Spaltung von endogenem AT3 und AT3Q71 in SH-SY5Y- und HEK293T-Zellen.

a) Untransfizierte oder mit AT3Q71-transfizierte SH-SY5Y-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 0-5 μM Ionomycin in OptiMEM und 2mM CaCl_2 (Yadavalli et al., 2004) für 1-3 h kultiviert. Western Blot Analyse (anti-AT3). Pfeile markieren die entstandenen AT3-Fragmente. b) SH-SY5Y-Zellen, 2 μM Ionomycin für 1,5 h (sonst wie in a). c) Untransfizierte oder mit AT3Q71-transfizierte HEK293T-Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 0-5 μM Ionomycin für 1,5-3 h kultiviert. Zusätzlich zu den Zelllysaten wurden mit PP-inkubierte GST-AT3-Proteine (ungeschnittene GST-Fusionen sowie freie AT3-Monomere) in die Western Blot Analyse (anti-polyQ) eingesetzt. Pfeile markieren die entstandenen polyQ-Fragmente. d) Zelllysate aus c) und HEK293T-*in vitro*-Caspase-Aktivierung (mit Cytochrom C und dATP) wurden in Western Blot Analyse (anti-Caspase-3) eingesetzt.

In Western Blot Analysen von AT3Q71-exprimierenden HEK293T-Zellen wurden Ionomycin-induzierte polyQ-Fragmente detektiert, die in Lysaten von untransfizierten Ionomycin-behandelten Zellen nicht vorkamen und demnach von AT3Q71 stammen müssen

Ergebnisse

(Abb.3-31c). Einige dieser Fragmente liefen in der SDS-PAGE bei einer Molekülmasse, die der des 257cQ71-Proteins entsprach bzw. kleiner war (Abb.3-31c). Es ist daher davon auszugehen, daß die durch Ionomycin-Behandlung generierten Fragmente aggregationskompetent waren. Western Blot Analysen mit anti-Caspase3-Antikörper zeigten, daß Caspasen in HEK293T-Zellen bei Ionomycin-Behandlung nicht aktiviert wurden, im Gegensatz zur Positivkontrolle der *in vitro*-Caspase-Aktivierung mit Cytochrom C und dATP (Abb.3-31d, siehe Abb.3-30a). In SH-SY5Y-Zellen wurde ebenfalls keine Caspase-Aktivierung bei Ionomycin-Behandlung detektiert (Daten nicht gezeigt).

Da 2µM Ionomycin bei einer Behandlung von mehr als 3 h toxisch wirkte, wurden die Zellen mit geringeren Ionomycin-Konzentrationen (0,1-1µM) für längere Zeiträume (-24 h) in OptiMEM + 2mM CaCl₂ kultiviert. Ab 24 h wirkte jedoch bereits die alleinige Kultivierung in OptiMEM toxisch auf die Zellen, da die im Serum vorhandenen Wachstumsfaktoren fehlten. In Filtertests wurde kein Effekt dieser Ionomycin-Behandlungen auf die Aggregation von AT3Q71 detektiert (Daten nicht gezeigt).

3.6.5 Proteolytische Spaltung von Ataxin3 *in vitro* mit Calpain II

Da die *in vitro*-Experimente mit N2a-postnukleärem Überstand und HEK293T-Lysaten sowie die Zellkultur-Experimente mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin Hinweise auf Calpain als die gesuchte AT3-schneidende Protease ergeben hatten (Abb.3-28 bis 3-31), sollte nun die Spaltung von gereinigtem AT3 mit gereinigtem Calpain *in vitro* untersucht werden. Rekombinantes Ratten-Calpain II (Calbiochem) wurde in verschiedenen Konzentrationen mit AT3Q22 inkubiert. Western Blot Analysen zeigten, daß mit zunehmender Calpain II-Menge die Volllängen-AT3-Bande abnahm und parallel dazu mehrere Fragmentbanden erschienen, wobei ein 25 kDa-Fragment relativ stabil erschien (Abb.3-32a).

Calpain II-Ansätze mit His-AT3Q22 bzw. GST-AT3Q22 (PP-geschnitten oder ungeschnitten) wurden nach SDS-PAGE auf PVDF-Membranen transferiert und diese mit Coomassie gefärbt (Abb.3-32b). Entstandene Fragmentbanden in der Größe von 13 bis 38 kDa wurden ausgeschnitten und N-terminal ansequenziert, wobei 11 verschiedene Anfangssequenzen identifiziert werden konnten (Abb.3-32c). Mehrere Calpain II-Schnittstellen konnten wiederholt im GST-AT3Q22 und im His-AT3Q22 gefunden werden (N-Termini EDYR, QQPSG, QPSG und SSRNI jeweils 3x identifiziert). Das relativ stabile 25 kDa-Fragment wurde in 4 verschiedenen Ansätzen als N-terminales AT3-Fragment identifiziert, was wie in der limitierten Proteolyse mit Subtilisin und Proteinase K auf einen Verdau des AT3-C-

Ergebnisse

Terminus hindeutet (Abb.3-1b). Das Fragment mit der N-terminalen Sequenz M(257)QGSS, das exakt dem bisher verwendeten, kürzesten Fragment 257cQn entspricht, wurde einmal detektiert. Das Fragment mit der N-terminalen Sequenz S(260)SRNI, welches 3 Aminosäuren kürzer ist, wurde dreimal identifiziert, und sollte bei Vorhandensein eines pathologischen polyQ-Bereichs aggregieren. Die kombinierte Spaltung der Schnittstellen S(260)SRNI und R(318)DLS resultiert in einem Fragment, das außer dem polyQ-Bereich nur aus 32 weiteren Aminosäuren besteht und stark aggregieren sollte. Somit ist anzunehmen, daß Calpain II durch Spaltung des pathologischen Volllängen-AT3 aggregationskompetente Fragmente generieren kann.

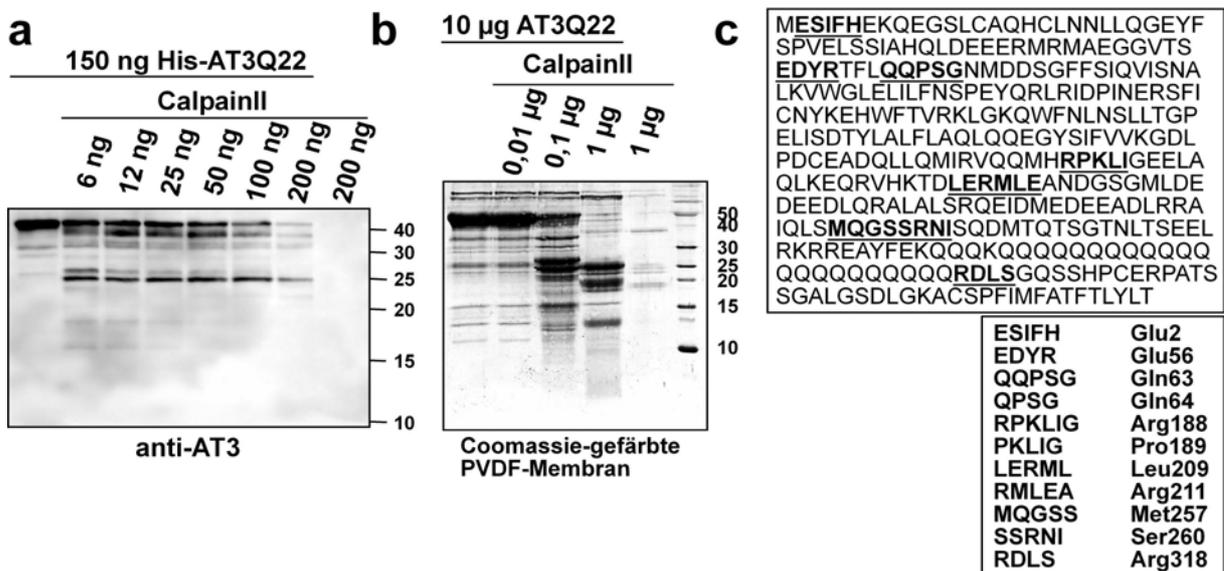


Abbildung 3-32: Spaltung von gereinigtem AT3 mit gereinigtem Calpain II *in vitro*.

a) Inkubation von His-AT3Q22 alleine oder mit verschiedenen Calpain II-Mengen und CaCl₂ für 30 min bei 22°C. Ebenso alleinige Inkubation von Calpain II. Western Blot Analyse (anti-AT3). b) His-AT3Q22 wurde alleine oder mit verschiedenen Calpain II-Mengen inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert (Coomassie-Färbung). c) Die in b) gezeigten AT3-Fragment-Banden sowie die weiterer Experimente (GST-AT3Q22, mit oder ohne PP, plus Calpain II) wurden aus der Membran ausgeschnitten und deren Aminotermini mittels Sequenzierung identifiziert. Dargestellt ist die AT3-Sequenz, in der die Anfangssequenzen der identifizierten Fragmente hervorgehoben sind. Rechts sind die Anfangssequenzen der Fragmente sowie deren N-terminale Aminosäure aufgelistet.

Um die Spaltung von pathologischem AT3 zu überprüfen, wurde AT3Q71 mit Calpain II inkubiert. Western Blot Analysen zeigten annähernd keine polyQ-enthaltenden Fragmente, stattdessen aber Aggregate in den Taschen des Sammelgels, die bei alleiniger Inkubation von AT3Q71 bzw. Calpain II nicht auftraten (Abb.3-33a). Die Analyse der Aggregation mittels Filtertest (anti-polyQ) zeigte jedoch keine verstärkte Fibrillisation des AT3Q71, was daran liegen könnte, daß keine geeigneten Bedingungen gefunden wurden, um einerseits eine

Ergebnisse

Spaltung in genügend kleine Fragmente (260cQ71) hervorzurufen, andererseits aber AT3 nicht vollständig abzubauen.

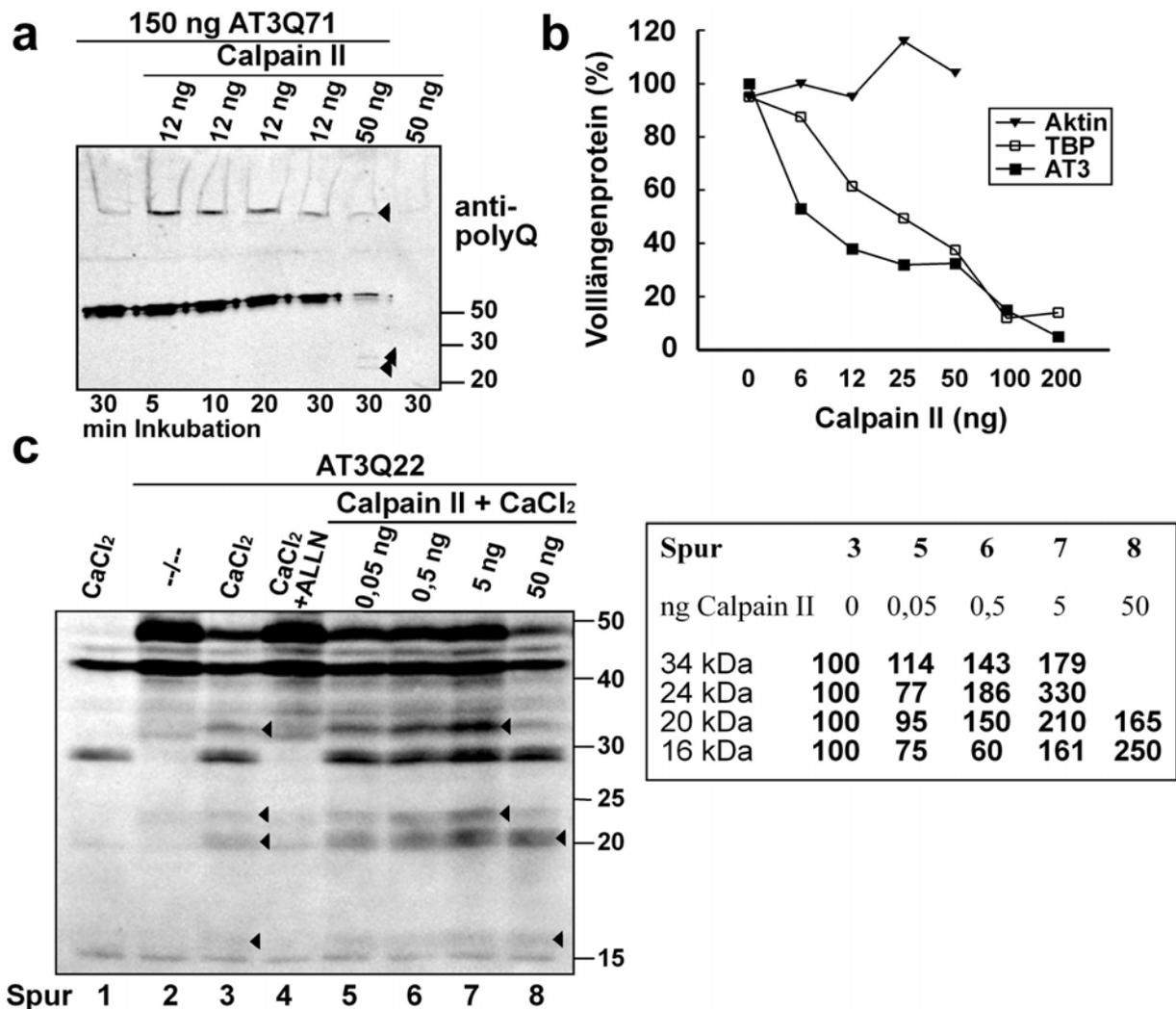


Abbildung 3-33: Spaltung von AT3 mit gereinigtem Calpain II *in vitro*.

a) Inkubation von PP-geschnittenem GST-AT3Q71 alleine oder mit 12-50ng Calpain II für 5-30 min bei 22°C. Ebenso alleinige Inkubation von Calpain II. Western Blot Analyse (anti-polyQ). Pfeile markieren Aggregate in den Taschen des Sammelgels und Fragmentbanden im Trenngel. b) His-AT3Q22, TBP oder Aktin (150ng) wurden alleine oder mit verschiedenen Calpain II-Mengen für 30 min bei 22°C inkubiert. Mittels Western Blot Analysen (anti-AT3, anti-TBP, anti-Aktin) wurden die Mengen der ungeschnittenen Volllängenproteine quantifiziert. c) Postnukleärer Überstand (100µg) wurde allein (Spur 1) oder mit PP-geschnittenem GST-AT3Q22 (50ng; Spuren 2-8) für 1 h bei 30°C inkubiert. Wenn angegeben, wurden CaCl₂, der Calpain-Inhibitor ALLN oder verschiedene Calpain II-Mengen zugegeben. Western Blot Analyse (anti-AT3). Pfeile im Blot markieren die AT3-Fragmentbanden, welche in den Spuren 3, 5, 6, 7 und 8 quantifiziert wurden. Diese Quantifizierung ist rechts im Kasten dargestellt, wobei die Bandenintensitäten der Fragmentbanden in Spur 3 (postn.Ü. + AT3Q22 + CaCl₂) jeweils als 100% gesetzt wurden.

Um zu überprüfen, ob Calpain II beliebige andere Proteine ebenfalls schneidet und somit als Protease unspezifisch agiert, wurden gereinigtes Aktin, His-TBP und His-AT3Q22 in parallelen Ansätzen mit verschiedenen Calpain II-Konzentrationen inkubiert. Die Menge des ungeschnittenen Volllängenproteins wurde mittels Western Blot Analysen bestimmt.

Ergebnisse

Interessanterweise wurde Aktin nicht von Calpain II geschnitten (Abb.3-33b), obwohl es als Substrat für Calpaine vorgeschlagen worden war (Villa et al., 1998). TBP jedoch wurde fast genauso stark abgebaut wie AT3 (Abb.3-33b). Bislang wurde TBP in der Literatur nicht als Calpain-Substrat beschrieben. Da TBP wie AT3 ein polyQ-Protein ist (siehe Anhang; Wildtyp-Protein = 38Q) ist die Frage, ob Calpain II bevorzugt polyQ-Proteine spaltet. Da es Hinweise auf die Erkennung der Substrate durch Calpaine anhand von strukturellen Merkmalen gibt (siehe 1.3.4), könnte die Konformationen von TBP dessen Spaltung im Gegensatz zu der von Aktin begünstigt haben.

Da in N2a-postnukleären Überständen eine Calcium-abhängige Spaltung des AT3Q22 gefunden wurde (Abb.3-28 und 3-29), sollte nun getestet werden, ob Calpain II-Zugabe zu diesen Ansätzen die erwarteten Fragmentbanden verstärkt. Dies würde dafür sprechen, daß es sich um dieselbe Protease handelt oder zumindest um eine Protease, die dieselben Schnittstellen spaltet. Falls Calpain II-Zugabe zu zusätzlichen, anderen Fragmentbanden führen würde, wäre dies ein Hinweis darauf, daß es sich bei der Calcium-abhängigen Protease im postnukleären Überstand nicht um Calpain II handelt.

Calcium-Zugabe zu postnukleärem Überstand und PP-geschnittenem GST-AT3Q22 resultierte in einer deutlichen Calcium-abhängigen Fragment-Bande bei 29 kDa, sowie schwächeren Banden bei etwa 16, 20, 24 und 34 kDa (Abb.3-33c). Die Intensität dieser 16, 20, 24 und 34 kDa-Banden konnten durch steigende Mengen von Calpain II verstärkt werden (Abb.3-33c rechts). Als die Signale dieser vier Fragment-Banden in der Spur ohne Calpain II-Zugabe (Spur 3 in Abb.3-33c) jeweils auf 100% gesetzt wurden, konnte man bei Zugabe von 5-50 ng Calpain II eine Verstärkung dieser 16, 20, 24 bzw. 34 kDa-Banden auf 179, 330, 210 bzw. 250% detektieren. Die Zugabe einer sehr geringen Calpain II-Menge (0,05 ng) hatte keinen Effekt auf die Signalintensität dieser Fragment-Banden (114, 77, 95 bzw. 75% im Vergleich zur Spur 3 in Abb.3-33c). Dieselbe Western Blot-Membran wurde mittels *Stripping* vom anti-AT3-Antikörper entfernt und mit anti-Aktin-Antikörper behandelt. Das Aktin-Volllängenprotein wurde detektiert, jedoch keine Aktin-Fragmente (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung 3-33c gezeigte Western Blot Analyse deutet demnach auf ein Calpain als die verantwortliche AT3-schneidende Protease in den *in vitro*-Experimenten mit Zelllysaten hin.

3.6.6 Inhibition der Ataxin3-Spaltung und -Aggregation durch Calpeptin und Calpastatin in Säugetierzellen

Zusätzlich zur Behandlung von Zellen mit Ionomycin, welches zu einer Calpain-Aktivierung führen sollte (siehe 3.6.4), wurden Experimente mit Calpeptin, einem zellpermeablen Calpain-Inhibitor durchgeführt. Es ist bekannt, daß Calpeptin die Calpaine I und II sowie die Protease Papain inaktiviert. Zunächst wurde getestet, ob Calpeptin den Effekt von Ionomycin aufheben kann. Dazu wurden AT3Q71-exprimierende N2a-Zellen für 30 min mit Calpeptin präinkubiert, worauf die Zugabe von Ionomycin für 1,5 h folgte. In Western Blot Analysen wurde der Abbau von AT3Q71 bzw. das Auftreten von Fragmenten untersucht.

Abbildung 3-34a zeigt, daß die Menge des Volllängenproteins bei Ionomycin-Behandlung abnahm, jedoch durch steigende Konzentrationen von Calpeptin wieder auf das Ursprungsniveau gebracht werden konnte. Außerdem wurden bei Ionomycin-Zugabe AT3-Fragmente detektiert, deren Auftreten durch Calpeptin-Zugabe gehemmt werden konnte. Die gezeigten Daten weisen also darauf hin, daß Calpeptin die durch Ionomycin induzierte Protease(n) effizient inhibieren kann (Abb.3-34a).

Da Ionomycin (2 μ M) bei einer mehrstündigen Behandlung toxisch wirkte, wurde anstatt einer Calpain-Aktivierung eine Calpain-Hemmung über längere Perioden (-60 h) getestet. N2a- oder HEK293T-Zellen, die mit AT3Q71 transfiziert worden waren, wurden mit dem Calpain-Inhibitor Calpeptin (50 μ M) kultiviert. Western Blot Analysen zeigten in unbehandelten AT3Q71-exprimierenden HEK293T-Zellen polyQ-Fragmente, die in Calpeptin-behandelten Zellen in wesentlich geringerer Menge vorkamen (Abb.3-34b). Ein verändertes Expressionsniveau von AT3Q71 oder eine Caspase-3-Aktivierung wurden in Calpeptin-behandelten Zellen (50 μ M, -60 h) nicht detektiert (Abb.3-34b und Daten nicht gezeigt). Zur Analyse der SDS-resistenten Aggregation wurden Filtertests von AT3Q71-exprimierenden HEK293T- oder N2a-Zellen durchgeführt, in denen bei Calpeptin-Behandlung eine Reduktion der Aggregation auf ~40% festgestellt wurde (Abb.3-34c). Die Reduktion der proteolytischen AT3-Spaltung entspricht demnach einer Inhibition der SDS-resistenten Aggregation in Säugetierzellen. Zusammengefaßt deuten die dargestellten Experimente darauf hin, daß AT3Q71 von Calpainen, welche endogene Aktivität zeigen und somit nicht induziert werden müssen, gespalten wird und die entstehenden polyQ-Fragmente den Aggregationsprozeß initiieren.

Um die Kultivierung von Zellen mit Substanzen wie Calpeptin im Medium zu vermeiden, wurde AT3 mit dem Protein Calpastatin, welches ein endogener Calpain-Inhibitor ist, koexprimiert (siehe 1.3.4). Ein Säugetier-Expressionsvektor mit humaner Calpastatin-*cDNA*

Ergebnisse

wurde mir freundlicherweise von Prof. Glenn C. Telling zur Verfügung gestellt (Yadavalli et al., 2004), der ihn seinerseits von Prof. Masatoshi Maki erhalten hatte. Dieses Plasmid wurde bereits zur Transfektion von SMB (*Scrapie infected mouse brain*)-Zellen verwendet, und es konnte eine Calpastatin-Expression mittels Western Blot Analysen (anti-Calpastatin) gezeigt werden (Yadavalli et al., 2004).

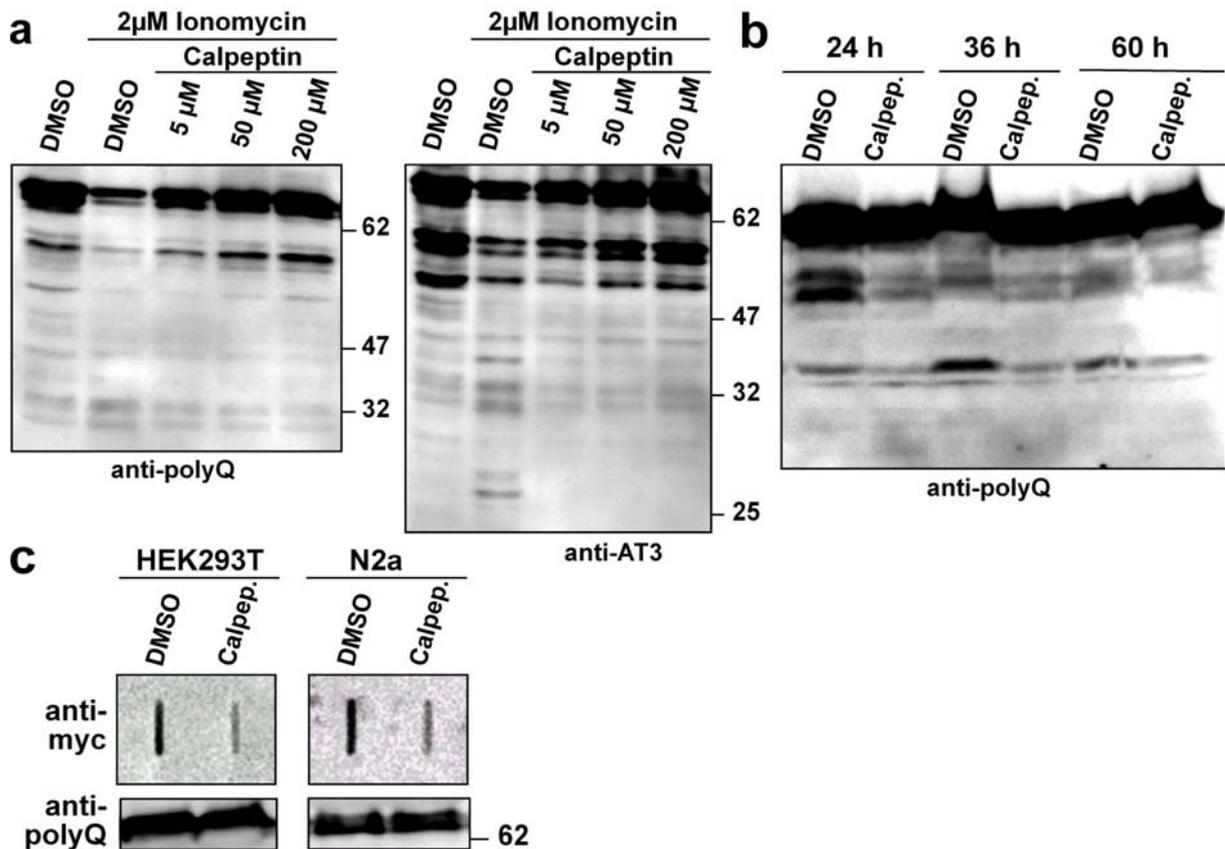


Abbildung 3-34: Inhibition der AT3Q71-Spaltung und -Aggregation durch Calpeptin in Säugerzellen.

a) N2a-Zellen wurden mit pcDNA3.1-AT3Q71 transient transfiziert und 16 h später für 30 min mit Calpeptin oder DMSO (in OptiMEM und 2mM CaCl₂) präinkubiert, worauf die Zugabe von Ionomycin oder DMSO für 1,5 h folgte. Links: Western Blot Analyse (anti-polyQ). Rechts: Western Blot Analyse (anti-AT3). b) HEK293T-Zellen wurden 3 h nach AT3Q71-Transfektion mit 50 μM Calpeptin bzw. DMSO im Medium für 24, 36 oder 60 h kultiviert, wobei alle 24 h das Medium inklusive Calpeptin erneuert wurde. Western Blot Analyse (anti-polyQ). c) AT3Q71-exprimierende HEK293T- bzw. N2a-Zellen wurden (wie in b) für 60 bzw. 48 h mit 50 μM Calpeptin kultiviert. Detektion der SDS-resistenten Aggregation im Filtertest (anti-myc). Western Blot Analysen (anti-polyQ) zeigen gleiche AT3Q71-Expression und dienen als Auftragskontrolle.

In einer anderen Studie wurde beobachtet, daß die Transfektion von HEK293T-Zellen mit einem Kaninchen-Calpastatin-*cDNA*-Konstrukt in verringerter Calpain-Aktivität (Spaltung des fluorogenen Substrats Suc-LLVY-AMC) resultiert (Guttmann et al., 2002). Mittels Western Blot Analysen wurde gezeigt, daß HEK293T-Zellen endogenes Calpain I (Guttmann et al., 2002) und daß N2a-Zellen endogenes Calpain I und II exprimieren (Yadavalli et al., 2004). Daher wurde in den folgenden Experimenten davon ausgegangen, daß die Transfektion

Ergebnisse

von N2a und HEK293T-Zellen mit dem pRK5-Calpastatin-Konstrukt in einer Calpastatin-Expression und Calpain-Hemmung resultiert.

N2a- bzw. HEK293T-Zellen wurden mit den Plasmiden pcDNA3.1-AT3Q71 und pRK5-Calpastatin bzw. pcDNA3.1-*lacZ* (β -Galaktosidase) transfiziert und für 24-72 h kultiviert. In Western Blot Analysen wurde die Fragmentierung von AT3Q71 untersucht. Bei der Positivkontrolle (β -Galaktosidase) zeigte sich während der Kultivierung von 72 h eine Akkumulation von polyQ-enthaltenden Fragmenten, die teilweise kleiner als das zum Größenvergleich aufgetragene gereinigte 257cQ71 (GST-257cQ71 + PP) waren. Im Gegensatz dazu wurden bei Calpastatin-Expression keine AT3-Fragmente detektiert (Abb.3-35 a-b). Der Vergleich mit AT3Q71-exprimierenden Zellen, die mit 50 μ M Calpeptin bzw. DMSO inkubiert worden waren (siehe Abb.3-34b), macht deutlich, daß die Inhibition der AT3-Spaltung mit dem Protein Calpastatin effizienter war als mit der Chemikalie Calpeptin (Abb.3-35a). Der Einfluß der Calpastatin-Expression auf die SDS-resistente Aggregation von AT3Q71 wurde mit Hilfe von Filtertests analysiert, wobei im Vergleich zur β -Galaktosidase-Kontrolle eine Reduktion auf 0-20 % detektiert wurde (Abb.3-35b). Die Expression des Calpain-Inhibitor-Proteins Calpastatin resultierte also in einer deutlichen Inhibition der AT3-Fragmentierung sowie einer starken Hemmung der SDS-resistenten Aggregation in Säugerzellen.

Obwohl die gereinigten Proteine AT3Q71, 162cQ71 und 186cQ71 *in vitro* (GST-Fusionen + PP) gleichermaßen keine Aggregation im Filtertest zeigen (Abb.3-2 b-c), aggregieren die Fragmente 162cQ71 und 186cQ71 in Zellen wesentlich stärker als das Volllängenprotein AT3Q71 (Abb.3-5a und Daten nicht gezeigt). Da außerdem polyQ-enthaltende Fragmente von 186cQ71 in N2a-Lysaten detektiert wurden (Abb.3-5b), kann eine zunehmende Verkürzung der 162cQ71- und 186cQ71-Fragmente durch proteolytische Spaltung und anschließende Aggregation von Fragmenten, die annähernd so groß wie 257cQ71 sind, postuliert werden. Wenn man von einer Spaltung dieser Fragmente durch Calpaine ausgeht, erwartet man eine Inhibition der Aggregation bei Expression des Calpain-Inhibitors Calpastatin. Im Filtertest wurde bei Calpastatin-Expression eine Reduktion der SDS-resistenten Aggregation von 162cQ71 und 186cQ71 auf ~40% beobachtet (Abb.3-35 c-d). Dies deutet darauf hin, daß die beiden exprimierten AT3-Fragmente tatsächlich durch Calpaine proteolytisch verkürzt werden und erst dadurch die Aggregationskompetenz erhalten. Zusammenfassend kann man feststellen, daß eine Inhibition von Calpainen in N2a-

Ergebnisse

Neuroblastomazellen sowie in humanen HEK293T-Zellen in einer Reduktion der Aggregation von AT3 mit pathologischem polyQ-Bereich resultiert.

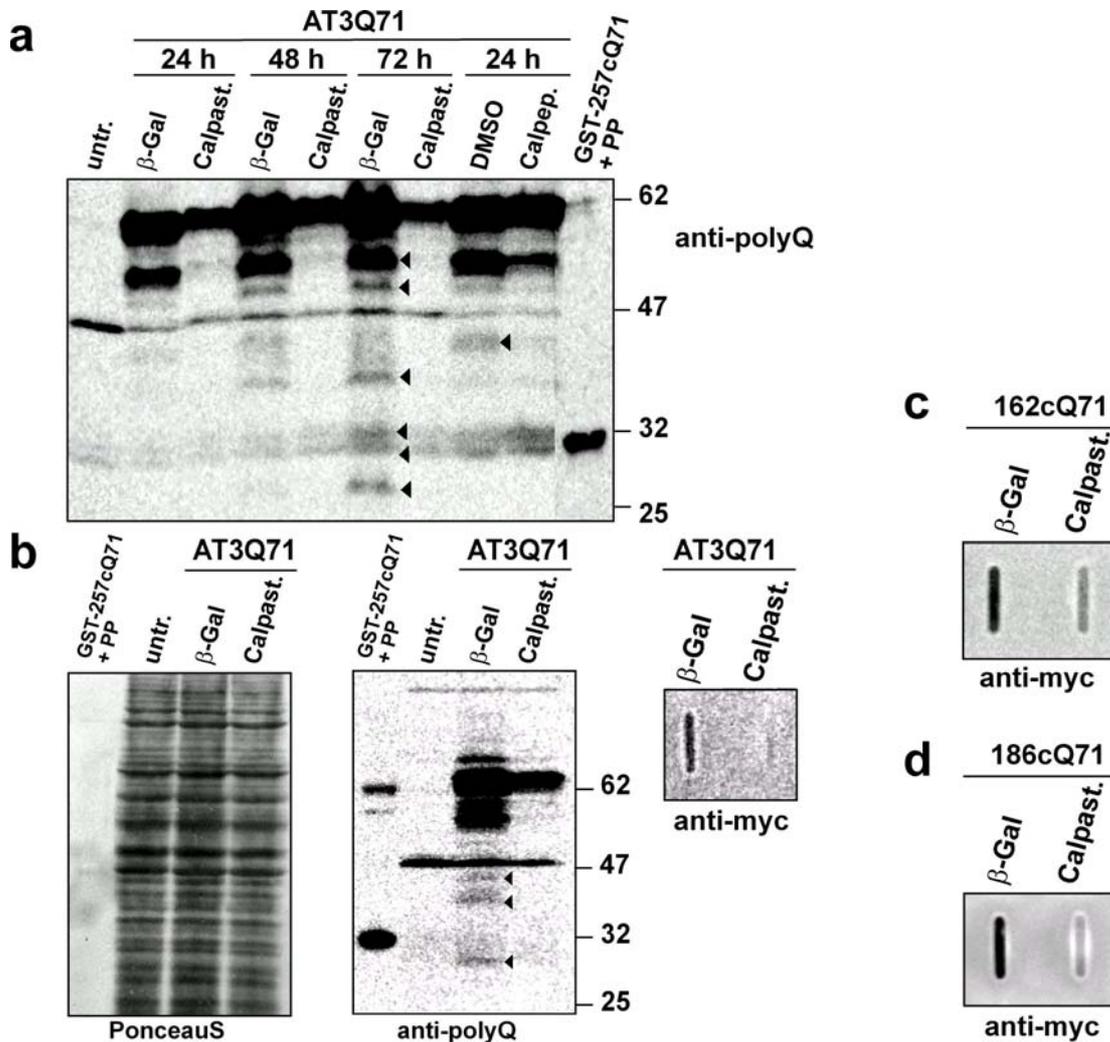


Abbildung 3-35: Inhibition der Spaltung und Aggregation von AT3Q71, 162cQ71 und 186cQ71 durch die Expression von Calpastatin in Säugerzellen.

a) HEK293T-Zellen wurden mit pcDNA3.1-AT3Q71 und pRK5-Calpastatin bzw. pcDNA3.1-*lacZ* (β -Galaktosidase) transfiziert und für 24-72 h kultiviert. AT3Q71-transfizierte HEK293T-Zellen wurden für 24 h mit 50 μ M Calpeptin bzw. DMSO im Medium inkubiert. Western Blot Analyse (anti-polyQ) mit Lysaten von untransfizierten HEK293T-Zellen (Spur 1) sowie gereinigtem, PP-geschnittenem GST-257cQ71 (Spur 10). Pfeile markieren die AT3-Fragmente, die bei Calpastatin-Expression bzw. Calpeptin-Inkubation nicht auftraten. b) HEK293T-Zellen wurden (wie in a) transfiziert und für 72 h kultiviert. Die Membran der Western Blot Analyse wurde mit PonceauS gefärbt, bevor sie mit anti-polyQ-Antikörper inkubiert wurde (links). Analyse der SDS-resistenten Aggregation im Filtertest (anti-myc; rechts). c) Expression von 162cQ71 und Calpastatin bzw. β -Galaktosidase für 60 h in N2a-Zellen. Filtertest (anti-myc). d) Expression von 186cQ71 und Calpastatin bzw. β -Galaktosidase für 72 h in N2a-Zellen. Filtertest (anti-myc).

4. Diskussion

4.1 Aggregationseigenschaften des Ataxin3-Proteins

4.1.1 Gereinigte GST-Ataxin3-Fusionsproteine und die Ataxin3-Expression in Neuroblastomazellen sind als *in vitro*- und *in vivo*-Aggregationsmodelle geeignet

Aufbauend auf den Ergebnissen von Wanker und Kollegen (Scherzinger et al., 1997) wurde in der vorliegenden Studie ein *in vitro*-Aggregationsmodell für das polyQ-Protein Ataxin3 (AT3) etabliert. Nach Reinigung von rekombinanten GST-AT3-Fusionsproteinen wurde die AT3-Aggregation durch Abspaltung des GST-Fusionspartners untersucht. Zur Analyse der *in vivo*-Aggregation von AT3 wurden Neuroblastomazellen (N2a) herangezogen, in denen die jeweiligen AT3-Proteine exprimiert wurden. Während *in vitro* sowie *in vivo* AT3-Fragmente mit einem Polyglutaminbereich von 22Q und 43Q keine SDS-resistenten Aggregate bilden, zeigen AT3-Fragmente mit 71Q SDS-resistente Aggregation (Abb.3-2 a-b, 3-5a). Daher kann festgestellt werden, daß gereinigte GST-AT3-Fusionsproteine und die AT3-Expression in Neuroblastomazellen als Modelle für das Aggregationsverhalten von Ataxin3 im Gehirn geeignet sind, da 43Q im AT3-Protein zu keiner Bildung von Proteinablagerungen und zu keiner Erkrankung, 71Q im AT3-Protein jedoch zur Spinocerebellären Ataxie 3 (SCA3) führt (siehe Tabelle 1-1 in Kapitel 1.1.1). Eine Übereinstimmung des Schwellenwerts der *in vitro*-Aggregation (37-39Q) mit dem der Pathogenese (36-41Q) wurde bereits für die Huntington-Erkrankung (HD) und das Huntingtin (Htt)-Protein gezeigt, was auf eine Beziehung zwischen Aggregation und Erkrankung hindeutet (Scherzinger et al., 1999).

Die Eigenschaften der *in vitro* gebildeten AT3-Aggregate entsprechen denen anderer polyQ-Proteine und darüberhinaus denen anderer amyloider bzw. amyloid-ähnlicher Aggregate (siehe 1.1.2). Wie bereits für andere polyQ-Proteine publiziert wurde, sind die Aggregate von AT3-Fragmenten unter denaturierenden Bedingungen (2% SDS, 6M Harnstoff) stabil (Abb.3-16) (Scherzinger et al., 1997; Diaz-Hernandez et al., 2004; Schaffar, 2004). Sie zeigen charakteristische Eigenschaften amyloider Aggregate wie z.B. fibrilläre Form (Abb.3-3c) und eine nukleationsabhängige Aggregation (Abb.3-2d).

4.1.2 Untermauerung der *toxic fragment*-Hypothese: Im Gegensatz zu Ataxin3-Fragmenten aggregiert Volllängen-Ataxin3 mit pathologischem polyQ-Bereich kaum

Die *toxic fragment*-Hypothese besagt, daß die Spaltung der pathologischen polyQ-Volllängenproteine und damit die Bildung von polyQ-enthaltenden Fragmenten den Aggregationsprozeß initiiert (siehe 1.3.1 und 1.3.2), welcher mit der Bildung von Proteinablagerungen und der Pathogenese assoziiert ist (siehe 1.1.3). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden verschiedene AT3-Deletionsmutanten mit einem pathologischen polyQ-Bereich von 71 Glutaminen konstruiert (Abb.3-1a). Diese AT3-Fragmente wurden als GST-AT3-Fusionsproteine gereinigt bzw. in Neuroblastomazellen exprimiert. Die Beobachtungen zum *in vitro*-Aggregationsverhalten der gereinigten Proteine (Abb.3-2b) und zum Aggregationsverhalten in N2a-Zellen (Abb.3-5a, 3-6, 3-25b) unterstützen die *toxic fragment*-Hypothese, da im Gegensatz zu AT3-Fragmenten mit 71 Glutaminen das AT3Q71-Volllängenprotein nicht bzw. kaum SDS-resistent aggregiert. *In vitro* zeigen nur die beiden kürzesten AT3-Fragmente 242cQ71 und 257cQ71 SDS-resistente Aggregation im Filtertest. Im Gegensatz dazu aggregieren in N2a-Zellen auch die längeren AT3-Fragmente 186cQ71 und 221cQ71. Da eine weitere Verkürzung der exprimierten AT3-Fragmente (186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71) in Western Blot Analysen von Zelllysaten sowie von aufgelösten Aggregaten detektiert wurde (Abb.3-5b, 3-25c), und sich außerdem die 186cQ71-Aggregation deutlich durch die Inhibition von Calpain-Proteasen hemmen läßt (Abb.3-35d), kann man davon ausgehen, daß die gleichermaßen starke Aggregation dieser vier Konstrukte (186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71) in N2a-Zellen durch die proteolytische Verkürzung der exprimierten Proteine auf die Fragmentgröße von 257cQ71 ausgelöst wird. Die *in vitro*- und *in vivo*-Daten weisen also darauf hin, daß das AT3Q71-Volllängenprotein von einer unbekannt Protease im Bereich 242-257 geschnitten werden muß, um Aggregation zu ermöglichen. Das Laufverhalten des 257cQ71-Fragments in SDS-PAGE und Western Blot Analysen (~32 kDa; Abb.3-24c) entspricht dem eines in humanen SCA3-Gehirnen detektierten Fragments (~35 kDa), welches nicht in Lysaten von Kontrollgehirnen detektiert wurde (Goti et al., 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit ergab eine Auszählung mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie eine Bildung von Proteinablagerungen in 5-10% aller AT3Q71-transfizierten N2a-Zellen, wohingegen in ~90% aller 257cQ71-exprimierenden Zellen Einschlusskörperchen detektiert wurden. Andere Autoren beobachteten Proteinablagerungen in ~1% aller AT3Q79-transfizierten HeLa- oder neuronal differenzierten PC12-Zellen (Matsumoto et al., 2004;

Yamamoto et al., 2001). Nukleäre Einschlüsse wurden bei AT3Q78-Expression in 1% aller transfizierten HeLa, COS-7 und HEK293T-Zellen detektiert (Chai et al., 1999b). Auch für Ataxin7-Q100 konnte gezeigt werden, daß ein Fragment stärker aggregiert als das Vollängenprotein, wobei Einschlüsse in 40% aller HEK293T-Zellen, die das Fragment 1-232 exprimierten, und in 17% aller Zellen, die das Vollängenprotein (1-892) exprimierten, detektiert wurden (Zander et al., 2001). Das Htt-Q82-Vollängenprotein zeigte nur in 1% aller transfizierten HEK293T- oder N2a-Zellen Proteinablagerungen, die Q82-Fragmente 1-171 bzw. 1-63 jedoch in 82% bzw. 100% aller transfizierten Zellen (Cooper et al., 1998). Der Vollängen-AR mit 65Q aggregierte in stabilen NIH 3T3-Zellen selbst nach 2 Wochen nicht, wohingegen das 65Q-Fragment 1-127 in ~35% aller Zellen Einschlüsse zeigte (Cowan et al., 2003). Daher ist anzunehmen, daß nicht nur AT3 sondern auch die anderen polyQ-Proteine als Vollängenproteine nur geringfügig aggregationskompetent sind.

4.1.3 Bildung von SDS-resistenten Oligomeren und SDS-löslichen Aggregationsintermediaten

Eine Untersuchung der SDS-Löslichkeit der gereinigten AT3-Fragmente *in vitro* zeigte, daß die Fragmente 186cQ71 und 221cQ71, die keine Aggregation im Filtertest zeigen (Abb.3-2b), nur noch geringfügig SDS-löslich sind (Abb.3-3 a-b). Dies legt nahe, daß diese beiden längeren Fragmente (186cQ71 und 221cQ71), die nicht auf dem Filter detektiert werden, trotzdem SDS-resistente Aggregate (Oligomere oder dünne Fibrillen) bilden, die nicht mehr in das SDS-Polyacrylamidgel hineinlaufen können. Die Tatsache, daß einige wenige Monomere zu SDS-resistenten Oligomeren aggregieren, ist bereits für das Glutamin- und Asparagin-reiche Hefe-Prion Sup35 beschrieben, welches SDS-resistente Sup35-Oligomere (740-4200 kDa) bildet, die nur aus 8 bis 50 Sup35-Monomeren bestehen (Kryndushkin et al., 2003). Ein Vergleich von *in vitro*-Koaggregationsstudien mit AT3Q22 weist darüberhinaus darauf hin, daß bei 257cQ71 zunächst SDS-lösliche Aggregationsintermediate gebildet werden, welche mit zunehmender Inkubationszeit zu SDS-resistenten Koaggregaten umgewandelt werden (Abb.3-17 a+c), während 186cQ71 direkt SDS-resistent mit AT3Q22 koaggregiert (Abb.3-17d). Dies deutet auf unterschiedliche Aggregationsmechanismen bei 186cQ71 und 257cQ71 hin. Ähnlich dem AT3-Fragment 257cQ71, wurden bei der A β 40-Aggregation große amorphe Aggregationsintermediate mittels Fluoreszenz-Korrelationspektroskopie (FCS) detektiert, aus welchen letztendlich Amyloid-beta-Fibrillen hervorgingen (Tjernberg et al., 1999; Rochet and Lansbury, 2000). Insulin bildet ebenfalls

Aggregationsintermediate, die zunächst ihre vorwiegend helikale Struktur behalten, bevor sie in Fibrillen mit β -Faltblatt-Struktur umgewandelt werden (Jimenez et al., 2002). Da die Fragmente 186cQ71, 221cQ71, 242cQ71 und 257cQ71 *in vitro* gleichermaßen SDS-unlöslich aggregieren (Abb.3-3a), stellt sich die Frage, ob ein 186- oder 221-C-terminales Fragment *in vivo* zu Toxizität führt, oder ob eine weitere Verkürzung dieser Fragmente auf die Länge von 242c oder 257c nötig ist, um die SCA3-Erkrankung auszulösen. Die Detektion eines ~220cQ71-Fragments im Gehirn symptomatischer transgener AT3Q71-Mäuse (siehe 1.3.2) weist darauf hin, daß eine Spaltung von AT3 an Position ~220 genügt, um Pathogenese zu induzieren (Goti et al., 2004). Somit muß die in 4.1.2 gemachte Hypothese, das AT3Q71-Volllängenprotein müsse im Bereich 242-257 geschnitten werden, um Aggregation zu ermöglichen, revidiert werden, und es kann festgestellt werden, daß die Spaltung eines pathologischen AT3-Volllängenproteins im Bereich ~220 genügen könnte, um die Erkrankung SCA3 hervorzurufen.

4.1.4 Die zelluläre Lokalisation von Ataxin3 hat keinen Einfluß auf die Aggregation in Neuroblastomazellen

Da sich Proteinablagerungen (Einschlüsse) des 257cQ71-Fragments überwiegend im Zellkern von N2a-Zellen befinden, Volllängen-AT3 jedoch im Nukleus und im Cytoplasma (Abb.3-6), sollte geklärt werden, ob die zelluläre Lokalisation von AT3 einen Einfluß auf dessen Aggregationsfähigkeit ausübt. Ein Vergleich des Aggregationsverhaltens von AT3 mit NLS (Kernlokalisierungssignal) oder NES (Kernexportsignal) zeigte weder Unterschiede in der SDS-resistenten Aggregation noch in der Bildung von zellulären Einschlusskörperchen in N2a-Zellen (Abb.3-22, 3-23). Der Transport des pathologischen AT3-Volllängenproteins in den Zellkern hinein (NLS-AT3Q71) resultiert also nicht in Aggregation, und der Transport des pathologischen AT3-Fragments aus dem Kern hinaus ins Cytoplasma (NES-257cQ71) verhindert dessen Aggregation nicht. Diese Daten deuten darauf hin, daß die proteolytische AT3-Spaltung, und nicht das Vorkommen von AT3 im Nukleus, die Aggregation auslöst, und unterstützen somit die *toxic fragment*-Hypothese.

4.1.5 Die endogene Sequenz RKRR (282-285) dient nicht als Kernlokalisierungssignal

In der Literatur findet man bei Expression unterschiedlicher Htt-Fragmente (mit NLS oder NES) in Zellkultur verschiedene Resultate in Bezug auf Aggregation und Toxizität (siehe 3.5). Bei transgenen HD-Mäusen zeigte sich kein Unterschied im Phänotyp zwischen Htt-(1-171)-87Q und NLS-Htt-(1-171)-87Q (Schilling et al., 2004). Interessanterweise findet man im Ataxin1-Protein genauso wie im AT3-Protein die Sequenz RKRR, die als putatives Kernlokalisierungssignal (NLS) angesehen wird. Die Mutation von K (Lys) zu T (Thr) resultierte in cytoplasmatischer Ataxin1-Lokalisation sowie Inhibition der Bildung von Einschlüssen und Inhibition der Pathogenese bei transgenen Mäusen, was auf eine Kernlokalisation als Voraussetzung für Aggregation und Pathogenese hinweist (Klement et al., 1998). Die Tatsache, daß die AT3-Vollängenproteine diffus in der gesamten Zelle und die 257cQ71-Aggregate fast ausschließlich im Zellkern vorkommen (Abb.3-6), weist auf die Möglichkeit hin, daß die putative Kernlokalisationssequenz RKRR (Position 282-285) im AT3-Vollängenprotein maskiert wird, jedoch im Fragment frei zugänglich ist und so den Kerntransport des Fragments auslöst. Die Untersuchung von zellulären Einschlusskörperchen bei Expression der Mutanten 257cQ71-(RKRR>HNHH) und 257cQ71- Δ RKRR zeigte keine deutlichen Unterschiede in Bezug auf ihre zelluläre Lokalisation im Vergleich zu 257cQ71 (N2a-Zellen, Abb.3-24b). Deshalb kann man davon ausgehen, daß die Sequenz RKRR im 257cQ71-Fragment nicht als Kernlokalisationssequenz fungiert. Dies steht im Gegensatz zur RKRR-Sequenz in Ataxin1, da Ataxin1-(RKRR>RTRR) im Cytoplasma und im Nukleus von COS-1-Zellen detektiert wurde, wohingegen Wildtyp-Ataxin1 ausschließlich im Nukleus lokalisiert ist (Klement et al., 1998). Experimente in Kooperation mit Annett Boeddrich und Erich Wanker (MDC, Berlin) zur Interaktion von AT3 mit p97 (VCP) identifizierten die p97-Bindungsregion in AT3 bei Position 277-291, wobei sich die RKRR-Sequenz (282-285) als essenziell herausstellte (siehe 3.3.1). Im Gegensatz zu 257cQ71, findet eine Bindung von p97 an 257cQ71-(RKRR>HNHH) nicht statt, was auf eine Funktion dieser vier basischen Reste in der Interaktion mit p97 hindeutet.

4.1.6 Aggregationseigenschaften von Ataxin3 in *S. cerevisiae*

In Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* YPH499) zeigen die Fragmente mit pathologischem polyQ-Bereich (257cQ71 und 257cQ87), jedoch auch das 43Q-Fragment 257cQ43 (Abb.3-4 a-b), SDS-resistente Aggregation, was nicht den *in vitro*-Resultaten oder der AT3-

Aggregation in N2a-Zellen entspricht. Die Fusion mit einer N-terminalen Kernlokalisationssequenz (NLS) führt dazu, daß die Aggregation in Hefen der in N2a-Zellen gleicht (Abb.3-21a). Möglicherweise findet in Hefezellen der Kern-Transport von Proteinen ohne NLS wesentlich ineffizienter statt als in N2a-Zellen, was die Aggregationseigenschaft der verschiedenen AT3-Fragmente beeinflussen könnte. Da im Rahmen dieser Arbeit keine Immunfluoreszenz-mikroskopischen Analysen der Hefezellen durchgeführt wurden, kann keine Aussage über die Lokalisation der AT3-Aggregate in Hefezellen gemacht werden. Da in Hefen, im Gegensatz zu den N2a-Lysaten, keine weitere Verkürzung der exprimierten Fragmente NLS-186cQ71 und NLS-242cQ71 auf die Größe von 257cQ71 detektiert wurde (Abb.3-21b), steht die beobachtete Aggregation von NLS-186cQ71 im Widerspruch zu der postulierten proteolytischen Spaltung der längeren 71Q-Fragmente in N2a-Zellen.

4.1.7 Aggregierende Ataxin3-Fragmente induzieren keine Toxizität in *S. cerevisiae* und N2a-Zellen

Im hier untersuchten Hefestamm YPH499 konnte selbst bei langanhaltender Expression des stark aggregierenden AT3-Fragments 257cQ87 und unter Streßbedingungen wie erhöhter Temperatur keine verlangsamte Vermehrung der Hefen beobachtet werden, welche auf polyQ-Toxizität hinweisen würde (Abb.3-4f). Ebenfalls ein nur minimal verringertes Wachstum zeigte die Expression von Htt-103Q-GFP bzw. Htt-53Q in YPH499, W303 und JN54 (Krobitsch and Lindquist, 2000; Muchowski et al., 2000). Andere Autoren beschreiben jedoch einen Wachstumsdefekt durch Htt-103Q-GFP in W303 und JN54, der abhängig vom Prion-Phänotyp [RNQ⁺] sein soll (Meriin et al., 2002). Da nicht bekannt ist, ob der in dieser Doktorarbeit verwendete Stamm YPH499 Hefepriionen besitzt, lassen sich diese unterschiedlichen experimentellen Resultate nicht weiter diskutieren.

Auch in N2a-Zellen reicht die Expression eines stark aggregierenden AT3-Fragments mit pathologischem polyQ-Bereich nicht aus, um Toxizität zu induzieren. Die Expression von AT3Q71 und 257cQ71 führt in N2a-Zellen zu keiner Caspase-Aktivierung (Abb.3-26c und Daten nicht gezeigt) im Gegensatz zur Behandlung von N2a-Zellen mit Staurosporin (Abb.3-27a), welches die Caspase-Kaskade aktiviert und letztendlich in apoptotischem Zelltod resultiert. In anderen Studien wurde jedoch in COS-7 und HEK293T-Zellen die Induktion von Apoptose (anhand morphologischer Kriterien und DNS-Fragmentierung) durch Expression von 290cQ79 oder 280cQ78 beobachtet, nicht aber durch Vollängen-AT3Q78/79 (Ikeda et al., 1996; Paulson et al., 1997b). Die Induktion von nekrotischem Zelltod durch AT3Q70

wurde in neuronal differenzierten Ratten-CSM14.1-Zellen beobachtet (Evert et al., 1999). Zusammenfassend kann man sagen, daß weitere Experimente zur Untersuchung der AT3-induzierten Neurodegeneration im menschlichen Gehirn benötigt werden, da unklar ist, ob Mechanismen der Apoptose oder der Nekrose in SCA3 und anderen polyQ-Erkrankungen involviert sind.

4.1.8 Modifikationen und proteolytische Degradation von Ataxin3 in N2a-Zellen

Vergleicht man in Western Blot Analysen die Banden der gereinigten AT3-Proteine (mit PP geschnittenes GST-AT3) mit den Bandenmustern der in N2a-Zellen exprimierten Proteine, fällt auf, daß in Zelllysaten zusätzliche AT3-Banden von größerer und kleinerer Molekülmasse detektiert werden (Abb.3-24c und (Shoesmith Berke et al., 2005)), die wahrscheinlich auf Modifikationen und Degradationen (proteolytische Spaltung) zurückgehen. Die bei AT3-Vollängenprotein beobachteten Doppel- oder Dreifach-Banden (Abb.3-5b) treten auch auf, wenn AT3 ohne myc- oder FLAG-Epitope exprimiert wird (AT3Q22 *tagless*, Daten nicht gezeigt), was darauf hinweist, daß sie nicht durch diese zusätzlichen Sequenzen hervorgerufen werden. In der AT3-Sequenz existieren mehrere putative Phosphorylierungsstellen, ein Anhängen von Phosphatgruppen an AT3 konnte in unserer Arbeitsgruppe jedoch nicht festgestellt werden (persönl. Mitteilung Peter Breuer). Genauso konnte im Rahmen dieser Doktorarbeit eine Ubiquitylierung oder SUMOylierung (*small ubiquitin-like modifier*) von AT3-Vollängenprotein und Fragmenten mittels Immunpräzipitation (anti-AT3) und Western Blot Analysen (anti-Ubiquitin, anti-SUMO) nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Andere Autoren beschreiben jedoch eine Phosphorylierung (Trottier et al., 1998) und eine oligo-Ubiquitylierung von AT3 (bei Expression von HA-Ubiquitin (Shoesmith Berke et al., 2005)). Ubiquitylierungen oder SUMOylierungen von anderen polyQ-Proteinen wurden ebenfalls beschrieben (Kalchman et al., 1996; Ueda et al., 2002; Ross and Poirier, 2004; Steffan et al., 2004; Riley et al., 2005).

4.2 Toxic fragment-Hypothese: Proteolytische Spaltung von Vollängen-Ataxin3 als Voraussetzung für Aggregation

4.2.1 Detektion von polyQ-enhaltenden Fragmenten in Zelllysaten und aufgelösten Aggregaten bei Expression von pathologischem Ataxin3-Vollängenprotein

Wie bereits diskutiert, wird davon ausgegangen, daß globuläre Protein eine nicht-native Konformation annehmen müssen, um einen Aggregationsnukleus bilden zu können (Chen et al., 2002b; Schaffar et al., 2004; Wanker, 2000). Diese Strukturänderung kann das Resultat von destabilisierenden Mutationen (wie in Lysozym, Transthyretin, Prionprotein, α -Synuclein, siehe 1.1.3), partieller Denaturierung (*in vitro*-Amyloid-Bildung von Proteinen, die nicht in Erkrankungen involviert sind, wie Myoglobin, Insulin etc., siehe 1.1.2) oder Proteolyse (wie bei Amyloid-beta, siehe 1.3.1) sein (Rochet and Lansbury, 2000). Wie in 4.1.2 bereits besprochen, zeigt das AT3-Vollängenprotein mit pathologischem polyQ-Bereich im Vergleich zu einem pathologischen AT3-Fragment *in vitro* und *in vivo* keine SDS-resistente, amyloide Aggregation. Bei genauerer Analyse der AT3Q71-Aggregation in N2a-Zellen wurde jedoch eine geringe, mit zunehmender Zeit ansteigende Aggregation detektiert, welche 5-10% der Aggregation von 257cQ71 beträgt (Filtertest: Abb.3-25b). Tatsächlich findet eine endogene Fragmentierung von überexprimiertem AT3Q71 statt, und es zeigen sich polyQ-enhaltende Fragmente von 30-32 kDa, die sogar etwas kleiner als das aggregationskompetente 257cQ71-Fragment (~32 kDa) sind (Abb.3-25a). Ähnliche Beobachtungen wurden in einer anderen Studie gemacht, deren Autoren bei Expression von AT3Q68 in COS-7-Zellen ein polyQ-enhaltendes Fragment bei ~35 kDa detektierten (Berke et al., 2004). Darüberhinaus wurden Aggregate aus AT3Q71-exprimierenden N2a-Zellen mit Ameisensäure aufgelöst, wobei beobachtet wurde, daß diese aus Vollängen-AT3 und mehreren polyQ-enhaltenden AT3-Fragmenten (32-50 kDa) zusammengesetzt sind (Abb.3-25c). Auch in humanen SCA3-Gehirnen wurde ein 35 kDa-Fragment detektiert, das in Lysaten von Kontrollgehirnen nicht vorkam (Goti et al., 2004). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß pathologisches Ataxin3-Vollängenprotein im hier verwendeten *in vivo*-Aggregationsmodell von endogenen Proteasen geschnitten wird (Abb.4-1), was mit der proteolytischen Spaltung von AT3 in SCA3-Gehirnen übereinstimmt.

4.2.2 Die induzierte Spaltung von pathologischem Volllängen-Ataxin3 in N2a-Zellen resultiert in Aggregation

Um die *toxic fragment*-Hypothese, die die Spaltung von AT3 als Voraussetzung für dessen Aggregation postuliert, zu untermauern, wurde ein AT3-Volllängenprotein mit einer internen TEV-Schnittstelle konstruiert und zusammen mit TEV-Protease in N2a-Zellen exprimiert. Die induzierte Spaltung dieses AT3Q71-Volllängenproteins führte zu einer deutlichen Aggregationssteigerung auf etwa dasselbe Niveau, welches bei Expression des Fragments 257cQ71 erreicht wurde (Abb.3-25 e-f). Diese Daten zeigen somit erstmalig, daß die proteolytische Spaltung eines pathologischen polyQ-Proteins in dessen Aggregation resultiert.

4.2.3 Ataxin3 wird nicht autoproteolytisch gespalten

Da AT3 zur Familie der Cysteinproteasen gehört (siehe 1.1.4), wurde eine mögliche Autoproteolyse von AT3 *in vitro* untersucht. In Western Blot Analysen wurde kein Unterschied zwischen einer 1-stündigen Inkubation von AT3 und einer Inkubation mit Protease-Inhibitoren bzw. CaCl_2 (siehe unten) detektiert (Daten nicht gezeigt und Abb.3-29a). Inkubationsansätze von gereinigtem His-AT3Q22 oder His-AT3Q22-C14S (inaktive Mutante (Burnett et al., 2003)) mit Protease-Inhibitoren oder mit CaCl_2 zeigten ebenfalls keinen Unterschied in Western Blot Analysen (Daten nicht gezeigt), was darauf schließen läßt, daß keine AT3-Selbstspaltung stattfindet. Dies stimmt mit der kürzlich gemachten Beobachtung von Pastore und Mitarbeitern überein, daß die Josephin-Domäne keine Calcium-aktivierte Protease ist (Nicastro et al., 2005).

4.2.4 Untersuchungen zur Identifizierung der Ataxin3-schneidenden Protease

Um Hinweise auf die noch unbekannt, AT3-schneidende Protease(n) zu erhalten, wurden verschiedene Strategien durchdacht. Als eine mögliche Strategie wurde ein Hefe-Screen mit Expression von humanen *cDNA*-Bibliotheken diskutiert. Da man in Hefen alternierende CAA CAG-Wiederholungen benötigt, um eine Verkürzung des polyQ-Bereichs auf Gen-Ebene zu verhindern (Michalik et al., 2001; Krobitch and Lindquist, 2000), wurden AT3-Konstrukte mit alternierenden CAACAG-Codons (AT3Q87, 257cQ87) kloniert. Trotz starker Aggregation von 257cQ87 führt die Expression dieses AT3-Fragments nicht zu Toxizität, die in Form von verlangsamtem Wachstum der Hefezellen beobachtet wird (Abb.3-4 b+f), weshalb der vorgeschlagene genetische Screen nicht durchgeführt werden konnte. Wenn ein

Diskussion

starker Wachstumsdefekt bei Expression dieses aggregationsfähigen AT3-Fragments aufgetreten wäre, nicht jedoch bei Expression des Volllängenproteins AT3Q87, hätte man das Volllängenprotein zusammen mit einer humanen *cDNA*-Bank exprimieren können, und hätte durch Induktion der AT3-Expression ein deutlich geringeres Wachstum der Zellen, die die gesuchte Protease exprimieren, detektieren müssen (Replika-Plattierung). Die Expression einer *cDNA*-Bank aus Säugerzellen (human oder Maus) wäre im beschriebenen Experiment nötig gewesen, da bei Expression von AT3 in Hefezellen keine deutliche Fragmentierung durch endogene Proteasen detektiert werden konnte (Abb.3-4 c-d), was darauf hinweist, daß die AT3-schneidende Protease(n) nur in höheren Eukaryoten (Säugerzellen) vorkommt.

Eine Reinigung von AT3Q22-Fragmenten aus N2a-Lysaten mittels Immun-Affinitätschromatographie (anti-AT3-Antikörper kovalent an ProteinA-Sepharose gebunden) und anschließender N-terminaler Ansequenzierung sollte Informationen über die Schnittstellen in AT3 und damit über die verantwortliche Protease (Konsensussequenz bzw. Präferenz für bestimmte Aminosäuren) geben. Die Eluate der Reinigungsprozedur zeigten AT3-Fragmente in Western Blot Analysen (anti-AT3). Die mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektierten Proteine stellten sich jedoch in der Sequenzierung als Histone oder ribosomale Proteine heraus (Daten nicht gezeigt).

Eine Inkubation von AT3Q71-exprimierenden Zellen mit verschiedenen Protease-Inhibitoren wurde durchgeführt, um Hinweise auf die Proteaseklasse (Cystein-, Serin-, Aspartyl-Protease) zu erhalten. Mittels Western Blot Analysen wurde untersucht, ob die endogene AT3-Fragmentierung durch die Protease-Inhibitoren reduziert wird. Nur bei Zugabe von Leupeptin (Cystein-/Serin-Protease-Inhibitor) zum Kulturmedium wurde eine Veränderung der AT3-Bandenmuster detektiert, unerwarteterweise trat jedoch eine Verstärkung der Fragmentbanden auf (Daten nicht gezeigt). Dies kann nur durch die in mehreren Schritten ablaufende Spaltung von AT3Q71 durch mindestens zwei verschiedene Proteasen erklärt werden, wobei die erste aktiv ist und somit Fragmente produziert, die zweite jedoch von Leupeptin gehemmt wird und daher die schon vorhandenen Fragmente nicht weiter proteolytisch zerschneiden kann. Ein Effekt von Leupeptin auf die SDS-resistente AT3Q71-Aggregation wurde nicht beobachtet (Filtertest; Daten nicht gezeigt).

Eine Inkubation von gereinigtem AT3Q22 mit Säuger-Zellextrakten sollte Hinweise auf die gesuchte Protease(n) geben, wobei durch eine Fraktionierung der Lysate (Saccharose-

Gradient, Gelfiltrations- / Ionenaustauscher-Säule) die Protease in bestimmten Fraktionen angereichert werden sollte. Zur Identifizierung der proteolytisch aktiven Fraktion sollte beispielsweise ein Filtrertest nach Inkubation der verschiedenen Fraktionen mit AT3Q71 durchgeführt werden. Die Zugabe von postnukleärem N2a-Überstand, in dem die Membranen durch Saccharose stabilisiert werden und intakt bleiben, führte wiederholt zur Fragmentierung von AT3Q22 (Abb.3-28a), eine AT3-schneidende Aktivität konnte jedoch nach Fraktionierung der Lysate nicht mehr detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.2.5 Hinweise auf die Spaltung von Ataxin3 durch Caspasen

Da von einigen Autoren gezeigt wurde, daß polyQ-Proteine apoptotischen Zelltod induzieren, wird über eine Rolle der apoptotischen Proteasen, den Caspasen, in der Spaltung von polyQ-Proteinen nachgedacht (siehe 1.3.3). Es ist bekannt, daß sich verschiedene Caspasen gegenseitig beim programmierten Zelltod (Apoptose) aktivieren und letztendlich zu einem Abbau von Mitochondrien, Zellkern, Cytoskelett und Cytoplasmamembran führen. Es gibt jedoch Hinweise darauf, daß in spezialisierten Zellen eine Caspase-Aktivierung ohne anschließenden Zelltod (Apoptose) vorkommen kann. So wurde z.B. eine Beteiligung von Caspasen an der Entwicklung von Säugetier-Linsenzellen zur Augenlinse vorgeschlagen, wobei Caspasen und DNasen die Zellorganellen abbauen und somit Lichtdurchlässigkeit herstellen (Weber and Menko, 2005; Foley et al., 2004). Ähnliches läuft bei der Differenzierung zu Erythrozyten ab, bei der die Vorläuferzellen ihren Zellkern und andere Organellen verlieren (Review: (Jacobson et al., 1997)). Auch bei chronischen neurodegenerativen Erkrankungen sollen bestimmte Caspasen in sublethaler Menge aktiviert werden (Tarlac and Storey, 2003), weshalb eine Spaltung von polyQ-Proteinen durch Caspasen möglich erscheint.

Ein Vergleich der AT3-Sequenz mit bekannten Caspase-Konsensussequenzen ergibt mehrere potentielle Caspase-Schnittstellen im AT3-Protein: LISD(145), DLDP(171), EAND(217), LDED(225), DEED(228), DMED(244), EEAD(248) (Wellington et al., 1998; Berke et al., 2004). (Aufgelistet sind die P4-P1 Tetrapeptid-Erkennungssequenzen, wobei Caspasen generell hinter dem P1-Aspartat (D) schneiden.) Bisher konnte jedoch in Experimenten mit *in vitro*-translatierten polyQ-Proteinen und gereinigten Caspasen keine deutliche Proteolyse von AT3 durch Caspasen gezeigt werden (Wellington et al., 1998), wohingegen Htt, Atrophin-1 und AR in kürzerer Inkubationszeit klare Fragmentierung zeigten. Auch TBP ließ sich durch Caspasen nicht schneiden (Wellington et al., 1998).

Diskussion

Da für HEK293T-Lysate eine *in vitro*-Caspase-Aktivierung beschrieben ist (Bartke et al., 2004), wurde im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Spaltung von humanem AT3 bei Aktivierung der Caspase-Kaskade untersucht. Eine AT3-Spaltung, die durch die Caspase-Inhibitoren Z-VAD-FMK, Z-DEVD-FMK und Ac-YVAD-CHO gehemmt werden konnte, wurde gezeigt (Abb.3-30 a-b). Geht man davon aus, daß das endogene humane Vollängen-AT3 etwa 42 kDa groß ist, und die Fragmente bei dieser *in vitro*-Caspase-Aktivierung bei 22, 27 und 30 kDa detektiert werden (Abb.3-30a), kann man darüber spekulieren, ob die Hälfte (~180c-Fragment) bzw. etwa ein Drittel der AT3-Sequenz (~90c-Fragment oder ~270c-Fragment) abgespalten wurde. Tatsächlich existiert eine putative Caspase-Schnittstelle an Position 171 (DLPD) jedoch keine an Positionen ~90 oder ~270. Die Generation eines ~270c-Fragments mit pathologischem polyQ-Bereich sollte in dessen Aggregation resultieren, was jedoch experimentell nicht gezeigt werden konnte.

Eine Inkubation verschiedener Säugetierzellen mit Staurosporin, einem oft verwendeten Apoptose-Induktor, führt nur in den Zelllinien N2a und COS-7 zu einer verstärkten Fragmentierung des endogenen AT3, wohingegen in HeLa, NIH3T3, CHOE36 und HEK293T kein Effekt auftritt (Abb.3-27b). Diese Staurosporin-induzierte AT3-Fragmentierung in COS-7-Zellen, jedoch kein Staurosporin-Effekt auf eine Vielzahl anderer Zelllinien, wurde ebenfalls von anderen Autoren beobachtet (Berke et al., 2004). Eine Aktivierung der Caspase-Kaskade durch Staurosporin-Behandlung von N2a- und COS-7-Zellen wurde durch Spaltung der Procaspase-3 (32 kDa) zu einem 17 kDa-Fragment gezeigt (Abb.3-27a und Daten nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, daß entweder die Caspasen selbst oder aber andere Protease(n) wie z.B. Calpaine (siehe 1.3.4), die durch Caspasen aktiviert werden, das AT3-Protein in N2a- oder COS-7-Zellen schneiden.

Die Staurosporin-Behandlung von AT3Q71-exprimierenden N2a-Zellen resultiert in einer schwachen AT3-Fragmentierung, wobei ein polyQ-enthaltendes Fragment detektiert wird, welches nur um ~3 kDa größer als 257cQ71 ist (Abb.3-26b). Eine verstärkte Aggregation von AT3Q71 nach Staurosporin-Behandlung konnte im Filtertest jedoch nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt), was durch die kurze Zeitspanne der Behandlung (>14 h: toxisch) bzw. durch zu geringe Konzentrationen des Fragments in der Zelle erklärt werden könnte. Eine andere Möglichkeit ist, daß das um ~3 kDa größere Fragment aggregationsinkompetent ist bzw. wesentlich schwächer als 257cQ71 aggregiert, was bei einem Vergleich der *in vitro*-Aggregation von 257cQ71 mit 221cQ71 und 242cQ71 denkbar ist. Die gereinigten Proteine GST-221cQ71 und GST-257cQ71 haben einen Größenunterschied von etwa 5 kDa, und GST-242cQ71 ist ~2 kDa größer als GST-257cQ71 (Abb.3-2b). Nach PP-Spaltung aggregiert

221cQ71 nicht und 242cQ71 nur zu etwa 20% im Vergleich zu 257cQ71 (Abb.3-2c), was für eine deutlich geringere Aggregation des Staurosporin-induzierten polyQ-Fragments spricht. Mehrere putative Caspase-Schnittstellen (EAND(217), LDED(225), DEED(228), DMED(244), EEAD(248)), an denen eine Spaltung des AT3Q71-Proteins *in vivo* stattfinden könnte, lassen sich in diesem Bereich von AT3 finden.

In einer anderen Studie wurde die natürlicherweise auftretende AT3-Fragmentierung in COS-7-Zellen durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK unterdrückt (Berke et al., 2004), was als Beweis für eine Beteiligung von Caspasen an der AT3-Spaltung angesehen wurde. Da jedoch eine gegenseitige Aktivierung von Caspasen und Calpainen (siehe 1.3.4) sowie eine Inhibition von Calpainen durch Z-VAD-FMK bekannt ist (Waterhouse et al., 1998), könnte in diesen Experimenten AT3 auch von Calpainen geschnitten worden sein. Andere Studien zeigten, daß Staurosporin-Zugabe zunächst in partiellem Auslaufen der Lysosomen von T-Lymphozyten und Fibroblasten resultierte, wodurch Cathepsin B, D und L in das Cytoplasma gelangten, und erst später in Caspase-Aktivierung (Johansson et al., 2003; Bidere et al., 2003). Cystein-Proteasen der Cathepsin-Familie lassen sich wie die Calpaine ebenfalls durch den Caspase-Inhibitor Z-VAD-FMK hemmen (Schotte et al., 1999), so daß Staurosporin- und Z-VAD-FMK-Behandlung auch auf Cathepsin B, H und L als AT3-schneidende Proteasen hinweisen könnte.

4.2.6 Calpain-abhängige Ataxin3-Spaltung *in vitro*

Nachdem sich keine eindeutigen Hinweise auf AT3-Spaltung durch Caspasen und daraus folgende Aggregation *in vivo* ergeben hatten, wurden *in vitro*-Experimente mit postnukleärem Überstand von N2a-Zellen unter verschiedenen Bedingungen, die cytoplasmatische Proteasen aktivieren sollten, durchgeführt. In diesen postnukleären Überständen bleiben Membranen überwiegend intakt und daher ist AT3 anderen Proteasen wie z.B. lysosomalen Proteasen nicht zugänglich. Die Zugabe von ATP-regenerierendem System und die Einstellung eines sauren pH-Wertes zur Aktivierung von Aspartylproteasen haben keinen Effekt auf die Fragmentierung von gereinigtem AT3Q22, wohingegen die Zugabe von CaCl₂, nicht jedoch von MgCl₂, eine verstärkte Fragmentierung von AT3 hervorruft (Abb.3-28b). Ein Vergleich der Calcium-abhängigen Fragmentierung des endogenen Maus-AT3 in postnukleärem N2a-Überstand mit der des rekombinanten humanen AT3 zeigt eine gemeinsame 29 kDa-Bande, bei der es sich um ein Maus-AT3 Fragment handeln muß bzw. ein Fragment der homologen Josephin-Domäne (Abb.3-28c, 3-29a). Weitere Calcium-abhängige 20 und 34 kDa-Banden

Diskussion

treten nur bei humanem AT3Q22 auf (Abb.3-28c), was auf Schnittstellen in der humanen, nicht homologen C-terminalen Sequenz hindeutet. Eine genauere Analyse dieser Calcium-abhängigen AT3-schneidenden Protease(n) mittels verschiedener Protease-Inhibitoren und mittels Trennung von Membranfraktionen und Cytoplasma weist auf die Proteasefamilie der cytoplasmatischen Calpaine hin. Calpaine lassen sich von EGTA, ALLN, MG132, Leupeptin und E-64, jedoch nicht von Pepstatin und Aprotinin hemmen, was auf die AT3-schneidende Protease in N2a-postnukleärem Überstand zutrifft (Abb.3-29a). Die Spaltung von AT3 findet in 1.000xg- sowie in 100.000xg-Überstand statt, was auf eine cytoplasmatische Protease hindeutet (Abb.3-29b). Eine *in vitro*-AT3-Fragmentierung von endogenem humanem AT3 findet ebenfalls bei CaCl₂-Zugabe in HEK293T-Lysaten statt und läßt sich mit denselben Inhibitoren hemmen wie die entsprechenden Protease(n) in N2a-postnukleärem Überstand (Abb.3-30 c-d und Daten nicht gezeigt). Somit können eine Proteasekontamination im gereinigten AT3Q22-Protein sowie Effekte durch die Zugabe von PP ausgeschlossen werden, und man kann davon ausgehen, daß dieselbe Protease(n), die in Maus-Zellen exprimiert wird, auch in humanen Zellen vorkommt. Ein Vergleich der AT3-Spaltung in HEK293T-Lysaten bei CaCl₂-Zugabe mit der Spaltung bei *in vitro*-Caspase-Aktivierung zeigt deutlich unterschiedliche AT3-Fragmente (Abb.3-30d). Dies spricht für eine AT3-Spaltung durch unterschiedliche Proteasen, weshalb man eine Aktivierung von Calpainen unter beiden Bedingungen, einerseits direkt durch Ca²⁺, andererseits indirekt durch Caspasen, ausschließen kann. Man muß daher davon ausgehen, daß AT3 *in vitro* sowohl von Caspasen (oder von Caspase-aktivierten Proteasen; siehe 4.2.5) als auch von den postulierten Calpainen geschnitten werden kann. Zusammenfassend kann man feststellen, daß die übereinstimmenden Resultate der Protease-Inhibitor-Experimente *in vitro* mit Maus-Zelllysaten und mit humanen Zelllysaten auf die Calcium-abhängigen Calpaine als die AT3-schneidenden Proteasen hinweisen.

Die Untersuchung einer *in vitro*-Spaltung von gereinigtem AT3 mit gereinigtem Calpain II ergab mehrere AT3-Fragmente (Abb.3-32 a-b). Für Calpaine sind bis heute keine Konsensussequenzen der Schnittstellen bekannt, die bisher am häufigsten vorkommenden Aminosäuren in P2-, P1- und P1'-Position wurden jedoch identifiziert (Tompa et al., 2004). Eine Analyse der AT3-Sequenz anhand dieser Kriterien (siehe 1.3.4) ergab 16 potentielle Schnittstellen, die über das gesamte Protein verteilt vorlagen (Daten nicht gezeigt), wobei jedoch keine dieser potentiellen Schnittstellen experimentell bestätigt werden konnte (Abb.3-32c). Ein Vergleich der mittels N-terminaler Sequenzierung identifizierten Schnittstellen mit Sekundärstruktur-Vorhersagen für das AT3-Protein zeigt, daß Calpain II bevorzugt in

Diskussion

unstrukturierten Regionen von AT3 schneidet, was bereits von Tompa und Kollegen vorgeschlagen wurde (Tompa et al., 2004). Die Sequenzen E(56)DYR, Q(63)QPSG, R(188)PKLI und S(260)SRNI sollen in Regionen mit vom Zufall bestimmten Knäuelkonformationen (*random coil*) liegen. M(257)QGSS und R(318)DLS sollen sich am Übergang einer Helix zu einer *random coil*-Region befinden, und nur L(209)ERMLE liegt laut Sekundärstruktur-Vorhersagen in einer Helix-Region. Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß Calpain II das AT3Q22-Protein *in vitro* mehrmals in der Region ~60, mehrmals in der Region ~200 sowie an zwei verschiedenen Schnittstellen in der Region ~260 schneidet (Abb.3-32c). Es ist also davon auszugehen, daß bei Spaltung von AT3Q71 mit Calpain II aggregationskompetente 257cQ71 bzw. 260cQ71-Fragmente entstehen. Western Blot Analysen mit AT3Q71 und Calpain II zeigen nur sehr schwache polyQ-Banden bei etwa 30 kDa, wofür die SDS-resistente Aggregation der polyQ-Fragmente verantwortlich gemacht werden könnte, die auch als Grund für die Signale in den Taschen des Sammelgels angesehen wird (Abb.3-33a). Verstärkte AT3Q71-Aggregation im Filtertest wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt), was darin liegen könnte, daß die Inkubationsbedingungen, die einerseits zu einer ausreichenden Fragmentierung, andererseits jedoch nicht zu einem vollständigen Abbau des AT3Q71 führen, nicht gefunden wurden. In der Zelle könnte im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten ein vollständiger Abbau von AT3 durch Calpaine (Abb.3-33b) verhindert werden, indem die beiden Proteine durch andere Faktoren in der Zelle abgeschirmt oder die Calpaine an Membranen gebunden werden. Eine Calpain II-Zugabe zu den bereits erwähnten postnukleären Überständen verstärkt die schon vorhandenen Calcium-abhängigen Fragmentbanden (Abb.3-33c), was dafür spricht, daß es sich in den N2a-Zelllysaten um dieselbe AT3-schneidende Protease handelt oder zumindest um eine Protease, die dieselben Schnittstellen spaltet. Da Calpain II-Zugabe keine zusätzlichen, anderen Fragmentbanden generiert, kann man davon ausgehen, daß es sich bei der Calcium-abhängigen Protease im N2a-postnukleären Überstand tatsächlich um ein Calpain handelt.

Interessanterweise spaltet Calpain II *in vitro* den gereinigten, polyQ-enhaltenden Transkriptionsfaktor TBP fast genauso effizient wie gereinigtes AT3Q22, wohingegen das postulierte Calpain-Substrat Aktin (Villa et al., 1998) nicht geschnitten wird (Abb.3-33b). Ob die Ursache hierfür in der Sekundärstruktur von TBP oder Aktin zu suchen ist, oder ob der polyQ-Bereich einen Einfluß auf die Spaltung durch Calpain II ausübt, kann anhand dieser drei getesteten Proteine nicht festgestellt werden.

4.2.7 *In vivo*-Experimente mit Ionomycin, Calpeptin und Calpastatin deuten auf eine Ataxin3-Spaltung durch Calpaine hin

Eine Inkubation von humanen Neuroblastomazellen mit dem Calcium-Ionophor Ionomycin, welcher zu einer erhöhten cytoplasmatischen Calcium-Konzentration und damit zu einer Calpain-Aktivierung führen soll, resultiert in verstärkter Spaltung von endogenem humanem AT3 und von überexprimiertem AT3Q71 (Abb.3-31 a-b). In HEK293T-Zellen lassen sich darüber hinaus bei Ionomycin-Behandlung polyQ-enthaltende AT3Q71-Fragmente detektieren, die etwa die Größe von 257cQ71 besitzen (Abb.3-31c) und daher aggregationskompetent sein sollten. Zusätzlich zur Calpain-Aktivierung wurde eine Calpain-Inhibition *in vivo* mit Calpeptin und mit dem endogenen Calpain-Inhibitor Calpastatin untersucht. Die durch Ionomycin induzierte proteolytische AT3-Fragmentierung läßt sich ebenso wie die endogene AT3-Fragmentierung durch Calpeptin-Behandlung reduzieren (Abb.3-34 a-b), und die Koexpression von humanem Calpastatin mit AT3Q71 zeigt sogar eine vollständige Inhibition der Fragmentierung (Abb.3-35 a-b). Darüberhinaus wird die SDS-resistente Aggregation von AT3Q71 durch Calpeptin-Behandlung und durch Calpastatin-Koexpression deutlich reduziert (Filtertest; Abb.3-34c, 3-35b). Die Daten zeigen demnach einen Zusammenhang zwischen proteolytischer Spaltung und SDS-resistenter fibrillärer Aggregation von AT3 in Säugetierzellen (siehe 4.2.2) und weisen auf Calpaine als die gesuchten AT3-schneidenden Proteasen hin. Bei einer Assoziation von Aggregation und Pathogenese weisen die Daten auf die Rolle von Calpainen in der Entstehung der SCA3-Erkrankung hin (Abb.4-1).

Die in dieser Doktorarbeit dargestellte Studie untersuchte erstmals eine Hypothese zur Spaltung von polyQ-Proteinen und der darauffolgenden Aggregation (bzw. zur Inhibition der Spaltung und verringerter Aggregation) mittels biochemischer Methoden (Filtertest), wohingegen bisher veröffentlichte Studien auf einer Bestimmung von Proteinablagerungen mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie beruhten (Kim et al., 1999; Ellerby et al., 1999a; Ellerby et al., 1999b; Gafni et al., 2004). Die genannten Autoren gingen dabei davon aus, daß die Zahl der zellulären Einschlußkörperchen dem Ausmaß der SDS-resistenten Aggregation entspricht, man muß jedoch bedenken, daß Daten, die auf einer Zählung von transfizierten Zellen (Immunfluoreszenz) beruhen, zu einem falschen Bild, die SDS-resistente Aggregation betreffend, führen können. Zum Beispiel wurden in 75% aller NLS-280cQ27 exprimierenden HEK293T-Zellen nukleäre Einschlüsse beobachtet, welche jedoch keine SDS-resistenten Aggregate darstellten (Perez et al., 1998). Daher kann man in den erwähnten Studien nicht sicher von einem Zusammenhang zwischen Fragmentierung und Aggregation sprechen.

4.2.8 Hinweise auf weitere, bislang unbekannte Ataxin3-schneidende Protease(n)

Zusammengefaßt bestätigen die in 4.2 diskutierten experimentellen Daten die *toxic fragment*-Hypothese (siehe 1.3.1) und weisen auf die cytoplasmatischen, Calcium-abhängigen Calpaine als AT3-schneidende Proteasen hin. Die Beobachtung einer mit zunehmendem Alter erhöhten Calpain-Aktivität im menschlichen Körper (siehe 1.4) unterstützt den Vorschlag, daß es sich bei den Calpainen um die verantwortlichen, die SCA3-Erkrankung auslösenden Proteasen handeln könnte.

Da *in vitro* mit postnukleären Überständen von N2a-Zellen außerdem eine Calcium-unabhängige Fragmentierung des humanen AT3 detektiert werden konnte (23 kDa-Fragment, Abb.3-28a), muß man von einer oder mehreren weiteren Proteasen, die zusätzlich zu den postulierten Calpainen AT3 schneiden könnten, ausgehen. Weitere Studien zur Identifizierung der AT3-schneidenden Protease(n) wie z.B. genetische *Screens* mit *cDNA*-Banken werden daher zur Klärung dieser Fragestellung benötigt. Ein möglicher experimenteller Ansatz wurde bereits vorgestellt (Yamamoto et al., 2001), bei dem AT3-prozessierende Zellen angereichert wurden, indem AT3 mit einer transkriptionellen Aktivator-Sequenz fusioniert wurde, die nach proteolytischer Freisetzung zu Zeocin-Resistenz führte. Nach Zeocin-Selektion konnten PC12-Subklone isoliert werden, in denen 24% aller transfizierten Zellen Einschlusskörperchen aufwiesen (vor Selektion: 1%). Die Autoren detektierten in diesen Subklonen bei Expression von AT3Q79 ein 46 kDa-Fragment, die verantwortliche Protease(n) wurde in dieser Studie jedoch bislang nicht identifiziert.

4.3 Koaggregationseigenschaften des Ataxin3-Vollängenproteins

4.3.1 Die Koaggregation von Vollängen-Ataxin3 ist polyQ-abhängig und unabhängig von den Ubiquitin-Interaktionsmotiven

Da die AT3-Vollängenproteine sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nicht bzw. nur schwach aggregieren (Abb.3-2a, 3-4a, 3-5a, 3-25b), stellte sich die Frage, ob sie in Aggregate eines C-terminalen 71Q-Fragments hineingezogen werden können. Da davon ausgegangen wird, daß die Toxizität der pathologischen polyQ-Proteine unter anderem aus einer Rekrutierung von anderen zellulären Proteinen in Aggregate resultiert (siehe 1.1.3), könnte eine Koaggregation von AT3-Vollängenprotein zur Erkrankung beitragen. Bislang wurde eine Koaggregation von Vollängen-AT3 mit aggregierendem AT3-Fragment in Form von Kolo-kalisation bei

Diskussion

Immunfluoreszenz-Mikroskopie bzw. als SDS-resistente Aggregate in den Taschen von Sammelgelen (Western Blot Analysen) untersucht. Eine Studie beobachtete eine polyQ-unabhängige Kolokalisation, da sich die Fluoreszenz einer polyQ-Deletionsmutante ($\Delta 288-354$) genauso wie die von AT3Q27 mit der des AT3-Fragments überlagerte, wohingegen SDS-resistente Koaggregation im Sammelgel nur bei verlängertem polyQ-Bereich des rekrutierten AT3 (AT3Q78) nachweisbar war (Paulson et al., 1997b; Perez et al., 1998). Von UIM-abhängiger Koaggregation wurde in einer anderen Studie ausgegangen, die ausschließlich auf Kolokalisation von GFP- und CFP-Fusionsproteinen mittels Fluoreszenz-Mikroskopie beruhte (Donaldson et al., 2003). Wie *in vitro* (vorliegende Arbeit und (Scherzinger et al., 1997)) und in Zellkultur (Schaffar et al., 2004) gezeigt, führt die Fusion von polyQ-Fragmenten mit anderen Proteinen wie GST zu einer deutlichen Verringerung der Aggregation, weshalb man bei den GFP- und CFP-Fusionsproteinen ebenfalls von einem veränderten Aggregationsverhalten ausgehen muß. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Doktorarbeit ausschließlich polyQ-Proteine ohne Fusionspartner in Säugetierzellen exprimiert. Da die veröffentlichten Studien zur AT3-Koaggregation widersprüchlich sind, wurde in der hier vorliegenden Arbeit die Koaggregation mit Hilfe von biochemischen Methoden (Filtertest) analysiert. *In vitro* zeigt sich eine SDS-resistente Koaggregation von gereinigtem AT3Qn mit 257cQ71, die polyQ-abhängig und unabhängig von den beiden UIMs ist (Abb.3-15 a-b). Das Wildtyp-Protein AT3Q22 wird effizient in 257cQ71-Aggregate rekrutiert, wohingegen eine polyQ-Deletionsmutante (AT3Q Δ) nicht koaggregiert. Ähnliche Ergebnisse wurden für die *in vitro*-Koaggregation von AT3Qn mit Htt-Exon1-51Q beobachtet (Abb.3-15c), was auf eine Interaktion der polyQ-Bereiche als Koaggregationsmechanismus hinweist. In Hefen und in N2a-Zellen ist die Rekrutierung von Vollängen-AT3 in SDS-resistente 257cQ71-Fibrillen ebenfalls polyQ-abhängig und UIM-unabhängig (Abb.3-18b, 3-19b). Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen kamen zu den selben Ergebnissen die Kolokalisation (Koaggregation) in N2a-Zellen betreffend (Abb.3-19c). Ähnlich zu der hier beobachteten Koaggregation von Wildtyp-AT3 mit pathologischen AT3-Fragmenten wurde zuvor eine Rekrutierung von Wildtyp-Htt-Exon1 in Aggregate aus pathologischem Htt-Exon1-52Q (Filtertest) detektiert (Busch et al., 2003). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß AT3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* mittels Interaktion der polyQ-Bereiche in Aggregate rekrutiert wird, und daß dieser Prozeß unabhängig von den UIMs oder anderen Sequenzmotiven ist (Abb.4-1). Hinweise auf polyQ-abhängige Koaggregation hatte zuvor eine Untersuchung von neuronalen Einschlüssen in humanen SCA-1/-2/-3- oder DRPLA-Gehirnen ergeben, in welchen außer dem jeweiligen

pathologischen polyQ-Protein auch Proteine mit normalem polyQ-Bereich wie Ataxin-2, -3 und TBP detektiert wurden, nicht jedoch α -Synuclein, Tau oder A β (Uchihara et al., 2001). Einige Autoren beschreiben eine polyQ-unabhängige Interaktion und Kollokalisierung von CBP mit zellulären AT3-Einschlüssen (Chai et al., 2001), während andere Veröffentlichungen zeigen, daß polyQ-Deletionsmutanten der Transkriptionsfaktoren TBP und CBP nicht koaggregieren, was auch hier auf eine polyQ-Abhängigkeit der Koaggregation hinweist (Kazantsev et al., 1999; Nucifora et al., 2001; Schaffar et al., 2004).

4.3.2 Vollängen-Ataxin3 wird stabil in Koaggregate rekrutiert

Um eine direkte Interaktion von 257cQ71 mit (His-)AT3Q22 zu zeigen, wurde eine Ni-NTA-Affinitätsreinigung von Koaggregaten unter stark denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Da die Koaggregate mittels His-Epitop gereinigt und mittels myc-Epitop des 257cQ71 im Filtertest detektiert wurden (Abb.3-16a), kann man davon ausgehen, daß es sich bei diesen Koaggregaten um gemischte Aggregate aus beiden Proteinen, dem 257cQ71-Fragment und dem hineinrekrutierten AT3Q22, handelt. Auch in humanen Neuroblastomazellen wird endogenes humanes AT3 stabil in Aggregate, die durch Expression von 257cQ71 entstehen, hineingezogen. SDS-resistente, mit Ameisensäure aufgelöste Aggregate bestehen aus 257cQ71 und koaggregiertem endogenem AT3 (Abb.3-20a). Diese Beobachtungen stimmen überein mit Resultaten aus FRAP- und FLIP-Experimenten (*fluorescence recovery after photobleaching, fluorescence loss in photobleaching*) an lebenden Zellen, die zeigten, daß Proteine mit normaler polyQ-Länge (19Q-GFP, TBP-GFP, GFP-CBP) stabil in Aggregate (Htt, AT3) integriert und somit immobilisiert werden (Kim et al., 2002; Chai et al., 2002).

4.3.3 Vollängen-Ataxin3 macht *in vitro* eine polyQ-induzierte Konformationsänderung durch und wird in frühe Aggregationsintermediate rekrutiert

Generell wird angenommen, daß die Bildung von Aggregationsnuklei (*seeds*) für die amyloide Fibrillisation über die Bildung von partiell strukturierten Monomeren erfolgt, was eine Entfaltung globulärer Proteine (Lysozym, Transthyretin) bzw. eine Struktur-Zunahme bei nativ-ungefalteten Proteinen (α -Synuclein, A β , Tau) erfordert (Rochet and Lansbury, 2000). Für pathologische polyQ-Proteine nimmt man an, daß zur Initiation der Aggregation eine Konformationsänderung von relativ ungeordneter Struktur (*random coil*) zu β -Faltblatt-

Struktur benötigt wird (Abb.4-1) (Rochet and Lansbury, 2000; Wanker, 2000; Chen et al., 2002b; Ross and Poirier, 2004). Die Tatsache, daß der polyQ-spezifische Antikörper 1C2 ausschließlich verlängerte polyQ-Bereiche erkennt (Abb.3-5b, (Poirier et al., 2002)), weist auf eine veränderte Konformation des verlängerten polyQ-Bereichs im Vergleich zum normalen polyQ-Bereich hin. Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Daten aus unserer Arbeitsgruppe bestätigen diese postulierte polyQ-Konformationsänderung, die bei PP-Spaltung des Fusionsproteins GST-Htt-Exon1 beobachtet wurde, und die eine Aggregation des Htt-Exon1 nach sich zog (Schaffar et al., 2004).

In der vorliegenden Studie wurde eine Konformationsänderung des rekrutierten AT3Q22 gezeigt, welche durch Koaggregation mit dem pathologischen AT3-Fragment 257cQ71 ausgelöst wurde (siehe 3.4.2). Die kinetische Analyse der Koaggregation von 257cQ71 mit AT3Q22 *in vitro* zeigt eine effiziente Rekrutierung von AT3Q22 in frühe SDS-lösliche Aggregationsintermediate, deren Menge während der ersten zwei Stunden der Aggregationsreaktion relativ konstant bleibt, und die sich mit fortschreitender Reaktion in SDS-resistente Koaggregate umwandeln (Abb.3-17 a+c, 3-15a). Der beobachtete Zeitrahmen der AT3Q22-Konformationsänderung von etwa einer Stunde und der Bildung von frühen Koaggregationsintermediaten von zwei Stunden entspricht der *Lag*-Phase der SDS-resistenten Fibrillisation von 257cQ71 (Abb.3-2d). Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß einer effizienten Koaggregation von AT3Q22 mit 257cQ71-Fragmenten eine Strukturänderung des AT3Q22-Proteins und eine Bildung von SDS-löslichen Aggregationsintermediaten vorausgeht (Abb.4-1).

Das Ausmaß der Koaggregation von AT3Q22 mit 186cQ71, welches SDS-resistente Oligomere bildet (Abb.3-3), ist im Vergleich zu 257cQ71 deutlich verringert (Abb.3-17d), was zeigt, daß mit zunehmender Verkürzung des 71Q-Fragments nicht nur dessen Aggregations- sondern auch dessen Rekrutierungsfähigkeit zunimmt. Interessanterweise zeigen sich bei der Koaggregation von AT3Q22 mit 186cQ71 keine SDS-löslichen Aggregationsintermediate, was auf einen anderen Aggregationsmechanismus hindeutet.

4.3.4 Ein partieller Funktionsverlust des Wildtyp-Ataxin3 könnte zur Erkrankung in heterozygoten SCA3-Patienten beitragen

Da in heterozygoten SCA3-Patienten sowohl ein Wildtyp-AT3-Allel als auch ein pathogenes AT3-Allel mit verlängertem polyQ-Bereich vorliegt, wurde in Neuroblastomazellen der Effekt des 257cQ71-Fragments auf AT3Q22 untersucht. Die Koexpression beider Proteine

Diskussion

resultiert in einer Verringerung der SDS-löslichen AT3Q22-Menge in der Zelle auf etwa die Hälfte (Abb.3-20b). Es ist jedoch unklar, ob diese Reduktion der AT3Q22-Konzentration ausschließlich durch eine sehr effiziente Koaggregation mit 257cQ71 oder auch durch eine von 257cQ71-induzierte Konformationsänderung und durch proteasomalen Abbau des fehlgefalteten AT3Q22 hervorgerufen wird (Abb.4-1). Der Abbau von in Zellkultur exprimiertem AT3 durch Proteasomen wurde kürzlich gezeigt (Shoesmith Berke et al., 2005). Die beobachtete Reduktion von SDS-löslichem AT3Q22 in der Zelle ist spezifisch für das Fragment mit pathologischer polyQ-Länge (siehe Abb.3-20c) und sollte in partiellem AT3-Funktionsverlust resultieren.

In annähernd allen dominanten humanen Erkrankungen findet man schwerwiegendere Symptome bei Homozygoten als bei Heterozyten (Zlotogora, 1997). Dies trifft auch auf die SCA3 zu, die bei Homozygoten außerdem in einem früheren Alter ausbricht (Takiyama et al., 1995; Lerer et al., 1996; Sobue et al., 1996). Für die Huntington-Erkrankung (HD) konnte kein Unterschied zwischen homozygoten und heterozygoten Patienten festgestellt werden (Wexler et al., 1987; Zlotogora, 1997) bzw. Homozygote zeigten bei unverändertem Alter bei Erkrankungsbeginn schwerwiegendere Symptome (Squitieri et al., 2003). Darüber hinaus konnte bei der SCA3 eine negative Korrelation der polyQ-Länge des Wildtyp-AT3 mit dem Alter bei Erkrankungsbeginn festgestellt werden (Durr et al., 1996).

Die Beobachtung, daß Homozygote stärker betroffen sind als Heterozyte läßt sich durch die erhöhte Konzentration von AT3 mit verlängertem polyQ-Bereich in der Zelle erklären, was zu einer früheren Nukleation und damit zu einem früherem Beginn der Aggregation (siehe 1.1.2 und 1.4) sowie zu einer verstärkten Koaggregation mit anderen Proteinen und deren Inaktivierung (siehe 1.1.3) führt. Der Umstand, daß mit zunehmender polyQ-Länge des Wildtyp-AT3 die Erkrankung früher beginnt, läßt sich durch die hier dargestellten experimentellen Resultate erklären, die zeigen, daß ein Vollängenprotein mit zunehmender polyQ-Länge stärker in Aggregate hineingezogen wird (Abb.3-15b, 3-18b, 3-19b) und damit verstärkt der Zelle entzogen wird. Die Koaggregation des Wildtyp-AT3 mit 71Q-Fragmenten resultiert in einer Verringerung der AT3-Konzentration in der Zelle (Abb.3-20b), was zu einem partiellen Funktionsverlust führen sollte. Dies läßt vermuten, daß die SCA3 sowohl durch eine neue toxische Funktion (*gain-of-function*) als auch durch einen Funktionsverlust hervorgerufen wird (Abb.4-1). Ähnliches wurde bereits für die SBMA berichtet, bei der die polyQ-Verlängerung im Androgen Rezeptor (AR) zu einem Phänotyp führt, der neurodegenerative Symptome (Funktionsgewinn) sowie verringerte Fertilität und eine

Vergrößerung der Brust (abgeschwächte Symptome der testikulären Femininisierung = teilweiser AR-Funktionsverlust) beinhaltet (Orr, 2001).

4.4 Modulation der Ataxin3-Aggregation durch molekulare Chaperone

4.4.1 Die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp40 inhibieren die SDS-resistente Ataxin3-Aggregation

Da bereits mehrere Hinweise auf die Inhibition der polyQ-Aggregation durch die molekularen Chaperone Hsp70/40 vorliegen (siehe 1.2.2), wurden in dieser Arbeit die Effekte verschiedener Hsp70/40-Proteine auf die Aggregation von AT3 *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die gereinigten *E. coli*-Chaperone DnaK und DnaJ (Hsp70 und Hsp40) inhibieren die SDS-resistente Aggregation von 257cQ71 *in vitro* (Abb.3-7a) genauso wie die von Htt-Exon1-53Q (Muchowski et al., 2000). Eine 257cQ71-Aggregationshemmung wird ebenso durch die gereinigten Säugetier-Homologe Hsc/Hsp70 und Hdj1/2 (Hsp40) *in vitro* hervorgerufen (Abb.3-7b, 3-8), was ebenfalls mit den Daten für Htt-Exon1-53Q übereinstimmt (Muchowski et al., 2000). Die Säugetier-Chaperone Hsp70 und Hdj1 haben jeweils alleine fast keinen Effekt auf die Aggregation von 257cQ71 (Abb.3-7b, 3-8b), sondern benötigen zur Inhibition der Aggregation den entsprechenden Hsp40 bzw. Hsp70-Partner. Im Gegensatz dazu inhibieren die Hsp40-Chaperone Hdj2 und DnaJ die Aggregation auch ohne Hsp70-Zugabe (Abb.3-7a, 3-8a), was durch das Vorhandensein von Glycin/Phenylalanin-reichen Regionen und Cystein-reichen Zink-Finger-Domänen, die in Hdj1 fehlen, erklärt werden kann (siehe 1.2.1, (Cheetham and Caplan, 1998)). Der Effekt von Hsp70/Hdj1 auf die 257cQ71-Aggregation ist mit dem von Hsp70/Hdj2 vergleichbar (Abb.3-8 c-d). Unter Bedingungen des *Macromolecular Crowding*, die mittels Volumenausschlußeffekt die hohe Makromolekül-Konzentration in Zellen simulieren, wurde eine Inhibition der *in vitro*-Aggregation durch Hsp70/Hdj1 festgestellt (Abb.3-10b). Die Tatsache, daß AT3Q71 bei Ficoll-70- und Chaperon-Zugabe *in vitro* nur geringfügig aggregiert, entspricht den *in vivo*-Beobachtungen mit Neuroblastomazellen, in denen AT3Q71 ebenfalls nur schwach aggregiert (Abb.3-25b). Man kann also davon ausgehen, daß im zellulären Milieu der aggregationsverstärkende Effekt des *Macromolecular Crowding* durch das Vorhandensein molekularer Chaperone abgeschwächt wird.

In Neuroblastomazellen führt die Koexpression von Hsp70 bzw. Hdj1 mit 257cQ71 zu einer effizienten Reduktion der SDS-resistenten 257cQ71-Aggregation im Filtertest (~20% bzw.

8%; Abb.3-11a). Ein ähnlicher, jedoch schwächerer Effekt wurde bereits für Htt-Exon1-51Q beschrieben (~60% bzw. 70%; (Sittler et al., 2001)). Im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten hemmt demnach *in vivo* die alleinige Hsp70- oder Hdj1-Überexpression die Aggregation des AT3-Fragments, was möglicherweise durch das Vorhandensein anderer Ko-/Chaperone in der Zelle erklärt werden kann. Außerdem zeigen diese Daten, daß sowohl ein Hsp70- als auch Hsp40-Überschuß eine Verringerung der Aggregation hervorrufen kann. Die gemeinsame Überexpression von Hsp70 und Hdj1 führt zu einer weiteren Reduktion der Aggregation von 257cQ71 bzw. Htt-Exon1-51Q (Abb.3-11 a+c), was darauf hinweist, daß der beobachtete Effekt nicht spezifisch für bestimmte polyQ-Proteine ist (siehe 1.2.2). Es ist daher nicht anzunehmen, daß die Hsp70/40-Chaperone bestimmte Sequenzen der verschiedenen polyQ-Proteine außerhalb des polyQ-Bereichs erkennen und binden (vergleiche mit p97: siehe 4.4.4). Die Interaktion von polyQ-Proteinen mit Hsp70 läßt sich durch die Tatsache, daß Proteine mit verlängertem polyQ-Bereich fehlgefaltet sind, und die Tatsache, daß Hsp70 vorwiegend entfaltete Proteinbereiche mit exponierten hydrophoben Sequenzen bindet (Fourie et al., 1994), erklären. Bindungsanalysen mit gereinigtem GST-257cQn und Hsp70 zeigen jedoch, daß die Hsp70-Bindung *in vitro* nicht polyQ-abhängig ist (Δ Q, 22Q, 71Q; Abb.3-9b) und stimmen mit der polyQ-unabhängigen Hsp70-Bindung durch Htt-Exon1 (20Q, 53Q; (Schaffar, 2004)) überein. Auch für die Hsp70-Bindung der Vollängenproteine AT3Qn wurde keine polyQ-Abhängigkeit und kein Unterschied im Vergleich zu den Fragmenten 257cQn detektiert (Daten nicht gezeigt). Die Überexpression des konstitutiv aktiven Hitzeschockfaktors Δ Hsf1, der die Expression sämtlicher Hitzeschockproteine unter Kontrolle des Hitze-Schock-Elements induzieren soll, zeigt dieselbe Inhibition der 257cQ71-Aggregation wie eine Hsp70/Hdj1-Überexpression (Abb.3-11b).

4.4.2 Die molekularen Chaperone Hsp70 und Hsp40 fördern die SDS-lösliche Aggregation nicht sondern verstärken den proteasomalen Ataxin3-Abbau

In Hefen und in *Drosophila melanogaster* beobachtete man bei Überexpression von molekularen Chaperonen eine Umwandlung von SDS-resistenten Aggregaten in SDS-lösliche Aggregate (Muchowski et al., 2000; Chan et al., 2000; Warrick et al., 1999; Kazemi-Esfarjani and Benzer, 2000), wohingegen in Zellkultur-Studien mit Säugerzellen diese Veränderung der biochemischen Eigenschaften nicht detektiert, sondern die Totalaggregation von Ataxin1, AT3, AR und Htt gehemmt wurde (Cummings et al., 1998; Chai et al., 1999a; Stenoien et al.,

Diskussion

1999; Jana et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Sittler et al., 2001; Bailey et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit entspricht die bisher beobachtete Inhibition der SDS-resistenten Aggregation *in vitro* durch Hsp70/Hdj1 einer Erhöhung der Monomer- bzw. Oligomerkonzentrationen, jedoch keiner Verstärkung der SDS-löslichen Aggregation (Abb.3-9a links). Die Hsp70/Hdj1-Überexpression in N2a-Zellen resultiert ebenso in einer Verringerung der Totalaggregation, welche in Form von 257cQ71-Proteinablagerungen (Immunfluoreszenz-Mikroskopie) detektiert wurde. Diese zellulären Einschlüsse verschwinden bei Chaperon-Überexpression in den meisten Zellen, und bei Inkubation der Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG132 läßt sich eine diffuse zelluläre 257cQ71-Lokalisation detektieren (Abb.3-12d). Dies legt nahe, daß die Hsp70/40-Chaperone das AT3-Fragment 257cQ71 einerseits in Form von Monomeren oder Oligomeren (Mikroaggregaten) löslich halten, und andererseits dessen Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System verstärken. Ein verstärkter proteasomaler Abbau von 257cQ71 bei Hsp70/Hdj1-Überexpression wurde mittels Western Blot Analyse bestätigt, wobei MG132-Zugabe zu einer Stabilisierung von 257cQ71 führt (Abb.3-12a). Darüber hinaus läßt sich eine verstärkte proteasomale Degradation von Htt-51Q bei Hsp70/Hdj1-Überexpression bzw. von 257cQ71 bei Δ HSF1-Überexpression beobachten (Abb.3-12 b-c). Der Abbau von AT3 durch Proteasomen wurde kürzlich in *pulse-chase*-Experimenten gezeigt, wobei kein Unterschied im Abbau von SDS-löslichem AT3Q28 und AT3Q84 detektiert wurde (Shoosmith Berke et al., 2005). Ein verstärkter Abbau von polyQ-Proteinen bei Chaperon-Überexpression durch das Ubiquitin-Proteasom-System wurde bereits vorgeschlagen (Wanker, 2000; Sakahira et al., 2002) und konnte für AR-Fragmente (Bailey et al., 2002) und in dieser Arbeit für Htt-Exon1 und AT3-Fragmente (Abb.3-12 a-c) gezeigt werden. Bailey und Kollegen stellten bei Hsp70/40-Überexpression eine Halbierung der Halbwertszeit des AR-Fragments fest. Da eine Assoziation von molekularen Chaperonen wie Hsc/Hsp70 mit dem Proteasom bekannt ist (siehe 1.2.1), lassen sich diese experimentellen Resultate durch die Verbindung zwischen Chaperon-vermittelter Proteinfaltung und proteasomalem Proteinabbau erklären. Neueste Untersuchungen deuten auf einen proteasomalen Abbau von polyQ-Proteinen hin, welcher durch Hsc70 und das Chaperon CHIP, das ubiquitinylierende Aktivität zeigt, vermittelt wird (Jana et al., 2005). Andere Autoren berichten, daß eine verstärkte proteasomale Degradation eines AT3(Q79)-Fragments durch Überexpression des *Ubiquitin chain assembly*-Faktors E4B die polyQ-induzierte Augendegeneration in *Drosophila* inhibiert (Matsumoto et al., 2004).

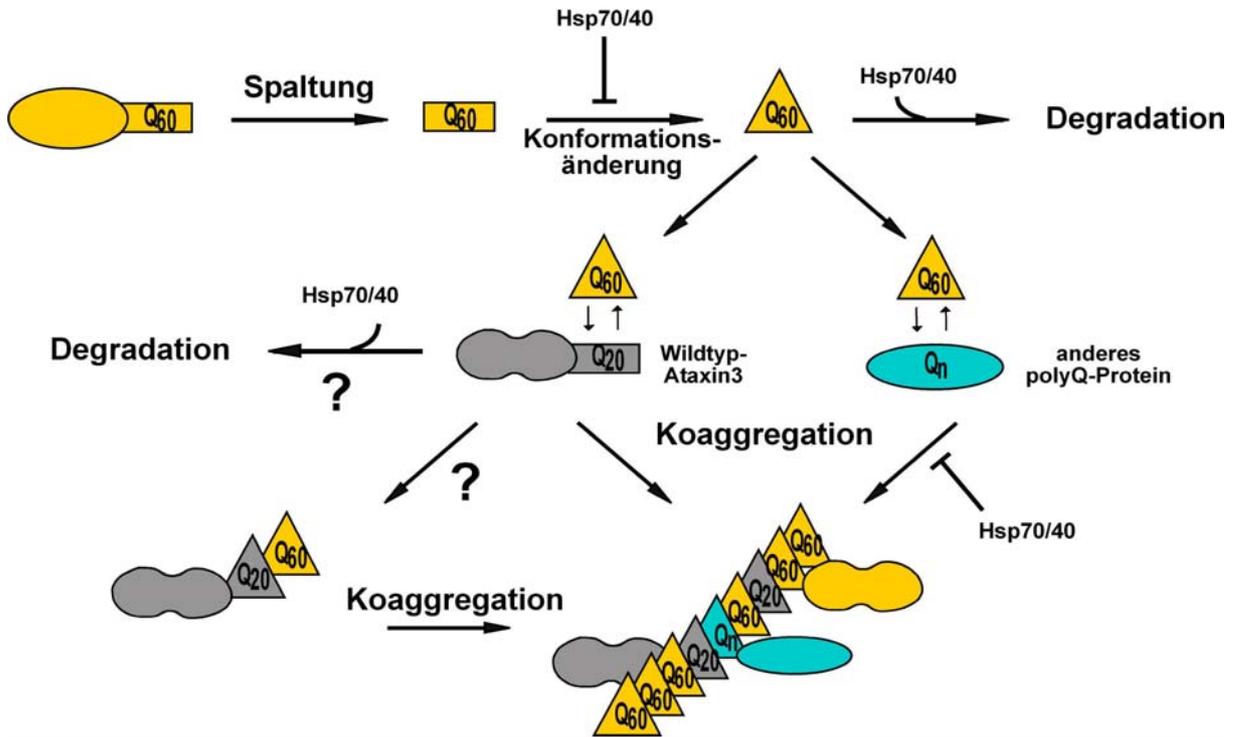


Abbildung 4-1: Modell der SCA3-Pathogenese mit Aggregation von pathologischem AT3 (Q₆₀) sowie Koaggregation und Inaktivierung von Wildtyp-AT3 (Q₂₀) und anderen polyQ-Proteinen (Q_n).

Die proteolytische Spaltung von AT3, welches aus einer globulären Josephin-Domäne und einem unstrukturierten C-terminalen Bereich besteht (Masino et al., 2003), resultiert in einer Bildung von polyQ-enthaltenden C-terminalen Fragmenten, die zufällig verknäuelte (*random coil*) sein sollen (Masino et al., 2002). Pathologische AT3-Fragmente mit verlängertem polyQ-Bereich machen einem Konformationswechsel durch (Schaffar et al., 2004) und nehmen eine beta-Faltblatt-Struktur an, welche als Aggregationsnukleus (*seed*) dient (siehe 1.1.2 und (Wanker, 2000; Rochet and Lansbury, 2000; Temussi et al., 2003; Ross et al., 2003)). Die Aggregation von pathologischen polyQ-Fragmenten führt schließlich zur Bildung von zellulären Proteinablagerungen (Einschlüssen). Die in ihrer Konformation veränderten pathologischen polyQ-Fragmente interagieren via polyQ-Bereich mit anderen polyQ-Proteinen, deren polyQ-Länge nicht pathologisch ist, wie z.B. mit Wildtyp-AT3 oder den Transkriptionsfaktoren TBP und CBP. Diese pathologischen Wechselwirkungen werden als Krankheitsursache angesehen und sollen z.B. zu transkriptioneller Dysregulation führen (siehe 1.1.3). Man geht von einer Entfaltung und Inaktivierung der interagierenden polyQ-Proteine aus, sowie letztendlich von Koaggregation und möglicherweise einem verstärkten proteasomalen Abbau. Verringerte zelluläre Konzentrationen des aktiven Wildtyp-AT3 sollen zu einem partiellen Funktionsverlust führen und damit zur SCA3-Pathogenese beitragen. Die molekularen Chaperone Hsp70/40 unterdrücken die Pathogenese, indem sie den Konformationswechsel der polyQ-Fragmente nach ihrer Abspaltung vom Volllängenprotein inhibieren (Schaffar et al., 2004), dadurch die Aggregation und damit Koaggregation von anderen zellulären Proteinen hemmen (siehe 1.2.2) und den Abbau (Degradation) der polyQ-Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System verstärken.

4.4.3 Expression molekularer Chaperone als möglicher Therapieansatz bei polyQ-Erkrankungen

Die molekularen Chaperone Hsp70/40 verursachen demnach einerseits eine Aggregationsreduktion, was in verringerter Koaggregation anderer zellulärer Faktoren resultiert, und andererseits eine Verstärkung des polyQ-Protein-Abbaus, was das Ausmaß des toxischen Funktionsgewinns (*gain of function*) verringern sollte (Abb.4-1). Wie bei

konditionalen transgenen Mäusen gezeigt wurde, ist ein neuropathologischer Phänotyp und dessen Progression abhängig vom Vorkommen des polyQ-Proteins in der Zelle. Eine Inhibition der Transgen-Expression konnte das Fortschreiten der Erkrankung verhindern und schon vorhandene Symptome teilweise rückgängig machen (Yamamoto et al., 2000). Beim Menschen könnte ein verstärkter proteasomaler Abbau der konstitutiv exprimierten polyQ-Proteine in einem ähnlichen Effekt resultieren. Es wird angenommen, daß die Chaperon-Kapazität für Jahrzehnte ausreicht, um die Aggregation und Toxizität von polyQ-Proteinen im menschlichen Gehirn zu unterdrücken, daß sie jedoch mit zunehmendem Alter verringert wird, was einer der Gründe für das Ausbrechen der polyQ-Erkrankungen sein könnte (siehe 1.4). Daher kann die Induktion von Chaperonen als möglicher Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen bei polyQ-Erkrankungen diskutiert werden.

4.4.4 Konzentrationsabhängige Verstärkung der Ataxin3-Aggregation durch p97 *in vitro*

Im Gegensatz zur Inhibition der AT3-Aggregation durch Hsp70/40 ist das AAA-Protein p97 (VCP, siehe 1.2.1 und 3.3) in der Lage, in substöchiometrischen bis äquimolaren Konzentrationen die 242cQ71-Aggregation bis 5-fach zu verstärken (Abb.3-14b), wobei die Aggregationsausbeute erhöht wird (Abb.3-13b). Dies trifft auf 257cQ71 nicht zu, stattdessen wird die 257cQ71-Aggregation durch p97 beschleunigt (Abb.3-13a). Vermutlich werden auch ohne p97-Zugabe sämtliche 257cQ71-Monomere in fibrilläre Aggregate umgewandelt, weshalb p97 die Aggregationsausbeute nicht erhöhen kann. Das Fragment 242cQ71, das nur 20% der Aggregation von 257cQ71 erreicht (Abb.3-2c), könnte durch p97 dazu gebracht werden, ebenfalls vollständig zu aggregieren, wodurch die Ausbeute erhöht wird. Der p97-Effekt auf 242cQ71 ist konzentrationsabhängig, denn im Gegensatz zu den substöchiometrischen bis äquimolaren p97-Konzentrationen verstärkt ein 3- bis 4-facher p97-Überschuß die 242cQ71-Aggregation nicht (Abb.3-14b). Die Kontroll-Chaperone GroEL (*single ring*) und Hsp104 haben in allen eingesetzten Konzentrationen keinen Effekt auf die 242cQ71-Aggregation (Abb.3-14b), weshalb der p97-Effekt als spezifisch angesehen werden kann. Interessanterweise zeigt p97 keinen Effekt auf die Aggregation von Htt-Exon1-51Q, wohingegen Hsp104, welches keinen Effekt auf die 242cQ71-Aggregation hat, die Aggregation von Htt-Exon1-51Q verstärkt (siehe 3.3.2). Die gezeigten Daten weisen daher darauf hin, daß es sich bei den beiden hexameren AAA-Proteinen p97 und Hsp104 nicht um

Diskussion

polyQ-interagierende Proteine handelt, und deshalb auch keine generelle Modulation der polyQ-Aggregation und polyQ-Pathogenese wie durch Hsp70/40 zu erwarten ist.

Zahlreiche Autoren stellten fest, daß p97 Multiproteinkomplexe mit verschiedenen Adaptor-Proteinen wie z.B. mit dem Heterodimer Ufd1-Npl4 oder mit p47-Homotrimeren bilden kann, und daß diese Adaptoren die Rolle von p97 im jeweiligen zellulären Prozeß bestimmen (Reviews: (Wang et al., 2004; Dreveny et al., 2004; Woodman, 2003)). In den hier gezeigten Experimenten wurde das p97-Hexamer jedoch ohne jegliche Adaptoren eingesetzt, weshalb ungeklärt bleibt, welchen Einfluß p97 in Verbindung mit seinen Kofaktoren auf die AT3-Aggregation ausüben würde.

Die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit des p97-Effekts auf 242cQ71 (Abb.3-14b) ähnelt den Auswirkungen des Chaperons Hsp104 auf polyQ-Proteine und Sup35 (siehe 1.2.2), wobei die Hsp104-Deletion in einer deutlichen, und die Hsp104-Überexpression in einer leichten Hemmung der polyQ-Aggregation in Hefe resultiert (Krobitsch and Lindquist, 2000; Meriin et al., 2002; Kimura et al., 2001). Sowohl die Überexpression als auch die Deletion von Hsp104 eliminieren den [PSI⁺]-Prionzustand und machen den Glutamin-/ Asparaginreichen Translationsterminationsfaktor Sup35 löslich (Lindquist, 1997; Chernoff et al., 1995; Patino et al., 1996). *In vitro* beschleunigen geringe Mengen von Hsp104 (1:100) die Sup35-Aggregation, größere Mengen (1:10) inhibieren sie jedoch (Shorter and Lindquist, 2004). Die Aggregationsinduktion durch Hsp104 ist unabhängig von einer ATP-Hydrolyse (Shorter and Lindquist, 2004), was auf den in dieser Arbeit beobachteten Effekt durch p97 ebenfalls zutrifft (siehe 3.3.1). Da Hsp104 sowohl Proteine entfalten als auch Aggregate auflösen kann, geht man davon aus, daß Hsp104 in intermediären Konzentrationen Sup35- bzw. polyQ-Proteine entfaltet und dadurch deren Aggregation verstärkt, und daß eine geringfügige Disaggregation von bestehenden Aggregaten zur Entstehung von neuen Aggregationskeimen beiträgt. Bei einem Hsp104-Überschuß überwiegt dessen Disaggregationsfähigkeit, so daß keine fibrillären Aggregate zustande kommen können. Für p97 könnte ein ähnlicher Mechanismus existieren, andererseits könnte jedoch auch eine geringe p97-Konzentration die Bindung von maximal 6 AT3-Monomeren an ein p97-Hexamer hervorrufen, was die lokale AT3-Konzentration erhöhen und so die Aggregation begünstigen würde. Bei einem Überschuß von p97-Hexameren würden nur selten mehrere AT3-Monomere an ein p97-Hexamer gebunden, weshalb man keinen Effekt auf die Aggregation erwartet. Da im Rahmen dieser Arbeit keine *in vivo*-Experimente mit p97-Überexpression oder Reduktion (z.B. mittels *RNA interference*) durchgeführt wurden, lassen sich keine weiteren Schlüsse in Bezug auf die AT3-Aggregation ziehen. Andere Autoren berichten jedoch über Tierexperimente mit

Caenorhabditis elegans, wo die Koexpression zweier *C. elegans* - p97 - Homologe die Aggregation von GFP-polyQ in Muskelzellen unterdrückte (Yamanaka et al., 2004), und die Hsp104-Koexpression die Aggregation und die polyQ-induzierte Entwicklungsverzögerung reduzierte (Satyal et al., 2000).

4.5 Ausblick

In der hier vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Aspekte der polyQ-Erkrankung SCA3 *in vitro* und in Zellkultur untersucht. Die proteolytische Spaltung des Ataxin3 (AT3)-Volllängenproteins, die als eine Voraussetzung für Aggregation und Pathogenese angesehen wird, sowie die Koaggregation von intaktem Wildtyp-AT3, die zu einer verringerten AT3-Konzentration in der Zelle führt, waren Themen der vorliegenden Arbeit. Außerdem wurde der Einfluß von molekularen Chaperonen auf die AT3-Aggregation und letztendlich der Einfluß der zellulären Lokalisation auf die AT3-Aggregation untersucht. Die experimentellen Resultate dieser Arbeit und die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse wurden in einem Modell der SCA3-Pathogenese zusammengefaßt (Abb.4-1).

Da für die neurodegenerativen Amyloid-Erkrankungen unterschiedliche Toxizitätsmechanismen postuliert wurden, könnten mehrere Möglichkeiten existieren, wie präventiv oder therapeutisch in den Krankheitsverlauf eingegriffen werden kann. Ein wichtiger Ansatzpunkt scheint die Inhibition der Konformationsänderung der amyloidogenen Proteine zu sein, womit einerseits eine Nukleation der Aggregation (siehe 1.1.2) und andererseits eine dominant-negative Interaktion mit anderen Proteinen (siehe 1.1.3) verhindert würde (Abb.4-1). Dies könnte z.B. durch Substanzen wie Kongorot, dessen Derivate oder Benzothiazol-Derivate wie Riluzol geschehen (Heiser et al., 2000; Sanchez et al., 2003; Gestwicki et al., 2004; Heiser et al., 2002), durch *chemical chaperones* (Tatzelt et al., 1996; Yoshida et al., 2002), durch spezifische Liganden („Suppressor“-Peptide) für die jeweiligen pathologischen Proteine (Miroy et al., 1996; Lecerf et al., 2001; Chiti et al., 2001; Kazantsev et al., 2002; Nagai et al., 2003) oder durch Induktion von molekularen Chaperonen durch z.B. Geldanamycin (Schaffar et al., 2004; Dou et al., 2003).

Bei der Alzheimer-Erkrankung und verschiedenen polyQ-Krankheiten (HD, SCA3 und evtl. anderen) sollte eine Hemmung der proteolytischen Spaltung der polyQ-Volllängenproteine bzw. des APP (*amyloid precursor protein*) mit spezifischen Protease-Inhibitoren die eben besprochene Konformationsänderung verhindern (siehe 1.3.1, Abb.4-1). Beispielsweise ist bekannt, daß Mutationen in den Protease-Untereinheiten Presenilin-1/-2 bzw. eine verstärkte

Diskussion

Expression der Protease BACE-1 in familiärer und sporadischer Alzheimer-Erkrankung resultieren. Die Möglichkeit von Mutationen in Proteasen, die zu einer verstärkten Htt- bzw. AT3-Spaltung führen, ist daher zu bedenken.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Stimulation des natürlichen Abbaus der polyQ-Proteine durch das Ubiquitin-Proteasom-System durch z.B. die Induktion von molekularen Chaperonen (siehe 4.4.2 - 4.4.3; beispielsweise durch Geldanamycin (Sittler et al., 2001)) oder evtl. durch Induktion des *Ubiquitin chain assembly*-Faktors E4B (Matsumoto et al., 2004) (Abb.4-1).

Da für polyQ-Proteine wie Htt und Ataxin1 eine Abhängigkeit der Toxizität von der zellulären Lokalisation vorgeschlagen wurde (siehe 3.5), könnte man den Transport der polyQ-Proteine in den Zellkern verhindern und somit deren Pathogenese reduzieren, was jedoch nicht für AT3 zu gelten scheint (siehe 4.1.4).

Eine weiterer Therapie-Ansatzpunkt wäre, gezielt die Expression des mutierten Allels zu reduzieren, was durch *RNA interference* (Li et al., 2004; Harper et al., 2005) durch beispielsweise die Injektion von viralen Vektoren ins Gehirn möglich wäre (Ross and Poirier, 2004; Caplen, 2004). Eine ähnliche Strategie ist eine Gentherapie (gezielter Nukleotidaustausch), welche die verlängerten polyQ-Bereiche durch Punktmutationen oder Stop-Codons unterbrechen (Parekh-Olmedo et al., 2002; Popiel et al., 2004) oder stabilisierende Punktmutationen in Transthyretin und im Prionprotein einfügen würde (Soto, 2003).

Eine Immunisierung (Impfung) kommt nur bei extrazellulären Aggregaten wie Amyloid-beta der Alzheimer-Erkrankung in Betracht, scheint dort jedoch recht erfolgsversprechend (Schenk et al., 1999; Morgan et al., 2000; Hock et al., 2003).

Letztendlich sollte auch eine Hemmung des apoptotischen Zellverlusts mit z.B. Caspase-Inhibitoren oder durch Chaperon-Überexpression (siehe 1.2.2; beispielsweise induziert durch MG132 (Lee and Goldberg, 1998; Volloch et al., 1998; Ona et al., 1999; Chen et al., 2000)) die Neurodegeneration von amyloiden Erkrankungen reduzieren.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die hier vorgeschlagenen präventiven Maßnahmen wie Gentherapie oder *RNA interference* weitere Experimente erfordern, um beim Menschen eingesetzt werden zu können. Da viele Chemikalien, die als Medikamente eingesetzt werden könnten, toxisch sind und/oder die Blut-Hirn-Schranke schlecht passieren, werden im Bereich der Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen ebenfalls weiterführende Experimente benötigt.

5. Zusammenfassung

Neurodegenerative Polyglutamin(polyQ)-Erkrankungen sind durch neuronalen Zellverlust und die Bildung von intrazellulären Proteinablagerungen (Aggregaten) charakterisiert, deren Rolle nicht exakt geklärt ist. Es wird jedoch davon ausgegangen, daß sie die Pathogenese reflektieren und untrennbar mit dem Erkrankungsprozeß verbunden sind. In dieser Arbeit wurde das polyQ-Protein Ataxin3 (AT3) untersucht, welches, wenn es einen verlängerten polyQ-Bereich besitzt, die Spinozerebellare Ataxie 3 (SCA3) hervorruft. Mit Hilfe von AT3-Deletionsmutanten wurde gezeigt, daß die Entfernung des N-Terminus von polyQ-verlängertem AT3 zu dessen Aggregation *in vitro*, in Hefe und in Neuroblastomazellen führt. Entsprechend löst die proteolytische Spaltung von pathologischem Vollängen-AT3 die SDS-resistente Aggregation *in vivo* aus. Hinweise auf die Calcium-abhängigen Calpaine als AT3-schneidende Proteasen wurden *in vitro* mit Säugetierzell-Lysaten erhalten. Gereinigtes Calpain II generiert mehrere AT3-Fragmente *in vitro*, einschließlich C-terminaler Fragmente, die den polyQ-Bereich enthalten. In Zellkultur resultiert die Aktivierung von Calpainen in einer verstärkten AT3-Proteolyse, während eine Inhibition von endogenem Calpain durch Calpeptin oder Calpastatin zu einer verringerten AT3-Spaltung und reduzierter Aggregation in Säugerzellen führt. Zusammenfassend unterstützen diese Daten die *toxic fragment*-Hypothese, die als Voraussetzung für Pathogenese und Aggregation von polyQ-Proteinen deren proteolytische Spaltung postuliert (siehe 1.3.1). Toxizität der polyQ-Proteine soll unter anderem aus der Rekrutierung von anderen zellulären Proteinen wie Transkriptionsfaktoren, Chaperonen, Ubiquitin und Proteasomen in die polyQ-Aggregate resultieren. Obwohl Wildtyp-AT3 nicht selbständig aggregiert, koaggregiert es mit polyQ-verlängertem AT3-Fragment, was mit einer verringerten AT3-Konzentration in der Zelle korreliert. Einer Konformationsänderung des Wildtyp-AT3, induziert von pathologischem polyQ, folgt *in vitro* eine Rekrutierung in frühe Aggregationsintermediate und letztendlich die Integration in stabile Koaggregate. Weitere Experimente zeigten, daß die Expression der molekularen Chaperone (Hitzeschockproteine) Hsp70 und Hsp40 zusammen mit polyQ-verlängertem AT3-Fragment die Aggregation vermindert und den proteasomalen AT3-Abbau *in vivo* verstärkt. Das Chaperon p97 (VCP) zeigt eine konzentrationsabhängige Modulation der Aggregation *in vitro*. Schließlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß eine Veränderung der zellulären Lokalisation durch Fusion von AT3-Konstrukten mit Kernlokalisations- und Kernexportsignalen keinen Einfluß auf die Aggregationsfähigkeit in Neuroblastomazellen hat. Das putative endogene Kernlokalisationssignal von AT3 mit der Sequenz RKRR (282-285) wurde nicht verifiziert.

6. Literatur

- Alba, M.M., Santibanez-Koref, M.F. and Hancock, J.M. (2001) The comparative genomics of polyglutamine repeats: extreme differences in the codon organization of repeat-encoding regions between mammals and *Drosophila*. *J Mol Evol*, **52**, 249-59.
- Albrecht, M., Golatta, M., Wullner, U. and Lengauer, T. (2004) Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3. *Eur J Biochem*, **271**, 3155-70.
- Albrecht, M., Hoffmann, D., Evert, B.O., Schmitt, I., Wullner, U. and Lengauer, T. (2003) Structural modeling of ataxin-3 reveals distant homology to adaptins. *Proteins*, **50**, 355-70.
- Andrew, S.E., Goldberg, Y.P. and Hayden, M.R. (1997) Rethinking genotype and phenotype correlations in polyglutamine expansion disorders. *Hum Mol Genet*, **6**, 2005-10.
- Arrasate, M., Mitra, S., Schweitzer, E.S., Segal, M.R. and Finkbeiner, S. (2004) Inclusion body formation reduces levels of mutant huntingtin and the risk of neuronal death. *Nature*, **431**, 805-10.
- Auluck, P.K., Chan, H.Y., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M. and Bonini, N.M. (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science*, **295**, 865-8. Epub 2001 Dec 20.
- Bailey, C.K., Andriola, I.F., Kampinga, H.H. and Merry, D.E. (2002) Molecular chaperones enhance the degradation of expanded polyglutamine repeat androgen receptor in a cellular model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **11**, 515-23.
- Barral, J.M., Broadley, S.A., Schaffar, G. and Hartl, F.U. (2004) Roles of molecular chaperones in protein misfolding diseases. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 17-29.
- Bartke, T., Pohl, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2004) Dual Role of BRUCE as an Antiapoptotic IAP and a Chimeric E2/E3 Ubiquitin Ligase. *Mol Cell*, **14**, 801-11.
- Bates, G. (2003) Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease. *Lancet*, **361**, 1642-4.
- Bates, G.P. (2005) History of genetic disease: The molecular genetics of Huntington disease - a history. *Nat Rev Genet*.
- Beere, H.M., Wolf, B.B., Cain, K., Mosser, D.D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R.I., Cohen, G.M. and Green, D.R. (2000) Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol*, **2**, 469-75.
- Bence, N.F., Sampat, R.M. and Kopito, R.R. (2001) Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, **292**, 1552-5.
- Berke, S.J., Schmied, F.A., Brunt, E.R., Ellerby, L.M. and Paulson, H.L. (2004) Caspase-mediated proteolysis of the polyglutamine disease protein ataxin-3. *J Neurochem*, **89**, 908-18.
- Bezprozvanny, I. and Hayden, M.R. (2004) Deranged neuronal calcium signaling and Huntington disease. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 1310-7.
- Bidere, N., Lorenzo, H.K., Carmona, S., Laforge, M., Harper, F., Dumont, C. and Senik, A. (2003) Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor (AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 31401-11. Epub 2003 Jun 2.
- Bonini, N.M. (1999) A genetic model for human polyglutamine-repeat disease in *Drosophila melanogaster*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1057-60.
- Bonini, N.M. (2002) Chaperoning brain degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **29**, 29.
- Bowman, A.B., Yoo, S.Y., Dantuma, N.P. and Zoghbi, H.Y. (2005) Neuronal dysfunction in a polyglutamine disease model occurs in the absence of ubiquitin-proteasome system

- impairment and inversely correlates with the degree of nuclear inclusion formation. *Hum Mol Genet*, **14**, 679-91. Epub 2005 Jan 20.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Brunk, U.T., Neuzil, J. and Eaton, J.W. (2001) Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep*, **6**, 91-7.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M. and Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature*, **416**, 507-11.
- Burnett, B., Li, F. and Pittman, R.N. (2003) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet*, **14**, 14.
- Burnett, B.G. and Pittman, R.N. (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4330-5. Epub 2005 Mar 14.
- Busch, A., Engemann, S., Lurz, R., Okazawa, H., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2003) Mutant huntingtin promotes the fibrillogenesis of wild-type huntingtin: a potential mechanism for loss of huntingtin function in Huntington's disease. *J Biol Chem*, **278**, 41452-61. Epub 2003 Jul 29.
- Butler, R., Leigh, P.N., McPhaul, M.J. and Gallo, J.M. (1998) Truncated forms of the androgen receptor are associated with polyglutamine expansion in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet*, **7**, 121-7.
- Caldwell, G.A., Cao, S., Sexton, E.G., Gelwix, C.C., Bevel, J.P. and Caldwell, K.A. (2003) Suppression of polyglutamine-induced protein aggregation in *Caenorhabditis elegans* by torsin proteins. *Hum Mol Genet*, **12**, 307-19.
- Caplen, N.J. (2004) RNAi quashes polyQ. *Nat Med*, **10**, 775-6.
- Cemal, C.K., Carroll, C.J., Lawrence, L., Lowrie, M.B., Ruddle, P., Al-Mahdawi, S., King, R.H., Pook, M.A., Huxley, C. and 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**, 1075-94.
- Cha, J.H., Kosinski, C.M., Kerner, J.A., Alsdorf, S.A., Mangiarini, L., Davies, S.W., Penney, J.B., Bates, G.P. and Young, A.B. (1998) Altered brain neurotransmitter receptors in transgenic mice expressing a portion of an abnormal human huntington disease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6480-5.
- Chai, Y., Berke, S.S., Cohen, R.E. and Paulson, H.L. (2004) Poly-ubiquitin binding by the polyglutamine disease protein ataxin-3 links its normal function to protein surveillance pathways. *J Biol Chem*, **279**, 3605-11. Epub 2003 Nov 5.
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Bonini, N.M. and Paulson, H.L. (1999a) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci*, **19**, 10338-47.
- Chai, Y., Koppenhafer, S.L., Shoesmith, S.J., Perez, M.K. and Paulson, H.L. (1999b) Evidence for proteasome involvement in polyglutamine disease: localization to nuclear inclusions in SCA3/MJD and suppression of polyglutamine aggregation in vitro. *Hum Mol Genet*, **8**, 673-82.
- Chai, Y., Shao, J., Miller, V.M., Williams, A. and Paulson, H.L. (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**, 9310-5.
- Chai, Y., Wu, L., Griffin, J.D. and Paulson, H.L. (2001) The role of protein composition in specifying nuclear inclusion formation in polyglutamine disease. *J Biol Chem*, **276**, 44889-97.

Literatur

- Chan, H.Y.E., Warrick, J.M., Gray-Board, G.L., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (2000) Mechanisms of chaperone suppression of polyglutamine disease: selectivity, synergy and modulation of protein solubility in *Drosophila*. *Human Molecular Genetics*, **9**, 2811-2820.
- Cheetham, M.E. and Caplan, A.J. (1998) Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, **3**, 28-36.
- Chen, M., Ona, V.O., Li, M., Ferrante, R.J., Fink, K.B., Zhu, S., Bian, J., Guo, L., Farrell, L.A., Hersch, S.M., Hobbs, W., Vonsattel, J.P., Cha, J.H. and Friedlander, R.M. (2000) Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease. *Nat Med*, **6**, 797-801.
- Chen, S., Berthelie, V., Hamilton, J.B., O'Nuallain, B. and Wetzel, R. (2002a) Amyloid-like features of polyglutamine aggregates and their assembly kinetics. *Biochemistry*, **41**, 7391-9.
- Chen, S., Ferrone, F.A. and Wetzel, R. (2002b) Huntington's disease age-of-onset linked to polyglutamine aggregation nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11884-9. Epub 2002 Aug 19.
- Chernoff, Y.O., Lindquist, S.L., Ono, B., Inge-Vechtomov, S.G. and Liebman, S.W. (1995) Role of the chaperone protein Hsp104 in propagation of the yeast prion-like factor [psi⁺]. *Science*, **268**, 880-4.
- Chiti, F., Taddei, N., Stefani, M., Dobson, C.M. and Ramponi, G. (2001) Reduction of the amyloidogenicity of a protein by specific binding of ligands to the native conformation. *Protein Sci*, **10**, 879-86.
- Chondrogianni, N., Fragoulis, E.G. and Gonos, E.S. (2002) Protein degradation during aging: the lysosome-, the calpain- and the proteasome-dependent cellular proteolytic systems. *Biogerontology*, **3**, 121-3.
- Chow, M.K., Mackay, J.P., Whisstock, J.C., Scanlon, M.J. and Bottomley, S.P. (2004) Structural and functional analysis of the Josephin domain of the polyglutamine protein ataxin-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **322**, 387-94.
- Chua, B.T., Guo, K. and Li, P. (2000) Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem*, **275**, 5131-5.
- Cooper, J.K., Schilling, G., Peters, M.F., Herring, W.J., Sharp, A.H., Kaminsky, Z., Masone, J., Khan, F.A., Delanoy, M., Borchelt, D.R., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (1998) Truncated N-terminal fragments of huntingtin with expanded glutamine repeats form nuclear and cytoplasmic aggregates in cell culture. *Hum Mol Genet*, **7**, 783-90.
- Cowan, K.J., Diamond, M.I. and Welch, W.J. (2003) Polyglutamine protein aggregation and toxicity are linked to the cellular stress response. *Hum Mol Genet*, **12**, 1377-91.
- Crocker, S.J., Smith, P.D., Jackson-Lewis, V., Lamba, W.R., Hayley, S.P., Grimm, E., Callaghan, S.M., Slack, R.S., Melloni, E., Przedborski, S., Robertson, G.S., Anisman, H., Merali, Z. and Park, D.S. (2003) Inhibition of calpains prevents neuronal and behavioral deficits in an MPTP mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, **23**, 4081-91.
- Cummings, C.J., Mancini, M.A., Antalffy, B., DeFranco, D.B., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet*, **19**, 148-54.
- Cummings, C.J., Sun, Y., Opal, P., Antalffy, B., Mestrlil, R., Orr, H.T., Dillmann, W.H. and Zoghbi, H.Y. (2001) Over-expression of inducible HSP70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice. *Hum Mol Genet*, **10**, 1511-8.
- De Pril, R., Fischer, D.F., Maat-Schieman, M.L., Hobo, B., De Vos, R.A., Brunt, E.R., Hol, E.M., Roos, R.A. and Van Leeuwen, F.W. (2004) Accumulation of aberrant ubiquitin

Literatur

- induces aggregate formation and cell death in polyglutamine diseases. *Hum Mol Genet*, **13**, 1803-13. Epub 2004 Jun 15.
- Dedeoglu, A., Kubilus, J.K., Jeitner, T.M., Matson, S.A., Bogdanov, M., Kowall, N.W., Matson, W.R., Cooper, A.J., Ratan, R.R., Beal, M.F., Hersch, S.M. and Ferrante, R.J. (2002) Therapeutic effects of cystamine in a murine model of Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 8942-50.
- DeLaBarre, B. and Brunger, A.T. (2003) Complete structure of p97/valosin-containing protein reveals communication between nucleotide domains. *Nat Struct Biol*, **10**, 856-63. Epub 2003 Aug 31.
- Diaz-Hernandez, M., Moreno-Herrero, F., Gomez-Ramos, P., Moran, M.A., Ferrer, I., Baro, A.M., Avila, J., Hernandez, F. and Lucas, J.J. (2004) Biochemical, ultrastructural, and reversibility studies on huntingtin filaments isolated from mouse and human brain. *J Neurosci*, **24**, 9361-71.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P. and Aronin, N. (1997) Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science*, **277**, 1990-3.
- Ding, Q. and Keller, J.N. (2003) Does proteasome inhibition play a role in mediating neuropathology and neuron death in Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis*, **5**, 241-5.
- Dobson, C.M. (2001) The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **356**, 133-45.
- Dobson, C.M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol*, **15**, 3-16.
- Donaldson, K.M., Li, W., Ching, K.A., Batalov, S., Tsai, C.C. and Joazeiro, C.A. (2003) Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **11**, 11.
- Doss-Pepe, E.W., Stenroos, E.S., Johnson, W.G. and 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**, 6469-83.
- Dou, F., Netzer, W.J., Tanemura, K., Li, F., Hartl, F.U., Takashima, A., Gouras, G.K., Greengard, P. and Xu, H. (2003) Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 721-6. Epub 2003 Jan 9.
- Dreveny, I., Pye, V.E., Beuron, F., Briggs, L.C., Isaacson, R.L., Matthews, S.J., McKeown, C., Yuan, X., Zhang, X. and Freemont, P.S. (2004) p97 and close encounters of every kind: a brief review. *Biochem Soc Trans*, **32**, 715-20.
- Dunah, A.W., Jeong, H., Griffin, A., Kim, Y.M., Standaert, D.G., Hersch, S.M., Mouradian, M.M., Young, A.B., Tanese, N. and Krainc, D. (2002) Sp1 and TAFII130 transcriptional activity disrupted in early Huntington's disease. *Science*, **296**, 2238-43.
- Durr, A., Stevanin, G., Cancel, G., Duyckaerts, C., Abbas, N., Didierjean, O., Chneiweiss, H., Benomar, A., Lyon-Caen, O., Julien, J., Serdaru, M., Penet, C., Agid, Y. and Brice, A. (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol*, **39**, 490-9.
- Ecker, D.J., Khan, M.I., Marsh, J., Butt, T.R. and Crooke, S.T. (1987) Chemical synthesis and expression of a cassette adapted ubiquitin gene. *J Biol Chem*, **262**, 3524-7.
- Ellerby, L.M., Andrusiak, R.L., Wellington, C.L., Hackam, A.S., Propp, S.S., Wood, J.D., Sharp, A.H., Margolis, R.L., Ross, C.A., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. and Bredesen, D.E. (1999a) Cleavage of atrophin-1 at caspase site aspartic acid 109 modulates cytotoxicity. *J Biol Chem*, **274**, 8730-6.
- Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Propp, S.S., Ellerby, H.M., Rabizadeh, S., Cashman, N.R., Trifiro, M.A., Pinsky, L., Wellington, C.L., Salvesen, G.S., Hayden, M.R. and

Literatur

- Bredesen, D.E. (1999b) Kennedy's disease: caspase cleavage of the androgen receptor is a crucial event in cytotoxicity. *J Neurochem*, **72**, 185-95.
- Ellis, R.J. (2001) Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci*, **26**, 597-604.
- Evert, B.O., Vogt, I.R., Vieira-Saecker, A.M., Ozimek, L., de Vos, R.A., Brunt, E.R., Klockgether, T. and Wullner, 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**, 1006-18.
- Evert, B.O., Wullner, U. and Klockgether, T. (2000) Cell death in polyglutamine diseases. *Cell Tissue Res*, **301**, 189-204.
- Evert, B.O., Wullner, U., Schulz, J.B., Weller, M., Groscurth, P., Trottier, Y., Brice, A. and 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**, 1169-76.
- Fandrich, M., Fletcher, M.A. and Dobson, C.M. (2001) Amyloid fibrils from muscle myoglobin. *Nature*, **410**, 165-6.
- Fernandez-Funez, P., Nino-Rosales, M.L., de Gouyon, B., She, W.C., Luchak, J.M., Martinez, P., Turiegano, E., Benito, J., Capovilla, M., Skinner, P.J., McCall, A., Canal, I., Orr, H.T., Zoghbi, H.Y. and Botas, J. (2000) Identification of genes that modify ataxin-1-induced neurodegeneration. *Nature*, **408**, 101-6.
- Ferrigno, P. and Silver, P.A. (2000) Polyglutamine expansions: proteolysis, chaperones, and the dangers of promiscuity. *Neuron*, **26**, 9-12.
- Foley, J.D., Rosenbaum, H. and Griep, A.E. (2004) Temporal regulation of VEID-7-amino-4-trifluoromethylcoumarin cleavage activity and caspase-6 correlates with organelle loss during lens development. *J Biol Chem*, **279**, 32142-50. Epub 2004 May 25.
- Fontana, A., de Laureto, P.P., Spolaore, B., Frare, E., Picotti, P. and Zamboni, M. (2004) Probing protein structure by limited proteolysis. *Acta Biochim Pol.*, **51**, 299-321.
- Fourie, A.M., Sambrook, J.F. and Gething, M.J. (1994) Common and divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones. *J Biol Chem*, **269**, 30470-8.
- Freiman, R.N. and Tjian, R. (2002) Neurodegeneration. A glutamine-rich trail leads to transcription factors. *Science*, **296**, 2149-50.
- Fujigasaki, H., Uchihara, T., Koyano, S., Iwabuchi, K., Yagishita, S., Makifuchi, T., Nakamura, A., Ishida, K., Toru, S., Hirai, S., Ishikawa, K., Tanabe, T. and Mizusawa, H. (2000) Ataxin-3 is translocated into the nucleus for the formation of intranuclear inclusions in normal and Machado-Joseph disease brains. *Exp Neurol*, **165**, 248-56.
- Gafni, J. and Ellerby, L.M. (2002) Calpain activation in Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 4842-9.
- Gafni, J., Hermel, E., Young, J.E., Wellington, C.L., Hayden, M.R. and Ellerby, L.M. (2004) Inhibition of calpain cleavage of huntingtin reduces toxicity: accumulation of calpain/caspase fragments in the nucleus. *J Biol Chem*, **279**, 20211-20. Epub 2004 Feb 23.
- Garden, G.A., Libby, R.T., Fu, Y.H., Kinoshita, Y., Huang, J., Possin, D.E., Smith, A.C., Martinez, R.A., Fine, G.C., Grote, S.K., Ware, C.B., Einum, D.D., Morrison, R.S., Ptacek, L.J., Sopher, B.L. and La Spada, A.R. (2002) Polyglutamine-expanded ataxin-7 promotes non-cell-autonomous purkinje cell degeneration and displays proteolytic cleavage in ataxic transgenic mice. *J Neurosci*, **22**, 4897-905.
- Gestwicki, J.E., Crabtree, G.R. and Graef, I.A. (2004) Harnessing chaperones to generate small-molecule inhibitors of amyloid beta aggregation. *Science*, **306**, 865-9.
- Gil-Parrado, S., Fernandez-Montalvan, A., Assfalg-Machleidt, I., Popp, O., Bestvater, F., Holloschi, A., Knoch, T.A., Auerswald, E.A., Welsh, K., Reed, J.C., Fritz, H., Fuentes-Prior, P., Spiess, E., Salvesen, G.S. and Machleidt, W. (2002) Ionomycin-

Literatur

- activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem*, **277**, 27217-26. Epub 2002 May 8.
- Goffredo, D., Rigamonti, D., Tartari, M., De Micheli, A., Verderio, C., Matteoli, M., Zuccato, C. and Cattaneo, E. (2002) Calcium-dependent cleavage of endogenous wild-type huntingtin in primary cortical neurons. *J Biol Chem*, **277**, 39594-8. Epub 2002 Aug 27.
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003) The calpain system. *Physiol Rev*, **83**, 731-801.
- Goti, D., Katzen, S.M., Mez, J., Kurtis, N., Kiluk, J., Ben-Haiem, L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Kakizuka, A., Sharp, A.H., Ross, C.A., Mouton, P.R. and Colomer, V. (2004) A mutant ataxin-3 putative-cleavage fragment in brains of Machado-Joseph disease patients and transgenic mice is cytotoxic above a critical concentration. *J Neurosci*, **24**, 10266-79.
- Goto, J., Watanabe, M., Ichikawa, Y., Yee, S.B., Ihara, N., Endo, K., Igarashi, S., Takiyama, Y., Gaspar, C., Maciel, P., Tsuji, S., Rouleau, G.A. and Kanazawa, I. (1997) Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res*, **28**, 373-7.
- Graham, J.M. and Sandall, J.K. (1979) Tissue-culture cell fractionation. Fractionation of membranes from tissue-culture cells homogenized by glycerol-induced lysis. *Biochem J*, **182**, 157-64.
- Guijarro, J.I., Sunde, M., Jones, J.A., Campbell, I.D. and Dobson, C.M. (1998) Amyloid fibril formation by an SH3 domain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 4224-8.
- Guttman, R.P., Sokol, S., Baker, D.L., Simpkins, K.L., Dong, Y. and Lynch, D.R. (2002) Proteolysis of the N-methyl-d-aspartate receptor by calpain in situ. *J Pharmacol Exp Ther*, **302**, 1023-30.
- Haass, C. (2004) Take five-BACE and the gamma-secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid beta-peptide generation. *EMBO J*, **23**, 483-8. Epub 2004 Jan 29.
- Hackam, A.S., Singaraja, R., Zhang, T., Gan, L. and Hayden, M.R. (1999) In vitro evidence for both the nucleus and cytoplasm as subcellular sites of pathogenesis in Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **8**, 25-33.
- Harper, S.Q., Staber, P.D., He, X., Eliason, S.L., Martins, I.H., Mao, Q., Yang, L., Kotin, R.M., Paulson, H.L. and Davidson, B.L. (2005) RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 5820-5. Epub 2005 Apr 5.
- Hartl, F.U. (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-9.
- Hartl, F.U. and Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, **295**, 1852-8.
- Hartley, D.M., Walsh, D.M., Ye, C.P., Diehl, T., Vasquez, S., Vassilev, P.M., Teplow, D.B. and Selkoe, D.J. (1999) Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*, **19**, 8876-84.
- Hazeki, N., Tukamoto, T., Goto, J. and Kanazawa, I. (2000) Formic acid dissolves aggregates of an N-terminal huntingtin fragment containing an expanded polyglutamine tract: applying to quantification of protein components of the aggregates. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**, 386-93.
- Heiser, V., Engemann, S., Brocker, W., Dunkel, I., Boeddrich, A., Waelter, S., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugardt, N., Rautenberg, S., Herhaus, C., Barnickel, G., Bottcher, H., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2002) Identification of benzothiazoles as potential polyglutamine aggregation inhibitors of Huntington's disease by using an automated filter retardation assay. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 16400-6. Epub 2002 Aug 28.

Literatur

- Heiser, V., Scherzinger, E., Boeddrich, A., Nordhoff, E., Lurz, R., Schugaradt, N., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (2000) Inhibition of huntingtin fibrillogenesis by specific antibodies and small molecules: implications for Huntington's disease therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 6739-44.
- Heydari, A.R., Takahashi, R., Gutschmann, A., You, S. and Richardson, A. (1994) Hsp70 and aging. *Experientia*, **50**, 1092-8.
- Hirabayashi, M., Inoue, K., Tanaka, K., Nakadate, K., Ohsawa, Y., Kamei, Y., Popiel, A.H., Sinohara, A., Iwamatsu, A., Kimura, Y., Uchiyama, Y., Hori, S. and Kakizuka, A. (2001) VCP/p97 in abnormal protein aggregates, cytoplasmic vacuoles, and cell death, phenotypes relevant to neurodegeneration. *Cell Death Differ*, **8**, 977-84.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbricht, D., de Quervain, D.J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. and Nitsch, R.M. (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease. *Neuron*, **38**, 547-54.
- Hodgson, J.G., Agopyan, N., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., LePiane, F., Singaraja, R., Smith, D.J., Bissada, N., McCutcheon, K., Nasir, J., Jamot, L., Li, X.J., Stevens, M.E., Rosemond, E., Roder, J.C., Phillips, A.G., Rubin, E.M., Hersch, S.M. and Hayden, M.R. (1999) A YAC mouse model for Huntington's disease with full-length mutant huntingtin, cytoplasmic toxicity, and selective striatal neurodegeneration. *Neuron*, **23**, 181-92.
- Horwich, A. (2002) Protein aggregation in disease: a role for folding intermediates forming specific multimeric interactions. *J Clin Invest*, **110**, 1221-32.
- Huang, Y. and Wang, K.K. (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol Med*, **7**, 355-62.
- Ichikawa, Y., Goto, J., Hattori, M., Toyoda, A., Ishii, K., Jeong, S.Y., Hashida, H., Masuda, N., Ogata, K., Kasai, F., Hirai, M., Maciel, P., Rouleau, G.A., Sakaki, Y. and Kanazawa, I. (2001) The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet.*, **46**, 413-22.
- Ikeda, H., Yamaguchi, M., Sugai, S., Aze, Y., Narumiya, S. and Kakizuka, A. (1996) Expanded polyglutamine in the Machado-Joseph disease protein induces cell death in vitro and in vivo. *Nat Genet*, **13**, 196-202.
- Jacobson, M.D., Weil, M. and Raff, M.C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**, 347-54.
- Jana, N.R., Dikshit, P., Goswami, A., Kotliarova, S., Murata, S., Tanaka, K. and Nukina, N. (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem*, **280**, 11635-40. Epub 2005 Jan 21.
- Jana, N.R., Tanaka, M., Wang, G. and Nukina, N. (2000) Polyglutamine length-dependent interaction of Hsp40 and Hsp70 family chaperones with truncated N-terminal huntingtin: their role in suppression of aggregation and cellular toxicity. *Hum Mol Genet*, **9**, 2009-18.
- Jefferies, W.A., Dickstein, D.L. and Ujiie, M. (2001) Assessing p97 as an Alzheimer's disease serum biomarker. *J Alzheimers Dis*, **3**, 339-344.
- Jimenez, J.L., Nettleton, E.J., Bouchard, M., Robinson, C.V., Dobson, C.M. and Saibil, H.R. (2002) The protofilament structure of insulin amyloid fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 9196-201. Epub 2002 Jul 1.
- Johansson, A.C., Steen, H., Ollinger, K. and Roberg, K. (2003) Cathepsin D mediates cytochrome c release and caspase activation in human fibroblast apoptosis induced by staurosporine. *Cell Death Differ*, **10**, 1253-9.
- Johnson, G.V. and Guttman, R.P. (1997) Calpains: intact and active? *Bioessays*, **19**, 1011-8.

- Kagedal, K., Zhao, M., Svensson, I. and Brunk, U.T. (2001) Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem J*, **359**, 335-43.
- Kahlem, P., Green, H. and Djian, P. (1998) Transglutaminase action imitates Huntington's disease: selective polymerization of Huntingtin containing expanded polyglutamine. *Mol Cell*, **1**, 595-601.
- Kahlem, P., Terre, C., Green, H. and Djian, P. (1996) Peptides containing glutamine repeats as substrates for transglutaminase-catalyzed cross-linking: relevance to diseases of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 14580-5.
- Kalchman, M.A., Graham, R.K., Xia, G., Koide, H.B., Hodgson, J.G., Graham, K.C., Goldberg, Y.P., Gietz, R.D., Pickart, C.M. and Hayden, M.R. (1996) Huntingtin is ubiquitinated and interacts with a specific ubiquitin-conjugating enzyme. *J Biol Chem*, **271**, 19385-94.
- Karlsson, J.O., Blennow, K., Janson, I., Blomgren, K., Karlsson, I., Regland, B., Wallin, A. and Gottfries, C.G. (1995) Increased proteolytic activity in lymphocytes from patients with early onset Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, **16**, 901-6.
- Katayama, T., Imaizumi, K., Manabe, T., Hitomi, J., Kudo, T. and Tohyama, M. (2004) Induction of neuronal death by ER stress in Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*, **28**, 67-78.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J.L., McIntire, T.M., Milton, S.C., Cotman, C.W. and Glabe, C.G. (2003) Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science*, **300**, 486-9.
- Kazantsev, A., Preisinger, E., Dranovsky, A., Goldgaber, D. and Housman, D. (1999) Insoluble detergent-resistant aggregates form between pathological and nonpathological lengths of polyglutamine in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 11404-9.
- Kazantsev, A., Walker, H.A., Slepko, N., Bear, J.E., Preisinger, E., Steffan, J.S., Zhu, Y.Z., Gertler, F.B., Housman, D.E., Marsh, J.L. and Thompson, L.M. (2002) A bivalent Huntingtin binding peptide suppresses polyglutamine aggregation and pathogenesis in *Drosophila*. *Nat Genet*, **30**, 367-76.
- Kazemi-Esfarjani, P. and Benzer, S. (2000) Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science*, **287**, 1837-40.
- Khare, S.D., Ding, F., Gwanmesia, K.N. and Dokholyan, N.V. (2005) Molecular origin of polyglutamine aggregation in neurodegenerative diseases. *PLoS Comput Biol*, **1**, e30. Epub 2005 Aug 26.
- Kim, J.H., Park, K.C., Chung, S.S., Bang, O. and Chung, C.H. (2003a) Deubiquitinating enzymes as cellular regulators. *J Biochem (Tokyo)*, **134**, 9-18.
- Kim, M., Lee, H.S., LaForet, G., McIntyre, C., Martin, E.J., Chang, P., Kim, T.W., Williams, M., Reddy, P.H., Tagle, D., Boyce, F.M., Won, L., Heller, A., Aronin, N. and DiFiglia, M. (1999) Mutant huntingtin expression in clonal striatal cells: dissociation of inclusion formation and neuronal survival by caspase inhibition. *J Neurosci*, **19**, 964-73.
- Kim, M., Roh, J.K., Yoon, B.W., Kang, L., Kim, Y.J., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2003b) Huntingtin is degraded to small fragments by calpain after ischemic injury. *Exp Neurol*, **183**, 109-15.
- Kim, S., Nollen, E.A., Kitagawa, K., Bindokas, V.P. and Morimoto, R.I. (2002) Polyglutamine protein aggregates are dynamic. *Nat Cell Biol*, **4**, 826-31.
- Kim, Y.J., Yi, Y., Sapp, E., Wang, Y., Cuiffo, B., Kegel, K.B., Qin, Z.H., Aronin, N. and DiFiglia, M. (2001) Caspase 3-cleaved N-terminal fragments of wild-type and mutant huntingtin are present in normal and Huntington's disease brains, associate with membranes, and undergo calpain-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 12784-9.

Literatur

- Kimura, Y. and Kakizuka, A. (2003) Polyglutamine diseases and molecular chaperones. *IUBMB Life*, **55**, 337-45.
- Kimura, Y., Koitabashi, S., Kakizuka, A. and Fujita, T. (2001) Initial process of polyglutamine aggregate formation in vivo. *Genes Cells*, **6**, 887-97.
- Klement, I.A., Skinner, P.J., Kaytor, M.D., Yi, H., Hersch, S.M., Clark, H.B., Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (1998) Ataxin-1 nuclear localization and aggregation: role in polyglutamine-induced disease in SCA1 transgenic mice. *Cell*, **95**, 41-53.
- Kobayashi, Y., Kume, A., Li, M., Doyu, M., Hata, M., Ohtsuka, K. and Sobue, G. (2000) Chaperones Hsp70 and Hsp40 suppress aggregate formation and apoptosis in cultured neuronal cells expressing truncated androgen receptor protein with expanded polyglutamine tract. *J Biol Chem*, **275**, 8772-8.
- Krobitsch, S. and Lindquist, S. (2000) Aggregation of huntingtin in yeast varies with the length of the polyglutamine expansion and the expression of chaperone proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1589-94.
- Kryndushkin, D.S., Alexandrov, I.M., Ter-Avanesyan, M.D. and Kushnirov, V.V. (2003) Yeast [PSI⁺] prion aggregates are formed by small Sup35 polymers fragmented by Hsp104. *J Biol Chem*, **278**, 49636-43. Epub 2003 Sep 24.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Lambert, M.P., Barlow, A.K., Chromy, B.A., Edwards, C., Freed, R., Liosatos, M., Morgan, T.E., Rozovsky, I., Trommer, B., Viola, K.L., Wals, P., Zhang, C., Finch, C.E., Krafft, G.A. and Klein, W.L. (1998) Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 6448-53.
- Lansbury, P.T., Jr. (1999) Evolution of amyloid: what normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3342-4.
- Lecerf, J.M., Shirley, T.L., Zhu, Q., Kazantsev, A., Amersdorfer, P., Housman, D.E., Messer, A. and Huston, J.S. (2001) Human single-chain Fv intrabodies counteract in situ huntingtin aggregation in cellular models of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4764-9.
- Lee, D.H. and Goldberg, A.L. (1998) Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **8**, 397-403.
- Lerer, I., Merims, D., Abeliovich, D., Zlotogora, J. and Gadoth, N. (1996) Machado-Joseph disease: correlation between the clinical features, the CAG repeat length and homozygosity for the mutation. *Eur J Hum Genet.*, **4**, 3-7.
- Lesort, M., Lee, M., Tucholski, J. and Johnson, G.V. (2003) Cystamine inhibits caspase activity. Implications for the treatment of polyglutamine disorders. *J Biol Chem*, **278**, 3825-30. Epub 2002 Nov 27.
- Li, F., Macfarlan, T., Pittman, R.N. and Chakravarti, D. (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem*, **277**, 45004-12.
- Li, H., Li, S.H., Johnston, H., Shelbourne, P.F. and Li, X.J. (2000) Amino-terminal fragments of mutant huntingtin show selective accumulation in striatal neurons and synaptic toxicity. *Nat Genet*, **25**, 385-9.
- Li, M., Miwa, S., Kobayashi, Y., Merry, D.E., Yamamoto, M., Tanaka, F., Doyu, M., Hashizume, Y., Fischbeck, K.H. and Sobue, G. (1998) Nuclear inclusions of the androgen receptor protein in spinal and bulbar muscular atrophy. *Ann Neurol*, **44**, 249-54.
- Li, Y., Yokota, T., Matsumura, R., Taira, K. and Mizusawa, H. (2004) Sequence-dependent and independent inhibition specific for mutant ataxin-3 by small interfering RNA. *Ann Neurol*, **56**, 124-9.

Literatur

- Lin, C.H., Tallaksen-Greene, S., Chien, W.M., Cearley, J.A., Jackson, W.S., Crouse, A.B., Ren, S., Li, X.J., Albin, R.L. and Detloff, P.J. (2001) Neurological abnormalities in a knock-in mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **10**, 137-44.
- Lin, X., Antalffy, B., Kang, D., Orr, H.T. and Zoghbi, H.Y. (2000) Polyglutamine expansion down-regulates specific neuronal genes before pathologic changes in SCA1. *Nat Neurosci*, **3**, 157-63.
- Lin, X., Cummings, C.J. and Zoghbi, H.Y. (1999) Expanding our understanding of polyglutamine diseases through mouse models. *Neuron*, **24**, 499-502.
- Lindquist, S. (1997) Mad cows meet psi-chotic yeast: the expansion of the prion hypothesis. *Cell*, **89**, 495-8.
- Litvinovich, S.V., Brew, S.A., Aota, S., Akiyama, S.K., Haudenschild, C. and Ingham, K.C. (1998) Formation of amyloid-like fibrils by self-association of a partially unfolded fibronectin type III module. *J Mol Biol*, **280**, 245-58.
- Liu, C. and Hermann, T.E. (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem*, **253**, 5892-4.
- Lu, T., Xu, Y., Mericle, M.T. and Mellgren, R.L. (2002) Participation of the conventional calpains in apoptosis. *Biochim Biophys Acta*, **1590**, 16-26.
- Macario, A.J. and Conway de Macario, E. (2002) Sick chaperones and ageing: a perspective. *Ageing Res Rev*, **1**, 295-311.
- Mangiarini, L., Sathasivam, K., Seller, M., Cozens, B., Harper, A., Hetherington, C., Lawton, M., Trotter, Y., Lehrach, H., Davies, S.W. and Bates, G.P. (1996) Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice. *Cell*, **87**, 493-506.
- Mao, Y., Senic-Matuglia, F., Di Fiore, P.P., Polo, S., Hodsdon, M.E. and 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.*, [Epub ahead of print].
- Marchal, S., Shehi, E., Harricane, M.C., Fusi, P., Heitz, F., Tortora, P. and Lange, R. (2003) Structural instability and fibrillar aggregation of non-expanded human ataxin-3 revealed under high pressure and temperature. *J Biol Chem*, **278**, 31554-63. Epub 2003 May 23.
- Maruyama, H., Izumi, Y., Morino, H., Oda, M., Toji, H., Nakamura, S. and Kawakami, H. (2002) Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet*, **114**, 578-83.
- Masino, L., Kelly, G., Leonard, K., Trotter, Y. and Pastore, A. (2002) Solution structure of polyglutamine tracts in GST-polyglutamine fusion proteins. *FEBS Lett*, **513**, 267-72.
- Masino, L., Musi, V., Menon, R.P., Fusi, P., Kelly, G., Frenkiel, T.A., Trotter, Y. and Pastore, A. (2003) Domain architecture of the polyglutamine protein ataxin-3: a globular domain followed by a flexible tail. *FEBS Lett*, **549**, 21-5.
- Masino, L., Nicastro, G., Menon, R.P., Dal Piaz, F., Calder, L. and 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**, 1021-35.
- Matsumoto, M., Yada, M., Hatakeyama, S., Ishimoto, H., Tanimura, T., Tsuji, S., Kakizuka, A., Kitagawa, M. and Nakayama, K.I. (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *Embo J*, **23**, 659-69. Epub 2004 Jan 29.
- McCampbell, A., Taylor, J.P., Taye, A.A., Robitschek, J., Li, M., Walcott, J., Merry, D., Chai, Y., Paulson, H., Sobue, G. and Fischbeck, K.H. (2000) CREB-binding protein sequestration by expanded polyglutamine. *Hum Mol Genet*, **9**, 2197-202.
- McDonough, H. and Patterson, C. (2003) CHIP: a link between the chaperone and proteasome systems. *Cell Stress Chaperones*, **8**, 303-8.

Literatur

- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I. and Masters, C.L. (1999) Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, **46**, 860-6.
- Menalled, L.B., Sison, J.D., Wu, Y., Olivieri, M., Li, X.J., Li, H., Zeitlin, S. and Chesselet, M.F. (2002) Early motor dysfunction and striosomal distribution of huntingtin microaggregates in Huntington's disease knock-in mice. *J Neurosci*, **22**, 8266-76.
- Mende-Mueller, L.M., Toneff, T., Hwang, S.R., Chesselet, M.F. and Hook, V.Y. (2001) Tissue-specific proteolysis of Huntingtin (htt) in human brain: evidence of enhanced levels of N- and C-terminal htt fragments in Huntington's disease striatum. *J Neurosci*, **21**, 1830-7.
- Meriin, A.B., Zhang, X., He, X., Newnam, G.P., Chernoff, Y.O. and Sherman, M.Y. (2002) Huntington toxicity in yeast model depends on polyglutamine aggregation mediated by a prion-like protein Rnq1. *J Cell Biol*, **157**, 997-1004.
- Michalik, A., Kazantsev, A. and Van Broeckhoven, C. (2001) Method to introduce stable, expanded, polyglutamine-encoding CAG/CAA trinucleotide repeats into CAG repeat-containing genes. *Biotechniques*, **31**, 250-2, 254.
- Miroy, G.J., Lai, Z., Lashuel, H.A., Peterson, S.A., Strang, C. and Kelly, J.W. (1996) Inhibiting transthyretin amyloid fibril formation via protein stabilization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 15051-6.
- Miyashita, T., Matsui, J., Ohtsuka, Y., Mami, U., Fujishima, S., Okamura-Oho, Y., Inoue, T. and Yamada, M. (1999) Expression of extended polyglutamine sequentially activates initiator and effector caspases. *Biochem Biophys Res Commun*, **257**, 724-30.
- Mizuno, Y., Hori, S., Kakizuka, A. and Okamoto, K. (2003) Vacuole-creating protein in neurodegenerative diseases in humans. *Neurosci Lett*, **343**, 77-80.
- Morgan, D., Diamond, D.M., Gottschall, P.E., Ugen, K.E., Dickey, C., Hardy, J., Duff, K., Jantzen, P., DiCarlo, G., Wilcock, D., Connor, K., Hatcher, J., Hope, C., Gordon, M. and Arendash, G.W. (2000) A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of Alzheimer's disease. *Nature*, **408**, 982-5.
- Morozova-Roche, L.A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D.B., Joniau, M. and Dobson, C.M. (2000) Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. *J Struct Biol*, **130**, 339-51.
- Mosser, D.D., Caron, A.W., Bourget, L., Meriin, A.B., Sherman, M.Y., Morimoto, R.I. and Massie, B. (2000) The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol*, **20**, 7146-59.
- Muchowski, P.J., Schaffar, G., Sittler, A., Wanker, E.E., Hayer-Hartl, M.K. and Hartl, F.U. (2000) Hsp70 and hsp40 chaperones can inhibit self-assembly of polyglutamine proteins into amyloid-like fibrils. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7841-6.
- Murata, S., Chiba, T. and Tanaka, K. (2003) CHIP: a quality-control E3 ligase collaborating with molecular chaperones. *Int J Biochem Cell Biol*, **35**, 572-8.
- Nagai, Y., Fujikake, N., Ohno, K., Higashiyama, H., Popiel, H.A., Rahadian, J., Yamaguchi, M., Strittmatter, W.J., Burke, J.R. and Toda, T. (2003) Prevention of polyglutamine oligomerization and neurodegeneration by the peptide inhibitor QBP1 in *Drosophila*. *Hum Mol Genet*, **12**, 1253-9.
- Nakagawa, T. and Yuan, J. (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol*, **150**, 887-94.
- Nakanishi, H., Amano, T., Sastradipura, D.F., Yoshimine, Y., Tsukuba, T., Tanabe, K., Hirotsu, I., Ohono, T. and Yamamoto, K. (1997) Increased expression of cathepsins E and D in neurons of the aged rat brain and their colocalization with lipofuscin and carboxy-terminal fragments of Alzheimer amyloid precursor protein. *J Neurochem*, **68**, 739-49.

Literatur

- Namura, S., Hirt, L., Wheeler, V.C., McGinnis, K.M., Hilditch-Maguire, P., Moskowitz, M.A., MacDonald, M.E. and Persichetti, F. (2002) The HD mutation does not alter neuronal death in the striatum of Hdh(Q92) knock-in mice after mild focal ischemia. *Neurobiol Dis*, **11**, 147-54.
- Nardai, G., Csermely, P. and Soti, C. (2002) Chaperone function and chaperone overload in the aged. A preliminary analysis. *Exp Gerontol*, **37**, 1257-62.
- Nasir, J., Floresco, S.B., O'Kusky, J.R., Diewert, V.M., Richman, J.M., Zeisler, J., Borowski, A., Marth, J.D., Phillips, A.G. and Hayden, M.R. (1995) Targeted disruption of the Huntington's disease gene results in embryonic lethality and behavioral and morphological changes in heterozygotes. *Cell*, **81**, 811-23.
- Nelson, R., Sawaya, M.R., Balbirnie, M., Madsen, A.O., Riek, C., Grothe, R. and Eisenberg, D. (2005) Structure of the cross-beta spine of amyloid-like fibrils. *Nature*, **435**, 773-8.
- Nelson, R.J., Heschl, M.F. and Craig, E.A. (1992) Isolation and characterization of extragenic suppressors of mutations in the SSA hsp70 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **131**, 277-85.
- Neumar, R.W., Xu, Y.A., Gada, H., Guttmann, R.P. and Siman, R. (2003) Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem*, **278**, 14162-7. Epub 2003 Feb 07.
- Nicastro, G., Menon, R.P., Masino, L., Knowles, P.P., McDonald, N.Q. and 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**, 10493-8. Epub 2005 Jul 14.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, **16**, 1345-55.
- Nixon, R.A. (2003) The calpains in aging and aging-related diseases. *Ageing Res Rev*, **2**, 407-18.
- Nucifora, F.C., Jr., Sasaki, M., Peters, M.F., Huang, H., Cooper, J.K., Yamada, M., Takahashi, H., Tsuji, S., Troncoso, J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (2001) Interference by huntingtin and atrophin-1 with cbp-mediated transcription leading to cellular toxicity. *Science*, **291**, 2423-8.
- Ohtsuka, K. (1993) Cloning of a cDNA for heat-shock protein hsp40, a human homologue of bacterial DnaJ. *Biochem Biophys Res Commun*, **197**, 235-40.
- Ona, V.O., Li, M., Vonsattel, J.P., Andrews, L.J., Khan, S.Q., Chung, W.M., Frey, A.S., Menon, A.S., Li, X.J., Stieg, P.E., Yuan, J., Penney, J.B., Young, A.B., Cha, J.H. and Friedlander, R.M. (1999) Inhibition of caspase-1 slows disease progression in a mouse model of Huntington's disease. *Nature*, **399**, 263-7.
- Ordway, J.M., Tallaksen-Greene, S., Gutekunst, C.A., Bernstein, E.M., Cearley, J.A., Wiener, H.W., Dure, L.S.t., Lindsey, R., Hersch, S.M., Jope, R.S., Albin, R.L. and Detloff, P.J. (1997) Ectopically expressed CAG repeats cause intranuclear inclusions and a progressive late onset neurological phenotype in the mouse. *Cell*, **91**, 753-63.
- Orr, H.T. (2001) Beyond the Qs in the polyglutamine diseases. *Genes Dev*, **15**, 925-32.
- Parekh-Olmedo, H., Krainc, D. and Kmiec, E.B. (2002) Targeted gene repair and its application to neurodegenerative disorders. *Neuron*, **33**, 495-8.
- Parsell, D.A., Kowal, A.S., Singer, M.A. and Lindquist, S. (1994) Protein disaggregation mediated by heat-shock protein Hsp104. *Nature*, **372**, 475-8.
- Patino, M.M., Liu, J.J., Glover, J.R. and Lindquist, S. (1996) Support for the prion hypothesis for inheritance of a phenotypic trait in yeast. *Science*, **273**, 622-6.

Literatur

- Paulson, H.L., Bonini, N.M. and Roth, K.A. (2000) Polyglutamine disease and neuronal cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 12957-8.
- Paulson, H.L., Das, S.S., Crino, P.B., Perez, M.K., Patel, S.C., Gotsdiner, D., Fischbeck, K.H. and Pittman, R.N. (1997a) Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol*, **41**, 453-62.
- Paulson, H.L., Perez, M.K., Trotter, Y., Trojanowski, J.Q., Subramony, S.H., Das, S.S., Vig, P., Mandel, J.L., Fischbeck, K.H. and Pittman, R.N. (1997b) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron*, **19**, 333-44.
- Perez, M.K., Paulson, H.L., Pendse, S.J., Saionz, S.J., Bonini, N.M. and Pittman, R.N. (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol*, **143**, 1457-70.
- Perutz, M.F., Finch, J.T., Berriman, J. and Lesk, A. (2002) Amyloid fibers are water-filled nanotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 5591-5.
- Perutz, M.F., Johnson, T., Suzuki, M. and Finch, J.T. (1994) Glutamine repeats as polar zippers: their possible role in inherited neurodegenerative diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 5355-8.
- Peters, M.F., Nucifora, F.C., Jr., Kushi, J., Seaman, H.C., Cooper, J.K., Herring, W.J., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A. (1999) Nuclear targeting of mutant Huntingtin increases toxicity. *Mol Cell Neurosci*, **14**, 121-8.
- Poirier, M.A., Li, H., Macosko, J., Cai, S., Amzel, M. and Ross, C.A. (2002) Huntingtin spheroids and protofibrils as precursors in polyglutamine fibrilization. *J Biol Chem*, **277**, 41032-7. Epub 2002 Aug 8.
- Popiel, H.A., Nagai, Y., Onodera, O., Inui, T., Fujikake, N., Urade, Y., Strittmatter, W.J., Burke, J.R., Ichikawa, A. and Toda, T. (2004) Disruption of the toxic conformation of the expanded polyglutamine stretch leads to suppression of aggregate formation and cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, **317**, 1200-6.
- Porn-Ares, M.I., Samali, A. and Orrenius, S. (1998) Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ*, **5**, 1028-33.
- Preisinger, E., Jordan, B.M., Kazantsev, A. and Housman, D. (1999) Evidence for a recruitment and sequestration mechanism in Huntington's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **354**, 1029-34.
- Pschyrembel. (1982) *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Pschyrembel. (1994) *Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter, Berlin - New York.
- Reddy, P.H., Williams, M., Charles, V., Garrett, L., Pike-Buchanan, L., Whetsell, W.O., Jr., Miller, G. and Tagle, D.A. (1998) Behavioural abnormalities and selective neuronal loss in HD transgenic mice expressing mutated full-length HD cDNA. *Nat Genet*, **20**, 198-202.
- Riley, B.E., Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (2005) SUMOylation of the polyglutamine repeat protein, ataxin-1, is dependent on a functional nuclear localization signal. *J Biol Chem*, **280**, 21942-8. Epub 2005 Apr 11.
- Rimoldi, M., Servadio, A. and Zimarino, V. (2001) Analysis of heat shock transcription factor for suppression of polyglutamine toxicity. *Brain Res Bull*, **56**, 353-62.
- Rochet, J.C. and Lansbury, P.T., Jr. (2000) Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr Opin Struct Biol*, **10**, 60-8.
- Rosenberg, R.N. (1992) Machado-Joseph disease: an autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord.*, **7**, 193-203.
- Ross, C.A. (2002) Polyglutamine pathogenesis: emergence of unifying mechanisms for Huntington's disease and related disorders. *Neuron*, **35**, 819-22.
- Ross, C.A. and Poirier, M.A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med*, **10**, S10-7.

Literatur

- Ross, C.A., Poirier, M.A., Wanker, E.E. and Amzel, M. (2003) Polyglutamine fibrillogenesis: the pathway unfolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1-3. Epub 2002 Dec 30.
- Rubinsztein, D.C. (2002) Lessons from animal models of Huntington's disease. *Trends Genet*, **18**, 202-9.
- Ruiz-Vela, A., Gonzalez de Buitrago, G. and Martinez, A.C. (1999) Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J*, **18**, 4988-98.
- Saito, K., Elce, J.S., Hamos, J.E. and Nixon, R.A. (1993) Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: a potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2628-32.
- Sakahira, H., Breuer, P., Hayer-Hartl, M.K. and Hartl, F.U. (2002) Molecular chaperones as modulators of polyglutamine protein aggregation and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **20**, 20.
- Samara, C. and Tavernarakis, N. (2003) Calcium-dependent and aspartyl proteases in neurodegeneration and ageing in *C. elegans*. *Ageing Res Rev*, **2**, 451-71.
- Sanchez, I., Mahlke, C. and Yuan, J. (2003) Pivotal role of oligomerization in expanded polyglutamine neurodegenerative disorders. *Nature*, **421**, 373-9.
- Sanchez, I., Xu, C.J., Juo, P., Kakizaka, A., Blenis, J. and Yuan, J. (1999) Caspase-8 is required for cell death induced by expanded polyglutamine repeats. *Neuron*, **22**, 623-33.
- Satyal, S.H., Schmidt, E., Kitagawa, K., Sondheimer, N., Lindquist, S., Kramer, J.M. and Morimoto, R.I. (2000) Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5750-5.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D. and Greenberg, M.E. (1998) Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions. *Cell*, **95**, 55-66.
- Schaffar, G. (2004) Inhibition der Polyglutamin-induzierten Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch molekulare Chaperone. *Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität München*. Mensch und Buch Verlag, Berlin, 3-89820-765-X.
- Schaffar, G., Breuer, P., Boteva, R., Behrends, C., Tzvetkov, N., Strippel, N., Sakahira, H., Siegers, K., Hayer-Hartl, M. and Hartl, F.U. (2004) Cellular toxicity of polyglutamine expansion proteins: mechanism of transcription factor deactivation. *Mol Cell*, **15**, 95-105.
- Scheel, H., Tomiuk, S. and Hofmann, K. (2003) Elucidation of ataxin-3 and ataxin-7 function by integrative bioinformatics. *Hum Mol Genet*, **27**, 27.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. and Seubert, P. (1999) Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, **400**, 173-7.
- Scherzinger, E., Lurz, R., Turmaine, M., Mangiarini, L., Hollenbach, B., Hasenbank, R., Bates, G.P., Davies, S.W., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (1997) Huntingtin-encoded polyglutamine expansions form amyloid-like protein aggregates in vitro and in vivo. *Cell*, **90**, 549-58.
- Scherzinger, E., Sittler, A., Schweiger, K., Heiser, V., Lurz, R., Hasenbank, R., Bates, G.P., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (1999) Self-assembly of polyglutamine-containing huntingtin fragments into amyloid-like fibrils: implications for Huntington's disease pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4604-9.
- Schilling, G., Savonenko, A.V., Klevytska, A., Morton, J.L., Tucker, S.M., Poirier, M., Gale, A., Chan, N., Gonzales, V., Slunt, H.H., Coonfield, M.L., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Ross, C.A. and Borchelt, D.R. (2004) Nuclear-targeting of mutant huntingtin

- fragments produces Huntington's disease-like phenotypes in transgenic mice. *Hum Mol Genet*, **13**, 1599-610. Epub 2004 Jun 9.
- Schmidt, T., Landwehrmeyer, G.B., Schmitt, I., Trottier, Y., Auburger, G., Laccone, F., Klockgether, T., Volpel, M., Epplen, J.T., Schols, L. and Riess, O. (1998) An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol*, **8**, 669-79.
- Schmidt, T., Lindenberg, K.S., Krebs, A., Schols, L., Laccone, F., Herms, J., Rechsteiner, M., Riess, O. and Landwehrmeyer, G.B. (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol*, **51**, 302-10.
- Schmitt, I., Brattig, T., Gossen, M. and Riess, O. (1997) Characterization of the rat spinocerebellar ataxia type 3 gene. *Neurogenetics*, **1**, 103-12.
- Schotte, P., Declercq, W., Van Huffel, S., Vandenabeele, P. and Beyaert, R. (1999) Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases. *FEBS Lett*, **442**, 117-21.
- Schroder, M. and Kaufman, R.J. (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, **569**, 29-63.
- Serag, A.A., Altenbach, C., Gingery, M., Hubbell, W.L. and Yeates, T.O. (2002) Arrangement of subunits and ordering of beta-strands in an amyloid sheet. *Nat Struct Biol*, **9**, 734-9.
- Serpell, L.C. (2000) Alzheimer's amyloid fibrils: structure and assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1502**, 16-30.
- Serpell, L.C., Blake, C.C. and Fraser, P.E. (2000) Molecular structure of a fibrillar Alzheimer's A beta fragment. *Biochemistry*, **39**, 13269-75.
- Shamovsky, I. and Gershon, D. (2004) Novel regulatory factors of HSF-1 activation: facts and perspectives regarding their involvement in the age-associated attenuation of the heat shock response. *Mech Ageing Dev*, **125**, 767-75.
- Shehi, E., Fusi, P., Secundo, F., Pozzuolo, S., Bairati, A. and Tortora, P. (2003) Temperature-dependent, irreversible formation of amyloid fibrils by a soluble human ataxin-3 carrying a moderately expanded polyglutamine stretch (Q36). *Biochemistry*, **42**, 14626-32.
- Shelbourne, P.F., Killeen, N., Hevner, R.F., Johnston, H.M., Tecott, L., Lewandoski, M., Ennis, M., Ramirez, L., Li, Z., Iannicola, C., Littman, D.R. and Myers, R.M. (1999) A Huntington's disease CAG expansion at the murine Hdh locus is unstable and associated with behavioural abnormalities in mice. *Hum Mol Genet*, **8**, 763-74.
- Sherman, M.Y. and Goldberg, A.L. (2001) Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, **29**, 15-32.
- Shoosmith Berke, S.J., Chai, Y., Marrs, G.L., Wen, H. and Paulson, H.L. (2005) Defining the role of ubiquitin interacting motifs in the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *J Biol Chem*.
- Shorter, J. and Lindquist, S. (2004) Hsp104 catalyzes formation and elimination of self-replicating Sup35 prion conformers. *Science*, **304**, 1793-7. Epub 2004 May 20.
- Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Sinden, R.R. (1999) Biological implications of the DNA structures associated with disease-causing triplet repeats. *Am J Hum Genet*, **64**, 346-53.
- Sisodia, S.S. (1998) Nuclear inclusions in glutamine repeat disorders: are they pernicious, coincidental, or beneficial? *Cell*, **95**, 1-4.

Literatur

- Sittler, A., Lurz, R., Lueder, G., Priller, J., Lehrach, H., Hayer-Hartl, M.K., Hartl, F.U. and Wanker, E.E. (2001) Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **10**, 1307-15.
- Skinner, P.J., Koshy, B.T., Cummings, C.J., Klement, I.A., Helin, K., Servadio, A., Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (1997) Ataxin-1 with an expanded glutamine tract alters nuclear matrix-associated structures. *Nature*, **389**, 971-4.
- Sobue, G., Doyu, M., Nakao, N., Shimada, N., Mitsuma, T., Maruyama, H., Kawakami, S. and Nakamura, S. (1996) Homozygosity for Machado-Joseph disease gene enhances phenotypic severity. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **60**, 354-6.
- Soong, B., Cheng, C., Liu, R. and Shan, D. (1997) Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and metabolic characterization in Chinese kindreds. *Ann Neurol*, **41**, 446-52.
- Soto, C. (2003) Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*, **4**, 49-60.
- Squitieri, F., Gellera, C., Cannella, M., Mariotti, C., Cislighi, G., Rubinsztein, D.C., Almqvist, E.W., Turner, D., Bachoud-Levi, A.C., Simpson, S.A., Delatycki, M., Maglione, V., Hayden, M.R. and Donato, S.D. (2003) Homozygosity for CAG mutation in Huntington disease is associated with a more severe clinical course. *Brain*, **126**, 946-55.
- Steffan, J.S., Agrawal, N., Pallos, J., Rockabrand, E., Trotman, L.C., Slepko, N., Illes, K., Lukacsovich, T., Zhu, Y.Z., Cattaneo, E., Pandolfi, P.P., Thompson, L.M. and Marsh, J.L. (2004) SUMO modification of Huntingtin and Huntington's disease pathology. *Science*, **304**, 100-4.
- Steffan, J.S., Bodai, L., Pallos, J., Poelman, M., McCampbell, A., Apostol, B.L., Kazantsev, A., Schmidt, E., Zhu, Y.Z., Greenwald, M., Kurokawa, R., Housman, D.E., Jackson, G.R., Marsh, J.L. and Thompson, L.M. (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature*, **413**, 739-43.
- Stennicke, H.R. and Salvesen, G.S. (2000) Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 299-306.
- Stenoien, D.L., Cummings, C.J., Adams, H.P., Mancini, M.G., Patel, K., DeMartino, G.N., Marcelli, M., Weigel, N.L. and Mancini, M.A. (1999) Polyglutamine-expanded androgen receptors form aggregates that sequester heat shock proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. *Hum Mol Genet*, **8**, 731-41.
- Stork, M., Giese, A., Kretzschmar, H.A. and Tavan, P. (2005) Molecular Dynamics Simulations Indicate a Possible Role of Parallel β -Helices in Seeded Aggregation of Poly-Gln. *Biophys J*, **88**, 2442-51. Epub 2005 Jan 21.
- Sudarsky, L. and Coutinho, P. (1995) Machado-Joseph disease. *3*, **1**, 17-22.
- Sugars, K.L., Brown, R., Cook, L.J., Swartz, J. and Rubinsztein, D.C. (2004) Decreased cAMP response element-mediated transcription: an early event in exon 1 and full-length cell models of Huntington's disease that contributes to polyglutamine pathogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 4988-99. Epub 2003 Nov 18.
- Sugars, K.L. and Rubinsztein, D.C. (2003) Transcriptional abnormalities in Huntington disease. *Trends Genet*, **19**, 233-8.
- Sun, B., Fan, W., Balciunas, A., Cooper, J.K., Bitan, G., Steavenson, S., Denis, P.E., Young, Y., Adler, B., Daugherty, L., Manoukian, R., Elliott, G., Shen, W., Talvenheimo, J., Teplow, D.B., Haniu, M., Haldankar, R., Wypych, J., Ross, C.A., Citron, M. and Richards, W.G. (2002) Polyglutamine repeat length-dependent proteolysis of huntingtin. *Neurobiol Dis*, **11**, 111-22.

Literatur

- Sunde, M., Serpell, L.C., Bartlam, M., Fraser, P.E., Pepys, M.B. and Blake, C.C. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotron X-ray diffraction. *J Mol Biol*, **273**, 729-39.
- Tait, D., Riccio, M., Sittler, A., Scherzinger, E., Santi, S., Ognibene, A., Maraldi, N.M., Lehrach, H. and Wanker, E.E. (1998) Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet*, **7**, 991-7.
- Takiyama, Y., Igarashi, S., Rogaeva, E.A., Endo, K., Rogaev, E.I., Tanaka, H., Sherrington, R., Sanpei, K., Liang, Y., Saito, M. and et al. (1995) Evidence for inter-generational instability in the CAG repeat in the MJD1 gene and for conserved haplotypes at flanking markers amongst Japanese and Caucasian subjects with Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet*, **4**, 1137-46.
- Takiyama, Y., Oyanagi, S., Kawashima, S., Sakamoto, H., Saito, K., Yoshida, M., Tsuji, S., Mizuno, Y. and Nishizawa, M. (1994) A clinical and pathologic study of a large Japanese family with Machado-Joseph disease tightly linked to the DNA markers on chromosome 14q. *Neurology*, **44**, 1302-8.
- Tanaka, M., Morishima, I., Akagi, T., Hashikawa, T. and Nukina, N. (2001) Intra- and intermolecular beta-pleated sheet formation in glutamine-repeat inserted myoglobin as a model for polyglutamine diseases. *J Biol Chem*, **276**, 45470-5.
- Tarlac, V. and Storey, E. (2003) Role of proteolysis in polyglutamine disorders. *J Neurosci Res*, **74**, 406-16.
- Tatzelt, J., Prusiner, S.B. and Welch, W.J. (1996) Chemical chaperones interfere with the formation of scrapie prion protein. *EMBO J*, **15**, 6363-73.
- Taylor, J.P., Hardy, J. and Fischbeck, K.H. (2002) Toxic proteins in neurodegenerative disease. *Science*, **296**, 1991-5.
- Tector, M. and Hartl, F.U. (1999) An unstable transmembrane segment in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *EMBO J*, **18**, 6290-8.
- Temussi, P.A., Masino, L. and Pastore, A. (2003) From Alzheimer to Huntington: why is a structural understanding so difficult? *EMBO J*, **22**, 355-61.
- Tjernberg, L.O., Pramanik, A., Bjorling, S., Thyberg, P., Thyberg, J., Nordstedt, C., Berndt, K.D., Terenius, L. and Rigler, R. (1999) Amyloid beta-peptide polymerization studied using fluorescence correlation spectroscopy. *Chem Biol*, **6**, 53-62.
- Tobin, A.J. and Signer, E.R. (2000) Huntington's disease: the challenge for cell biologists. *Trends Cell Biol*, **10**, 531-6.
- Tompa, P., Buzder-Lantos, P., Tantos, A., Farkas, A., Szilagyi, A., Banoczi, Z., Hudecz, F. and Friedrich, P. (2004) On the sequential determinants of calpain cleavage. *J Biol Chem*, **279**, 20775-85. Epub 2004 Feb 26.
- Tompkins, M.M. and Hill, W.D. (1997) Contribution of somal Lewy bodies to neuronal death. *Brain Res*, **775**, 24-9.
- Toneff, T., Mende-Mueller, L., Wu, Y., Hwang, S.R., Bunday, R., Thompson, L.M., Chesselet, M.F. and Hook, V. (2002) Comparison of huntingtin proteolytic fragments in human lymphoblast cell lines and human brain. *J Neurochem*, **82**, 84-92.
- Trottier, Y., Cancel, G., An-Gourfinkel, I., Lutz, Y., Weber, C., Brice, A., Hirsch, E. and Mandel, J.L. (1998) Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis*, **5**, 335-47.
- Tsai, H.F., Tsai, H.J. and Hsieh, M. (2004) Full-length expanded ataxin-3 enhances mitochondrial-mediated cell death and decreases Bcl-2 expression in human neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **324**, 1274-82.
- Uchihara, T., Fujigasaki, H., Koyano, S., Nakamura, A., Yagishita, S. and Iwabuchi, K. (2001) Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias--triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol (Berl)*, **102**, 149-52.

Literatur

- Ueda, H., Goto, J., Hashida, H., Lin, X., Oyanagi, K., Kawano, H., Zoghbi, H.Y., Kanazawa, I. and Okazawa, H. (2002) Enhanced SUMOylation in polyglutamine diseases. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 307-13.
- van Alfen, N., Sinke, R.J., Zwarts, M.J., Gabreels-Festen, A., Praamstra, P., Kremer, B.P. and Horstink, M.W. (2001) Intermediate CAG repeat lengths (53,54) for MJD/SCA3 are associated with an abnormal phenotype. *Ann Neurol*, **49**, 805-7.
- van Laar, T., van der Eb, A.J. and Terleth, C. (2002) A role for Rad23 proteins in 26S proteasome-dependent protein degradation? *Mutat Res*, **499**, 53-61.
- Villa, P.G., Henzel, W.J., Sensenbrenner, M., Henderson, C.E. and Pettmann, B. (1998) Calpain inhibitors, but not caspase inhibitors, prevent actin proteolysis and DNA fragmentation during apoptosis. *J Cell Sci*, **111**, 713-22.
- Volloch, V., Mosser, D.D., Massie, B. and Sherman, M.Y. (1998) Reduced thermotolerance in aged cells results from a loss of an hsp72-mediated control of JNK signaling pathway. *Cell Stress Chaperones*, **3**, 265-71.
- Wang, G., Ide, K., Nukina, N., Goto, J., Ichikawa, Y., Uchida, K., Sakamoto, T. and Kanazawa, I. (1997) Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun*, **233**, 476-9.
- Wang, G., Sawai, N., Kotliarova, S., Kanazawa, I. and 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**, 1795-803.
- Wang, K.K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R.A., Talanian, R.V., Keegan, M., Herzog, L. and Allen, H. (1998) Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys*, **356**, 187-96.
- Wang, Q., Song, C. and Li, C.C. (2004) Molecular perspectives on p97-VCP: progress in understanding its structure and diverse biological functions. *J Struct Biol*, **146**, 44-57.
- Wanker, E.E. (2000) Protein aggregation and pathogenesis of Huntington's disease: mechanisms and correlations. *Biol Chem*, **381**, 937-42.
- Warrick, J.M., Chan, H.Y., Gray-Board, G.L., Chai, Y., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in Drosophila by the molecular chaperone HSP70. *Nat Genet*, **23**, 425-8.
- Warrick, J.M., Morabito, L.M., Bilen, J., Gordesky-Gold, B., Faust, L.Z., Paulson, H.L. and Bonini, N.M. (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell*, **18**, 37-48.
- Watase, K., Weeber, E.J., Xu, B., Antalffy, B., Yuva-Paylor, L., Hashimoto, K., Kano, M., Atkinson, R., Sun, Y., Armstrong, D.L., Sweatt, J.D., Orr, H.T., Paylor, R. and Zoghbi, H.Y. (2002) A long CAG repeat in the mouse Scn1 locus replicates SCA1 features and reveals the impact of protein solubility on selective neurodegeneration. *Neuron*, **34**, 905-19.
- Waterhouse, N.J., Finucane, D.M., Green, D.R., Elce, J.S., Kumar, S., Alnemri, E.S., Litwack, G., Khanna, K., Lavin, M.F. and Watters, D.J. (1998) Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **5**, 1051-61.
- Weber, G.F. and Menko, A.S. (2005) The canonical intrinsic mitochondrial death pathway has a non-apoptotic role in signaling lens cell differentiation. *J Biol Chem*, **280**, 22135-45. Epub 2005 Apr 12.
- Weissman, J.S., Hohl, C.M., Kovalenko, O., Kashi, Y., Chen, S., Braig, K., Saibil, H.R., Fenton, W.A. and Horwich, A.L. (1995) Mechanism of GroEL action: productive release of polypeptide from a sequestered position under GroES. *Cell*, **83**, 577-87.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Gutekunst, C.A., Rogers, D., Warby, S., Graham, R.K., Loubser, O., van Raamsdonk, J., Singaraja, R., Yang, Y.Z., Gafni, J., Bredesen, D., Hersch, S.M., Leavitt, B.R., Roy, S., Nicholson, D.W. and Hayden, M.R. (2002)

- Caspase cleavage of mutant huntingtin precedes neurodegeneration in Huntington's disease. *J Neurosci*, **22**, 7862-72.
- Wellington, C.L., Ellerby, L.M., Hackam, A.S., Margolis, R.L., Trifiro, M.A., Singaraja, R., McCutcheon, K., Salvesen, G.S., Propp, S.S., Bromm, M., Rowland, K.J., Zhang, T., Rasper, D., Roy, S., Thornberry, N., Pinsky, L., Kakizuka, A., Ross, C.A., Nicholson, D.W., Bredesen, D.E. and Hayden, M.R. (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem*, **273**, 9158-67.
- Wexler, N.S., Young, A.B., Tanzi, R.E., Travers, H., Starosta-Rubinstein, S., Penney, J.B., Snodgrass, S.R., Shoulson, I., Gomez, F., Ramos Arroyo, M.A. and et al. (1987) Homozygotes for Huntington's disease. *Nature*, **326**, 194-7.
- Winklhofer, K.F., Reintjes, A., Hoener, M.C., Voellmy, R. and Tatzelt, J. (2001) Geldanamycin restores a defective heat shock response in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 45160-7. Epub 2001 Sep 26.
- Wojcik, C., Yano, M. and DeMartino, G.N. (2004) RNA interference of valosin-containing protein (VCP/p97) reveals multiple cellular roles linked to ubiquitin/proteasome-dependent proteolysis. *J Cell Sci*, **117**, 281-92. Epub 2003 Dec 2.
- Woodman, P.G. (2003) p97, a protein coping with multiple identities. *J Cell Sci*, **116**, 4283-90.
- Wytenbach, A., Swartz, J., Kita, H., Thykjaer, T., Carmichael, J., Bradley, J., Brown, R., Maxwell, M., Schapira, A., Orntoft, T.F., Kato, K. and Rubinsztein, D.C. (2001) Polyglutamine expansions cause decreased CRE-mediated transcription and early gene expression changes prior to cell death in an inducible cell model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, **10**, 1829-45.
- Yadavalli, R., Guttman, R.P., Seward, T., Centers, A.P., Williamson, R.A. and Telling, G.C. (2004) Calpain-dependent endoproteolytic cleavage of PrPSc modulates scrapie prion propagation. *J Biol Chem*, **279**, 21948-56. Epub 2004 Mar 16.
- Yamamoto, A., Lucas, J.J. and Hen, R. (2000) Reversal of neuropathology and motor dysfunction in a conditional model of Huntington's disease. *Cell*, **101**, 57-66.
- Yamamoto, Y., Hasegawa, H., Tanaka, K. and Kakizuka, A. (2001) Isolation of neuronal cells with high processing activity for the Machado-Joseph disease protein. *Cell Death Differ*, **8**, 871-3.
- Yamanaka, K., Okubo, Y., Suzaki, T. and Ogura, T. (2004) Analysis of the two p97/VCP/Cdc48p proteins of *Caenorhabditis elegans* and their suppression of polyglutamine-induced protein aggregation. *J Struct Biol*, **146**, 242-50.
- Yoo, S.Y., Pennesi, M.E., Weeber, E.J., Xu, B., Atkinson, R., Chen, S., Armstrong, D.L., Wu, S.M., Sweatt, J.D. and Zoghbi, H.Y. (2003) SCA7 knockin mice model human SCA7 and reveal gradual accumulation of mutant ataxin-7 in neurons and abnormalities in short-term plasticity. *Neuron*, **37**, 383-401.
- Yoshida, H., Yoshizawa, T., Shibasaki, F., Shoji, S. and Kanazawa, I. (2002) Chemical chaperones reduce aggregate formation and cell death caused by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis*, **10**, 88-99.
- Young, J.C., Barral, J.M. and Ulrich Hartl, F. (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem Sci*, **28**, 541-7.
- Young, J.C., Moarefi, I. and Hartl, F.U. (2001) Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *J Cell Biol*, **154**, 267-73.
- Zander, C., Takahashi, J., El Hachimi, K.H., Fujigasaki, H., Albanese, V., Lebre, A.S., Stevanin, G., Duyckaerts, C. and Brice, A. (2001) Similarities between spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) cell models and human brain: proteins recruited in inclusions and activation of caspase-3. *Hum Mol Genet*, **10**, 2569-79.

Literatur

- Zhu, Y.J., Lin, H. and Lal, R. (2000) Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J*, **14**, 1244-54.
- Zimmermann, K.C., Bonzon, C. and Green, D.R. (2001) The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther*, **92**, 57-70.
- Zimmermann, K.C. and Green, D.R. (2001) How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, **108**, S99-103.
- Zlotogora, J. (1997) Dominance and homozygosity. *Am J Med Genet*, **68**, 412-6.
- Zoghbi, H.Y. and Orr, H.T. (1999) Polyglutamine diseases: protein cleavage and aggregation. *Curr Opin Neurobiol*, **9**, 566-70.

7. Anhang

Abkürzungen und Trivialnamen von Chemikalien

Å	Ångström (= 0,1 Millimeter)
Abb.	Abbildung
Ac-YVAD-CHO	Caspase-1 Inhibitor I
ADP	Adenosindiphosphat
ALLN	Calpain Inhibitor I = LLNL = N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO
ALLM	Calpain Inhibitor II = N-Ac-Leu-Leu-methioninal
AP	Alkalische Phosphatase
Aprotinin	Serinprotease-Inhibitor, Polypeptid aus 58 Aminosäuren
AR	Androgen-Rezeptor
AT3	Ataxin3
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumine</i>)
Calpeptin	zellpermeabler Calpain-Inhibitor Z-Leu-Nle-CHO
CBP	CREB-Bindungsprotein
cDNA	komplementäre DNS
CFP	cyan-fluoreszierendes Protein (<i>cyan fluorescent protein</i>)
CREB	CRE (<i>cAMP response element</i>)-Bindungsprotein
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxy-Adenosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleotide
DTT	Dithiothreitol
E-64	Cysteinprotease-Inhibitor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECF	verstärkte Chemifluoreszenz (<i>enhanced chemifluorescence</i>)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	O,O'-Bis(2-aminoethyl)-ethylenglycol-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EM	Elektronenmikroskop
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	Fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-isothio-cyanat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
g	Gramm
GAP-DH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GFP	grünfluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde/n
HD	Huntington-Erkrankung (= <i>disease</i>)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein

Anhang

Htt	Huntingtin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktosid
k	Kilo ($\times 10^3$)
kb	Kilobasen = 10^3 Basenpaare
l	Liter
Leupeptin	Serin- und Cysteinprotease-Inhibitor Ac-Leu-Leu-Argininal
M	Molar (= 1mol pro Liter = mol/l)
m	Milli ($\times 10^{-3}$)
μ	Micro ($\times 10^{-6}$)
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>multiple cloning site</i>)
MG132	Proteasom-Inhibitor Z-Leu-Leu-Leu-CHO
min	Minute/n
MJD	Machado-Joseph Krankheit (= <i>disease</i>)
n	Nano ($\times 10^{-9}$)
NES	Kernexportsignal (<i>nuclear export signal</i>)
NLS	Kernlokalisierungssignal (<i>nuclear localization signal</i>)
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600nm
p	Pico ($\times 10^{-12}$)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS-T	Phosphat-gepufferte Salz-Lösung mit Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylen-Glykol
Pepstatin	Aspartylprotease-Inhibitor (Peptid: Übergangszustandsanalogon)
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
PP	<i>PreScission</i> Protease
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
polyQ	Polyglutamin
SCA	Spinozerebellare Ataxie
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat = Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde/n
SUMO	<i>small ubiquitin-like modifier</i>
TBP	TATA-Bindungsprotein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
U	Unit
UIM	Ubiquitin-Interaktionsmotiv
Upm	Umdrehungen pro Minute
üN	über Nacht
Z-DEVD-FMK	Caspase-3 Inhibitor II
Z-VAD-FMK	Caspase Inhibitor I = genereller Caspase-Inhibitor

Proteinsequenzen der verwendeten Polyglutamin-Proteine

GST-FLAG-AT3Q22-myc:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGS

MDYKDDDDKAGEFMESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSIAHQLDEEE
RMRMAEGGVTSERYRTFLQQPSGNMDDSGFFSIQVISNALKVWGLELILFNSPEYQR
LRIDPINERSFICNYKEHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPELISDTYLALFLAQLQQEG
YSIFVVKGDLP**G**CEADQLLQMIRVQQMHRPKLIGEELAQLKEQRVHKTDLERMLEA
NDGSGMLDEDEEDLQRALALSQRQEIDMEDEEADLRRAIQLSMQSSRNISQDMTQTS
GTNLTSEELRKRREAYFEK**QQQKQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ**RDLSGQSSHP
CERPATSSGALGSDLGKACSPFIMFATFTLYLTCEQKLISEEDL

GST-FLAG-AT3Q71-ΔUIM-myc:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGS

MDYKDDDDKAGEFMESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSIAHQLDEEE
RMRMAEGGVTSERYRTFLQQPSGNMDDSGFFSIQVISNALKVWGLELILFNSPEYQR
LRIDPINERSFICNYKEHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPELISDTYLALFLAQLQQEG
YSIFVVKGDLP**G**CEADQLLQMIRVQQMHRPKLIGEELAQLKEQRVHKTDLERMLEA
NDGSGMQSSRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEK**QQQKQQQQQQQQQQQQ**
QQ
QQQQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLGKACSPFIMFATFTLYLTCEQKLISEEDL

GST-257cQ22-myc:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGS

MQGSSRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEK**QQQKQQQQQQQQQQQQQQQQ**
QQQQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLGKACSPFIMFATFTLYLTCEQKLISEE
DL

GST-257cQA-myc:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLTQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLFGQP
LGS

MQGSSRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEK**QQQ**RDLSGQSSHPCERPATSSG
ALGSDLGKACSPFIMFATFTLYLTCEQKLISEEDL

NLS-257cQ22-myc:

MPPKKRKRKVDPKKKRKRKVGSMQGSRRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEKQQ
KQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLGKACSP
FIMFATFTLYLTCEQKLISEEDL

NES-257cQ22-myc:

MLALKLAGLDIGSMQGSRRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAYFEKQQQKQQQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLGKACSPFIMFATFT
LYLTCEQKLISEEDL

His₆-AT3Q22:

MSYYHHHHHHHDYDIPTTENLYFQGA
MESIFHEKQEGSLCAQHCLNLLQGEYFSPVELSSIAHQLDEEERMMAEGGVTS
YRTFLQQPSGNMDDSGFFSIQVISNALKVGLELILFNSPEYQRLRIDPINERSFICNYK
EHWFTVRKLGKQWFNLNSLLTGPELISDTYLALFLAQLQQEGYSIFVVKGDLPCEA
DQLQMIRVQQMHRPKLIGEELAQLKEQRVHKTDLERMLEANDGSGMLDEDEEDLQ
RALALSRQEIDMEDEEADLRRAIQLSMQGSRRNISQDMTQTSGTNLTSEELRKRREAY
FEKQQQKQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQRDLSGQSSHPCERPATSSGALGSDLG
KACSPFIMFATFTLYLT

GST-Htt-Exon1-51Q-myc:

MSPILGYWKIKGLVQPTRLLEYLEEKYEEHLYERDEGDKWRNKKFELGLEFPNLPY
YIDGDVKLQSMAIIRYIADKHNMLGGCPKERAIEISMLEGAVLDIRYGVSRIAYSKDF
ETLKVDFLSKLPEMLKMFEDRLCHKTYLNGDHVTHPDFMLYDALDVVLYMDPMCL
DAFPKLVCFKKRIEAIQIDKYLKSSKYIAWPLQGWQATFGGGDHPPKSDLEVLVFP
LGS
MATLEKLMKAFESLKSFQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQPPPPPPPPPPQLPQPPQAQPLLQPQPPPPPPPPPPGPAVAE
EPLHRPCEQKLISEEDL

TBP:

MDQNNSLPPYAQGLASPOGAMTPGIPIFSPMMPYGTGLTPQPIQNTNSLSILEEQQRQ
QQQAVAAAQVQSTSQAT
QGTSGQAPQLFHSQTLTAPLPGTTPLYPSMTPMTPITPATPASESSGIVPQLQNVST
VNLGCKLDLKTIALRARNAEYNPKRFAAVIMRIREPRTTALIFSSGKMVCTGAKSEEQ
SRLAARKYARVVQKLGFPKFLDFKIQNMVVGSCDVKFPRLVGLVTHQQFSSYEPEL
FPGLIYRMKPRIVLLIFVSGKVVLTGAKVRAEIYEAFENIYPILKGRKTT

DNS-Sequenz der alternierenden CAA CAG-Codons (Q₃KQ₈₇)

siehe 2.5.11:

CAACAGCAGAAGCAGCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGCA
ACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGC
AACAAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAG
CAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACA
GCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAACAGCAACAACAGCAGCAAC
AGCAACAA

Lebenslauf

Name: Annette Haacke
Geburtsdatum: 03.12.1976
Geburtsort: Marburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Forstenrieder Allee 71
81476 München

Schulbildung:

1983-1987 Grundschule am Schloth, Melsungen
1987-1989 Förderstufe, Gesamtschule Melsungen
1989-1993 Gymnasialzweig, Gesamtschule Melsungen
1993-1996 Gymnasiale Oberstufe, Geschwister-Scholl-Schule, Melsungen
06/1996 Abitur

Studium:

1996-2001 Biologie-Studium, Philipps-Universität Marburg
10/1998 Diplom-Vorprüfung
10/2000 Diplomprüfung (3 Fachgebiete: Mikrobiologie, Entwicklungsbiologie & Parasitologie, Genetik)
11/2000-07/2001 Diplomarbeit, Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie, Abteilung Prof. Dr. Thauer, Marburg
Thema: Identifizierung von essentiellen Glutamat-Resten in der membranständigen Untereinheit HycD der *Escherichia coli* – Hydrogenase 3 und Erzeugung einer Mutante mit erhöhter CO-Toleranz