„Funktionelle Charakterisierung der Interaktion von Ataxin-2 und DDX6“

Diplomarbeit

von

Franziska Welzel

Angefertigt am

Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Berlin

Abteilung Vertebrate Genomics, Prof. Dr. Hans Lehrach

Arbeitsgruppe Dr. Sylvia Krobitsch

Eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin

Die Diplomarbeit wurde in der Zeit von Oktober 2005 bis Juni 2006 angefertigt.

Erstgutachter: Prof. Dr. Hans Lehrach
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho

Danksagung:

An dieser Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Hans Lehrach und Prof. Dr. Ferdinand Hucho für die Bereitschaft zur Betreuung meiner Diplomarbeit bedanken.

Mein Dank gilt insbesondere Frau Dr. Sylvia Krobitsch für die exzellente Betreung und die Korrektur dieser Arbeit .

Weiterhin bedanke ich mich bei Markus Ralser für die intensive und zeitaufwendige Unterstützung, bei Ute Nonhoff für das Näherbringen der konfokalen Mikroskopie und bei Silke Wehrmeyer und Karolin Huckauf für die abertausend beantworteten Fragen.

Bei meinem Freund Björn Eilers bedanke ich mich besonders für die vielen Stunden guten Zuredens und die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern Elke Welzel und Adalbert Hahn, meiner Omi und meinem Cousinchen Kati bedanken. Dank eurer Unterstützung war es mir überhaupt möglich, meine Studienzeit so unbeschwert wie sie war, durchzustehen.

Danke

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1. Polyglutaminerkrankungen 1
1.2. Spinozerebellare Ataxie Typ 2 2
1.3. Ataxin-2 4
1.4. Zielsetzung 7

2. Material und Methoden 8

2.1. Material 8

2.1.1. Verwendete Materialien 8
2.1.2. Lösungen und Puffer 10
2.1.3. Medien 12
2.1.3.1. Bakterienmedien 12
2.1.3.2. Hefemedien 12
2.1.3.3. Zellkulturmedien 13
2.1.4. Mikroorganismen 13
2.1.4.1. *E.coli* 13
2.1.4.2. *S. cerevisae* 14
2.1.5. Säugerzellen 13
2.1.6. Plasmide 14
2.1.6.1. pACT4-1b 14
2.1.6.2. pBTM117c 14
2.1.6.3. p423Gall 15
2.1.6.4. pTL-FlagC 16
2.1.6.5. pTL-HA 16
2.1.7. Enzyme 17
2.1.7.1. Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase 17
2.1.7.2. Vent-Polymerase 17
2.1.7.3. Alkaline Phosphatase 17
2.1.7.4. Restriktionsenzyme 17
2.1.7.5. Ligase 17
2.1.7.6. RNAse III 17
2.1.8. Oligonukleotide 18
2.1.9. Antikörper 19

2.1.10. Protein- und DNA-Standards 20

2.2. Methoden 21

2.2.1. Polymerasekettenreaktion 21
2.2.2. Aufreinigung von PCR-Produkten 22
2.2.3. Enzymatische Modifizierung von DNA 22
2.2.3.1. Restriktionsverdau 22
2.2.3.2. Dephosphorylierung 22
2.2.4. Ligation 22
2.2.5. Transformation von *E.coli* 22
2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* 23
2.2.7. Agarosegelelektrophorese 23
2.2.8. Aufreinigung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel 23
2.2.9. Sequenzierung 24
2.2.10. Transformation von *S. cerevisae* 24
2.2.11. Yeast-Two-Hybrid-System 24
2.2.11.1. Yeast-Two-Hybrid-Analysen 25
2.2.12. Zellkultur 25
2.2.12.1. Koimmunopräzipitation 26
2.2.12.2. Transfektion von Säugerzellen 26
2.2.13. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 27
2.2.14. Western-Blot 27
2.2.15. Immunnachweis von Proteinen 27
2.2.16. RNAi-Experimente 28
2.2.16.1. Herstellung der esiRNA 28
2.2.16.2. Transfektion von COS1- und SH-SY5Y-Zellen mit esiRNA-Molekülen 30
2.2.17. Fluoreszenzmikroskopie 30

3. Ergebnisse 31

3.1. Charakterisierung der Interaktion von ATX2 und DDX6 31

3.1.1. Charakterisierung der Interaktion von ATX2 und DDX6 31
3.1.1.1. Klonierung des Y2H-Vektors pACT4-1b-DDX6 31
3.1.1.2. Yeast-Two-Hybrid-Analyse 33
3.1.2 Expression von ATX2 bzw. DDX6 in Δdhh1- bzw. Δpbp1- Stämmen mittels Y2H-Analyse 35
3.1.2.1 Klonierung des Hefeexpressionsvektors p423Gall-DDX6 35
3.1.2.2 Phänotypische Analysen der Expression von ATX2 bzw. DDX6 36
3.1.3 Nachweis der Interaktion von ATX2 und DDX6 in Säugerzellen 37
3.1.4 Kolokalisation von ATX2 und DDX6 in Säugerzellen 39

3.2 Analysen zum Einfluss einer veränderten DDX6-Konzentrationen 40

3.2.2 Einfluss einer verringerten DDX6-Konzentration auf die zelluläre Lokalisation und Konzentration von ATX2 40
3.2.2.1 Herstellung der esiRNA 40
3.2.2.2 RNAi 42
3.2.3 Einfluss einer erhöhten DDX6 –Konzentration auf die zelluläre Lokalisation und Konzentration von ATX2 44
3.2.3.1 Klonierung des Säugerexpressionsvektors pTL-FlagC 44
3.2.3.2 Transiente Überexpression von DDX6 in COS1-Zellen 45

3.3 Analysen zum Einfluss einer intrazellulären ATX2-Akkumulierung 45

3.3.2 Transiente Überexpression von ATX2 in COS1- und SH-SY5Y-Zellen 46
3.3.3 Transiente Überexpression der ATX2-Fragmente in COS1-Zellen 49

4 Diskussion 51
5 Ausblick 56
6 Literatur 57

1. Einleitung

1.1. Polyglutaminerkrankungen

Polyglutamin-Erkrankungen (PolyQ-Erkrankungen) sind dominant vererbbare neurodegenerative Erkrankungen, welche zur Familie der Trinukleotid-Erkrankungen gehören. Trinukleotid-Erkrankungen, zeichnen sich dadurch aus, dass im krankheitsbestimmenden Gen eine intragenische Expansion eines Basentripletts vorliegt und werden in zwei Klassen unterteilt. Bei Krankheiten der Klasse 1 befindet sich die Trinukleotid-Expansion in den kodierenden Bereichen und bei Krankheiten der Klasse 2 in den nicht-kodierenden Bereichen des entsprechenden Gens. Da sich bei den PolyQ-Erkrankungen die Trinukleotid-Expansion in den kodierenden Bereichen des Gens befindet, werden diese Erkrankungen zu den Trinukleotid-Erkrankungen der Klasse 1 gezählt [2].
Die Familie der PolyQ-Erkrankungen umfasst bisher neun Erkrankungen, und zwar Chorea Huntington (HD), Spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA), spinozerebellare Ataxie (SCA) Typ 1, SCA2, SCA3, SCA6, SCA7, SCA17, sowie Dentatorubrale-Pallidolysiane Atrophie (DRPLA) [2-7]. Bei diesen Krankheiten befindet sich eine Expansion des Trinukleotid-Repeats CAG im offenen Leseraster des entsprechenden Gens, wobei die CAG-Anzahl in den jeweiligen Genen auch in der gesunden Bevölkerung zu einem gewissen Grad polymorph ist, wie in Tabelle 1 ersichtlich. Auch bestehen Variationen bei der Repeat-Zahl, welche zum Ausbruch der Krankheiten führen. Interessanterweise gibt es eine reduzierte Penetranz bei intermediären Repeat-Zahlen, d.h. nicht alle Patienten zeigen klinische Symptome und erkranken [2].

Krankheit	Protein	Normale CAG-Anzahl	Pathogene CAG-Anzahl
SCA1	Ataxin 1	6-39	40-82
SCA2	Ataxin 2	15-24	32-200
SCA3	Ataxin 3	13-36	61-84
SCA6	CACNA1A	4-20	20-29
SCA7	Ataxin 7	4-35	37-306
SCA17	TBP	25-42	47-63
DRPLA	Atrophin 1	7-34	49-88
SBMA	Androgen-Rezeptor	9-36	38-62
HD	Huntingtin	11-34	40-121

Tabelle 1: Familie der PolyQ-Krankheiten

Weiterhin ist bekannt, dass die Länge des expandierten CAG-Repeats mit dem Beginn der Krankheit invers korreliert, d.h. je länger der expandierte CAG-Repeat ist, desto früher und

mit ausgeprägterer Symptomatik setzt die Krankheit ein [2]. Dieses Phänomen wird als Antizipation bezeichnet. Im Gegensatz zu den normalen Allelen weisen die expandierten Allele eine Instabilität in der Vererbung auf, so dass es zu einer veränderten Anzahl an CAG-Repeats bei den Nachkommen kommt. Diese Instabilität wird bei expandierten Allelen mit einer Frequenz von fast 100% beobachtet, bei normalen Repeat-Längen dagegen sehr selten [2, 8, 9].

Interessanterweise weisen die Proteine, die diese Erkrankungen hervorrufen, keine Homologien untereinander auf. Bis auf das SCA6 auslösende Protein CACNA1A, das ausschließlich im Gehirn exprimiert wird, werden diese Proteine in den meisten Geweben exprimiert und sind an unterschiedlichen zellulären Prozessen beteiligt. Die einzige Gemeinsamkeit besteht in dem Vorhandensein der Polyglutamin-Einheit in den Proteinen. Dennoch führen alle PolyQ-Krankheiten zu einem neuronalen Zellverlust in bestimmten Gehirnbereichen, wobei sich die betroffenen Areale bei den einzelnen Krankheiten größtenteils unterscheiden. Bei den meisten PolyQ-Krankheiten konnten intranukleare oder cytoplasmatische Aggregate in den degenerierenden Neuronen der betroffenen Hirnregionen gefunden werden [10-12], wobei das entsprechende expandierte PolyQ-Protein in diesen Aggregaten enthalten ist. Allerdings wurden die Aggregate zum Teil auch in Hirnbereichen nachgewiesen, die nicht von der Degeneration betroffen sind [11]. Da die Aggregate auch nicht bei allen PolyQ-Erkrankungen nachgewiesen werden, ist ihr Beitrag zur Pathogenese dementsprechend umstritten [13].

1.2. Spinozerebellare Ataxie Typ 2

Die Spinozerebellaren Ataxien, die zu den Polyglutaminerkrankungen gezählt werden, gehören nach klinischen Gesichtspunkten zu den vererbten autosomal dominanten Ataxien (ADCA), welche generell eine heterogene Symptomatik und Genetik aufweisen. Die ADCAs treten mit einer Prävalenz von 1 zu 100000 auf [5] und zeichnen sich durch das Vorhandensein einer ausgeprägten Ataxie (Gang- und Gliederataxie) aus, was die Namensgebung begründet und auf eine Atrophie des Cerebellums und der Hinterstränge der Medulla spinalis zurückzuführen ist. Hierbei zeigte sich, dass im Cerebellum hauptsächlich die Purkinjezellen betroffen sind [14]. Diese Gruppe ist aufgrund ihrer Phänotypen nach Harding in drei Gruppen unterteilt. Später erfolgte die Einteilung nach genetischen Gesichtspunkten, so dass die spinozerebellaren Ataxien 1, 2, 3, 6, 7 und 17 zu den Polyglutaminerkrankungen gezählt werden, da sie alle über eine Expansion eines (CAG)-Repeats innerhalb der kodierenden Sequenz des entsprechenden Gens verfügen.

Die spinozerebellare Ataxie Typ 2 (SCA2) gehört zur Gruppe 1 der Familie der ADCAs. Bei 15% aller ADCA-Erkrankungen handelt es sich um SCA2, wobei hier starke regionale Schwankungen zu beachten sind. In England, Süditalien und Indien tritt SCA2 z.B. mit einer extrem hohen Frequenz von 45% auf [15-17].

Die klinschen Hauptsymptome von SCA2 sind zerebellare Ataxie, Tremor, geringer Muskeltonus, verlangsamte Blicksakkaden, reduzierte oder fehlende Reflexe an den unteren Extremitäten, periphere Neuropathie, Ophthalmoparese, Parkinsonismus und Demenz [14, 18]. Zurückzuführen sind diese Symptome auf eine Degeneration der spinalen Leitungsbahnen und massivem neuronalen Zellverlust im Pons, der Substantia nigra, den Olivae inferiores und dem Kleinhirn, hier besonders der Purkinje-Zellen [19, 20].

Wie bereits eingangs erwähnt, ist diese Erkrankung auf eine Expansion des CAG-Repeats im kodierenden Teil vom Exon 1 des *SCA2*-Gens, zurückzuführen. Das *SCA2*-Gen ist auf Chromosom 12q23-24.1 lokalisiert, besteht aus 25 Exons und umfasst eine genomische Sequenz von 130 kb [25]. Der CAG-Repeat liegt am 5`-Ende der kodierenden Region des ersten Exons. Interessanterweise bestehen 90% der gesunden Allele aus 22 CAG-Repeats und ca. 6% aus 23 CAGs, wobei die restliche Verteilung zwischen 17 und 31 CAGs liegt [22-24]. Diese CAG-Repeats sind durch zwei CAA-Tripletts unterbrochen. Somit ist die Anzahl der CAGs in normalen *SCA2*-Allelen in der Bevölkerung relativ konstant und nicht so polymorph wie bei anderen PolyQ-Erkrankungen [23, 26]. Expandierte Allele besitzen 35-200 CAG-Repeats, die keine CAA-Tripletts beinhalten, was auf eine stabilisierende Funktion dieser Unterbrechungen bei der Vererbung hinweist [27]. Reduzierte Penetranz existiert bei einer CAG-Repeatanzahl von 32 bis 34.

Genexpressionanalysen zeigten, dass das *SCA2*-Gen, welches für das Protein Ataxin-2 kodiert, in Herz-, Leber-, Skelettmuskel-, Pankreas-, Plazenta- und Hirngewebe trasnkribiert wird. Im Gehirn wird es besonders in der Amygdala, dem Nukleus Caudatus, dem Corpus Callosum, dem Hippocampus, dem Hypothalamus, dem Thalamus, der Substantia Nigra und in den Purkinje-Zellen des Cerebellums exprimiert [21-24]. Bei immunhistochemischen Untersuchungen an Gehirnen von SCA2-Patienten wurde festgestellt, dass die Konzentration an Ataxin-2 in den betroffenen Gehirnbereichen im Gegensatz zu Kontrollen gesunder Personen stark erhöht ist [21]. Intranukleare oder cytoplasmatische Aggregate werden in SCA2-Patienten nur selten beobachtet und stehen nicht unbedingt mit der Pathogenese von SCA2 in Korrelation [21].

1.3. Ataxin-2

Wie bereits erwähnt, kodiert das *SCA2*-Gen für das Protein Ataxin-2 (ATX2), welches aus 1312 Aminosäuren (As) besteht und eine molekulare Masse von 145 kDa aufweist [22-24]. Das Protein ist insgesamt stark basisch, enthält jedoch auch eine saure Region, die die Aminosäuren 254-475 umfasst und von den Exons 2-7 kodiert wird. In dieser Region sind 2 globuläre konservierte Domänen lokalisiert, die Like-Sm- (LSm; As 254-345) und die LSm assoziierte Domäne (LSmAD; 353-475), wie aus der Abbildung 1 ersichtlich wird. Die Struktur der LSmAD ist von α-Helices bestimmt [28]. Innerhalb der LSm assoziierten Domäne befindet sich ein Clathrin-vermitteltes trans-Golgi-Signal (YDS; As 414-416) und ein ER (endoplasmatisches Retikulum) exit signal (ERD; As 426-428). Zusätzlich beinhaltet die Aminosäuresequenz von ATX2 eine putative Caspase-3-Schnittstelle (396-399). N-terminal der sauren Region ist die PolyQ-Region lokalisiert (As 166-187). C-terminal der LSmAD befindet sich ein (R)RG-Motiv, welches häufig in RNA-bindenden Proteinen zu finden ist [29]. Dazu kommt im C-Terminus ein PolyA-binding-protein (PABP)-Interaktionsmotiv (PAM2).

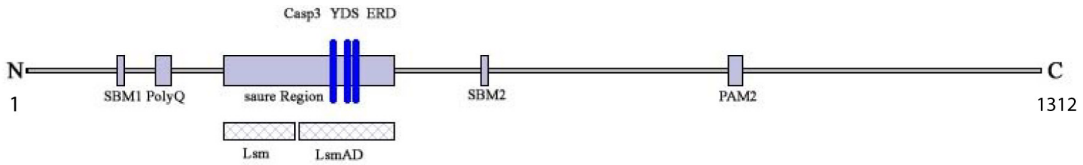

Abbildung 1: Schematische Darstellung von Ataxin 2. Ataxin-2 beeinhaltet eine PolyQ-Domäne (As 166-187) und eine saure Region (254-475), die aus LSm (254-345) und LSmAD-Domäne (353-475) besteht; folgende bekannte Motive finden sich in der Sequenz: YDS (As 414.416), ERD (As 426-428), Casp3 (396-399), PAM2 (908-925), SBM 1 (As 117-126) und SBM2 (587-596)

Die biologische Funktion von ATX2 ist noch nicht verstanden, obwohl es Hinweise gibt, dass es am zellulärem RNA-Metabolismus beteiligt ist. Alle bisher bekannten Sm/LSm-Proteine sind am RNA-Metabolismus beteiligt. Die LSm-Domäne ist eine hoch konservierte Domäne und enthält die SM-Motive SM1 und SM2, die durch einen Linker verbunden sind [30, 31]. Sm-Proteine sind am Aufbau der snRNPs beteiligt, indem sie einen heteroheptameren Ring ausbilden, der die snRNA (U1-U5) im Nukleus bindet. Auch die Lsm-Proteine 1-8 oligomerisieren und binden einzelsträngige RNA [30]. LSm-Proteine sind in RNA-Prozessen, wie z.B. Spleißen, Decapping und im RNA-Abbau involviert.

Auch scheinen die Homologe von ATX2 eine Rolle im RNA-Metabolismus zu spielen. Homologe von ATX2 sind hochkonserviert, was die Domänenstruktur betrifft, jedoch scheint die Polyglutamineinheit für die Funktion des Proteins nicht essentiell zu sein, da sie nicht konserviert ist. Das funktional am besten charakterisierte Homolog von ATX2 ist das Pab1-binding protein 1 (Pbp1; *S. cerevisae)*. Das umfangreiche Interaktionsnetzwerk [1] von Pbp1

(Abb. 2) verdeutlicht, dass Pbp1 am RNA-Metabolismus, wie z.B. RNA-editing, pre-mRNA-Spleißen und dem Export von mRNA beteiligt ist.

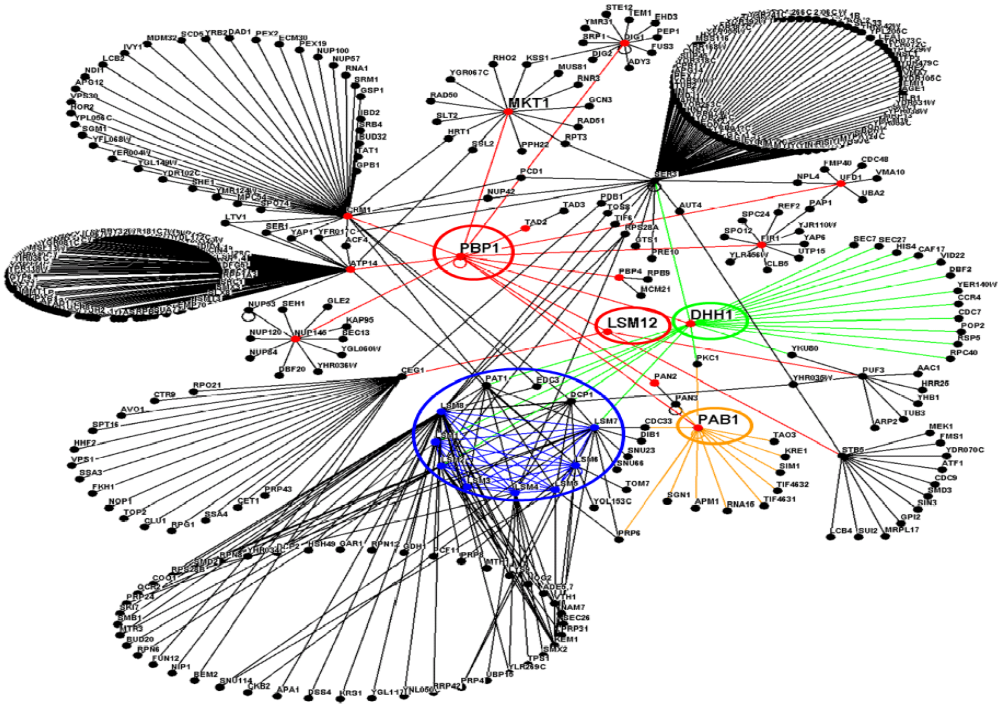

Abbildung 2: Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk von Pbp1, dem Hefehomolog von Ataxin-2 [1].

Pbp1 interagiert mit Pab1, dem Hefehomolog des humanen Poly-A-Binding Protein (PABP). *S. cerevisae*, die kein Pbp1 exprimiert, ist nicht mehr in der Lage mRNA vollständig zu polyadenylieren. Pbp1 besitzt strukturell gesehen sowohl die LSm, als auch die LSm assoziierte Domäne.

Interessanterweise ist humanes ATX2 in der Lage Pbp1 in *S. cerevisae* zu komplementieren [1]. Zudem konnte das humane PABP auch als ein Interaktionspartner von ATX2 identifiziert werden [1]. Die Interaktion wird wahrscheinlich über die PAM2-Domäne von ATX2 vermittelt. PABP ist an der Translations-Initiation und Regulation des mRNA-Abbaus beteiligt und assoziiert mit der Poly-A-Sequenz der mRNA. Es konnte gezeigt werden, dass ATX2, wie PABP, in sogenannte Stress Granules (SG) rekrutiert wird [1]. SGs sind dynamische Strukturen, in denen die mRNA-Stabilität reguliert wird. Sie enthalten neben der mRNA, Translations-Initiations-Faktoren, die mRNA-Bindeproteine TIA und TIAR und die 40S-Ribosomen-Untereinheit. Sie stehen im Gleichgewicht mit den Polysomen und bilden sich sehr schnell im Cytoplasma unter Stressbedingungen, wie z.B. UV-Strahlung und Hitzestress [32-35].

Auch konnten Ciosk et al konnten in *C. elegans* mittels RNAi zeigen, dass die Interaktion der *C.elegans*-Homologen von ATX2 (ATX2) und PABP (PAB-C) entscheidend für die Keimbahnentwicklung ist. Die Proliferation der Keimzellen bei reduziertem ATX2-Level ist

gestört. Auch auf die frühe Embryonalentwicklung in *C.elegans* hat eine verminderte ATX2-Konzentration einen starken Einfluss [37]. Im Gegensatz dazu hat das Fehlen von ATX2 keinen Einfluß auf die Embryonalentwicklung und die Lebensspanne in knock-out-Mäusen [38]. Weitere Hinweise für eine potentielle Rolle im mRNA-Metabolismus wurden über Yeast-Two-Hybrid-Analysen gefunden. Das A2BP (ATX2 binding protein) konnte als ein Interaktionspartner von ATX2 identifiziert werden. Beide Proteine kolokalisieren im Trans-Golgi-Netzwerk. Über die Funktion von A2BP ist wenig bekannt. Es enthält ein Ribonukleoprotein (RNP)-Motiv. Das RNP-Motiv ist eine RNA-Bindedomäne, die hochkonserviert ist und in vielen RNA-bindenden Proteinen vorhanden ist. [36].

Desweiteren interagiert humanes ATX2 mit zwei Mitgliedern der Endophilin A-Familie, Endophilin A3 und A1 [39]. Die Endophiline kolokalisieren mit Aktin-Filamenten und Mikrotubuli, spielen eine Rolle bei der Clathrin-vermittelten Endocytose und sind an Signalprozessen beteiligt [40]. Es wird vermutet, dass die Endophiline als Adapterproteine fungieren, die verschiedene zelluläre Abläufe, wie z.B. Vesikelbildung, Signaltransduktion und Endocytose verknüpfen und koordinieren [40]. Eine Überexpressionsanalyse von ATX2 und den Endophilin-Proteinen in einem Fimbrin-defizienten Hefestamm zeigte, das die Expression in diesem genetischen Hintergrund letal ist [39]. Die humanen Orthologe von Fimbrin sind T- und L-Plastin. T-Plastin besitzt Aktin-bindende Eigenschaften, stabilisiert Aktin-Filament-Strukturen und ist an der Aktinfilamentbildung beteiligt. Die Überexpression von ATX2 in Säugerzellen führt zu einer cytoplasmatischen Akkumulierung von T-Plastin [39]. Interessanterweise wurde für das *Drosophila melanogaster* ATX2-Homolog Datx2 nachgewiesen, dass es ein dosisabhängiger Regulator der Aktinfilamentbildung ist. Bei veränderter Daxt2-Aktivität kommt es zu gravierenden morphologischen Veränderungen und Degenerierung von Geweben, weiblicher Sterilität und Letalität, die auf Fehlfunktion in der Aktin-Filament-Bildung zurückzuführen sind. Da ATX2 selbst nicht mit Aktin interagiert, könnten diese Phänotypen auf einer fehlgesteuerten Kontrolle der mRNA-Stabilität oder Translation beruhen [41].

1.4. Zielsetzung

Der pathologische Mechanismus der neurodegenerativen Erkrankung SCA2 ist weitgehend unbekannt. Das *SCA2*-Gen kodiert für das Protein ATX2, über dessen zelluläre Funktion wenig bekannt ist. Jedoch gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von ATX2 am zellulären RNA-Metabolismus. Eine Möglichkeit weitere Einblicke in die Funktion von ATX2 zu erhalten, ist die Identifizierung von Protein-Interaktionenpartnern. Da Pbp1 und ATX2 funktional verwandt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, die in einem Hochdurchsatzverfahren gefundene Interaktion von Pbp1 mit der DEAD-Box-RNA-Helikase Dhh1, für die humanen Proteine ATX2 und DDX6 (DEAD-Box Protein 6), zu überprüfen und näher zu charakterisieren. DHH1 spielt eine wichtige Rolle im mRNA-Metabolismus und ist an der Regulation des Decappings und der Translation beteiligt [42, 43]. Außerdem sollte überprüft werden, ob eine verlängerte PolyQ-Einheit einen Einfluss auf diese Interaktion besitzt. Zu diesem Zweck sollte das Yeast-Two-Hybrid-System angewendet und zusätzlich die potentielle Interaktion mittels Koimmunopräzipitation verifiziert werden. Im folgendem sollte die Interaktion mittels RNAi-Technik und Überexpressionsanalysen weitergehend charakterisiert werden. Diese Resultate könnten eine mögliche Beteiligung von ATX2 im RNA-Metabolismus bekräftigen und möglicherweise Einblicke in den Pathomechanismus von SCA2 erlauben.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Materialien

Substanz	Hersteller
Adenin	Sigma-Aldrich
Agarose	Invitrogen
Ammoniumchlorid ($NH_4(Cl)_2$)	Merck
Ammoniumsulfat	Merck
Ampizillin	Sigma-Aldrich
Bakto-Agar	Becton, Dickson and company
Bakto-Pepton	Difko
Bakto-Trypton	Sigma-Aldrich
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
CSM (Complete Supplement Mixture) -ADE; -HIS; -LEU; -TRP; -URA	Bio 101 Systems
Dikaliumphosphat (K_2PO_4)	Merck
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraactat (EDTA)	Sigma-Aldrich
Glukose	Merck
Glyzerin	Merck
Glyzin	Merck
Hefe-Extrakt	Difko
Histidin	Sigma-Aldrich
Hoechst (bisBenzimide)	Sigma-Aldrich
Isopropanol (2-Propanol)	Merck
Kaliumacetat (KaAc)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Leuzin	Sigma-Aldrich
Liziumazetat (LiAc)	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid ($MgCl_2$)	Merck

Substanz	Hersteller
Magnesiumsulfat ($MgSO_4$)	Merck
Methanol	Merck
Natriumazid (NaN_3)	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck/Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PEG 3350 (Polyethylenglykol)	Sigma-Aldrich
Penizillin/Streptomyzin (Pen/Strep)	Roche
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich
Protease Inhibitor (Complete PI Cocktail Tablets)	Roche
Rotiphorese	Roth
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Invitrogen
Tris (Trizma Base)	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Merck
Trypsin	Biochrom AG
Tryptophan	Sigma-Aldrich
Tween	Roth
Urazil	Sigma-Aldrich
X-Gal (5-Bromo-4-chlor0-3-indolyl-ß-D-Galactosid)	Sigma-Aldrich
Xylenzyanoblau	Sigma-Aldrich
YNB (Yeast Nitrogen Base)	Difco

2.1.2. Lösungen und Puffer

Lösungen und Puffer	Inhalt
Blockpuffer	5 % Milchpulver 1x PBS
β-Gal-Puffer	1x Z-Puffer 1 M X-Gal-Lösung 1 M DTT
Blottpuffer (5x) Es werden 200 ml Blottpuffer (5x) und 200 ml Methanol auf 1L mit Wasser aufgefüllt	240 mM Tris 200 mM Glyzin 0,185 % SDS
Elektrophoresepuffer (10x)	250 mM Tris 192 mM Glyzin 1 % SDS
Hefetransformations-Lösung 1	100 mM Lithiumactetat 1 M Sorbitol 5 mM TE
Hefetransformations-Lösung 2	100 mM Lithiumacetat 40 % PEG 3350 5 mM TE
Ladepuffer (Agarosegelelektrophorese)	4 % Glyzerin 0,05 % Bromphenolblau 0,05 % Xylenzyanolblau
Laemmli-Puffer (5x)	250 mM Tris (pH 6,8) 10 % SDS 0,5 % Bromphenolblau 50 % Glyzerin 10 % DTT
Mounting-Medium	90 µl 90 % Glyzerin in PBS 10 µl p-Phenylendiamin (1 mg/ml)
PBS(10x)	2 g/L KCl 2,4 g/L KH_2PO_4 80 g/L NaCl 14,2 g/L Na_2HPO_4
RNAse III-Reaktionspuffer pH 7,9	20 mM Tris 0,5 mM EDTA 5 mM $MgCl_2$ 1 mM DTT 140 mM NaCl 2,7 mM KCl
SQ-Lösung	4 M Betain 10 % DMSO

Lösungen und Puffer	Inhalt
	0,5 µg/µl BSA 10 mM DTT
TAE-Puffer (10x)	10 mM Tris 5 mM Eisessig 0,5 mM EDTA
TE-Puffer pH 7,5	10 mM Tris 1 mM EDTA
Trenngelpuffer (4x) pH 8,8	30 mM Tris 0,1 % SDS
Vent-Polymerase-Puffer pH 8,8	1 mM KCL 1 mM $(NH_4)_2SO_4$ 2 mM Tris 0,01 % Triton X- 100
X-Gal-Lösung	1 M X-Gal 2 % DMF
Zellkulturlysepuffer	20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 % Triton X-100 1 µl/10ml Benzonase 1:25 Proteaseinhibitor
Z-Puffer pH 7	60 mM Na_2HPO_4*$2H_2O$ 40 mM NaH_2PO_4*H_2O 10 mM KCl 1 mM $MgSO_4$*$7H_2O$

2.1.3. Medien

2.1.3.1. Bakterienmedien

Medium	Inhalt
Luria-Bertani-Medium (LB)* pH 7,0	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
LB/Ampizillin-Medium*	1 % Bakto-Pepton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl 100 µg/ml Ampizillin

2.1.3.2. Hefemedien

Medium	Inhalt
Yeast Peptone Dextrose (YPD)-Medium* pH 6,5	20 g/L Bakto-Trypton 10 g/L Hefe-Extrakt 20 g/L Glucose
SD II-Medium*	20 g/L Glucose 6,7 g/L YNB 0,2 g/L Adenin 0,2 g/L Urazil 0,2 g/L Histidin
SD IV-Medium*	20 g/L Glucose 6,7 g/L YNB
SC -HIS +Glucose-Medium*	20 g/L Glucose 6,7 g/L YNB 0,59 g/L CSM 0,2 g/L Adenin 0,2 g/L Urazil 0,2 g/L Tryptophan 0,2 g/L Leuzin
SC-HIS +Galactose-Medium*	20 g/L Galaktose 6,7 g/L YNB 0,59 g/ L CSM 0,2 g/L Adenin 0,2 g/L Urazil 0,2 g/L Tryptophan 0,2 g/L Leuzin

*Für die entsprechenden Festmedien wurde pro L 17 g Bakto-Agar hinzugefügt.

2.1.3.3. Zellkulturmedien

Medium	Inhalt
DMEM-Zellkulturmedium	500 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (Gibco) 10 % FCS 1 % Pen/Strep

2.1.4. Mikroorganismen

2.1.4.1. *E.coli*

Name	Genotyp	Quelle
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F´ proAB laclqZ.M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene

2.1.4.2. *S. cerevisae*

Name	Genotyp	Quelle
L40ccua	MAT a his 3D200 trp1-901 leu2-3, 112 LYS2::(lexAop)4- HIS3TATA- HIS3 ura3::(lexAp)8- Gal1TATA-lacZ ADE2::(lexAop)8-Gal1TATA-URA3 Gal80 Can1 cyh2	Prof.Dr. Erich Wanker Max-Delbrück-Zentrum Berlin
yRP2065	MATa, ura3, his3, leu2	Roy Parker, Howard Hughes Medical Institute, University of Arizona
yRP2066	MATa, ura3, his3, leu2, dhh1::NEO	Roy Parker, Howard Hughes Medical Institute, University of Arizona
BY4741	MATa, his3Δ1; leu2Δ0, met15Δ0, ura3Δ0	Jef D. Boeke Johns Hopkins University School of Medicine,Baltimore
BY4741 Δpbp1	Mat a; his3□1; leu2□0; met15□0; ura3□0; YGR178c::kanMX4	Jef D. Boeke Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore

2.1.5. Säugerzellen

Zell-Linie	Beschreibung
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen
SH-SY5Y	Humane Neuroblastomazellen

2.1.6. Plasmide

2.1.6.1. pACT4-1b

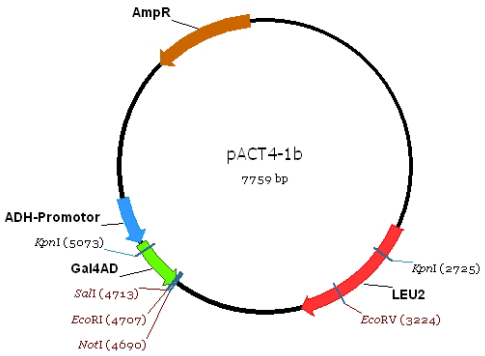

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Y2H-Vektors pAct4-1b.

Als Prey-Plasmid wurde pACT4-1b verwendet. pACT4-1b enthält die Gal4-Aktivierungsdomäne und besitzt als Auxotrophiemarker das Leu2-Gen. Als Selektionsmarker dient Ampizillin. Dieser Vektor wurde von Prof. Erich Wanker, MDC Berlin, zur Verfügung gestellt. Die Expression der Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-Promotors.

2.1.6.2. pBTM117c

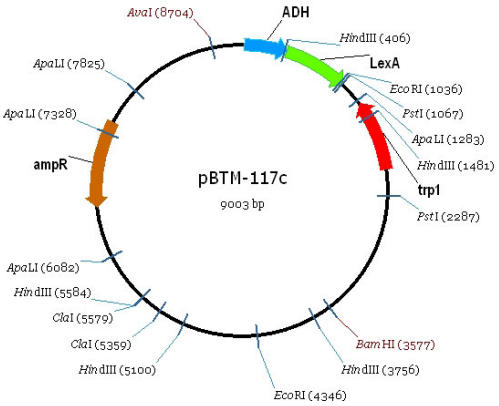

Abbildung 4: Schematische Darstellung des Y2H-Vektors pBTM-117c.

Das Baitplasmid enthält die LexA-Bindedomäne, besitzt als Selektionsmarker ein Ampizillin-Resistenz-Gen und als Auxotrophiemarker das *TRP1*-Gen. Die Expression der Fusionsproteine steht unter der Kontrolle des Alkoholdehydrogenase-Promotors. Die entsprechenden Bait-Plasmide, welche für die Sequenzen für die ATX2-Fusionsproteine beinhalten [39], sind im folgenden aufgelistet:

pBTM117c-ATX2(Q22)$_{1\text{-}396}$ und pBTM117c-ATX2(Q79)$_{1\text{-}396}$: Das entsprechende LexA-Fusionsprotein umfasst den N-terminalen Bereich von Ataxin-2 (AS 1-396) mit 22 oder 79 Glutaminen sowie die Lsm-Domäne.

pBTM117c-ATX2$_{254\text{-}475}$: Das entsprechende Fusionsprotein umfasst die LSm- und die LSm assoziierte Domäne von Ataxin-2.

pBTM118-ATX2$_{481\text{-}815}$: Das entsprechende Fusionsprotein beinhaltet die Aminosäure-sequenz 481-815 von Ataxin-2.

pBTM116-ATX2$_{816\text{-}1313}$: Das entsprechende Fusionsprotein umfasst den C-terminalen Bereich (AS 816-1313), also auch die PAM2-Domäne, von Ataxin-2.

2.1.6.3. p423Gall

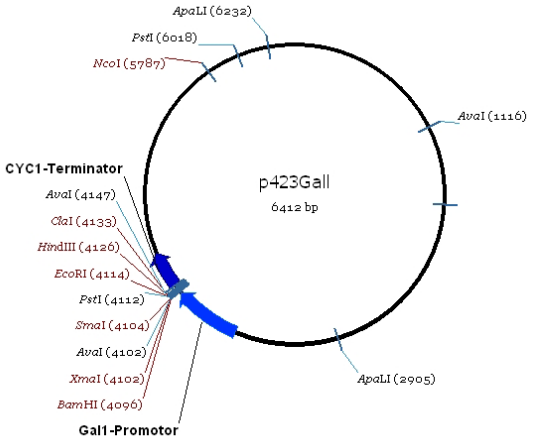

Abbildung 5: Schematische Darstellung des Hefe-Expressionsvektors p423Gall.

Das Plasmid p423Gall besitzt den induzierbaren Gal1-Promotor. Als Selektionsmarker besitzt dieser Vektor ein Ampizillin-Resistenzgen und als Auxotrophiemarker dient das *HIS3*-Gen. Die Vektoren p423Gall-ATX2 (22), p423Gall-ATX2 (39) und p423Gall-ATX2 (79) waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden [39].

2.1.6.4. pTL-FlagC

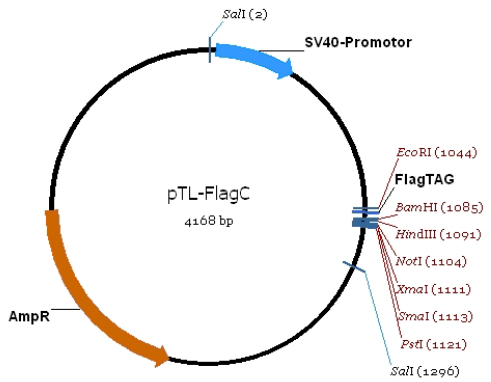

Abbildung 6: Schematische Darstellung des Säuger-Expressionsvektors pTL-FlagC.

Dieser Vektor wurde verwendet, um Proteine N-Terminal mit dem Flag-Epitop zu fusionieren. Der Vektor wurde von Prof. Erich Wanker, MDC Berlin, zur Verfügung gestellt.

2.1.6.5. pTL-HA

Dieser Vektor wurde verwendet, um Proteine N-Terminal mit dem HA-Epitop zu fusionieren. pTL-HA wurde ebenfalls von Prof. Erich Wanker, MDC Berlin, zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten pTL-FlagC-Plasmide enthalten die Sequenzen für Ataxin-2 und die Ataxin-2-Fragmente und waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden [39].

pTL-HA-ATX2(Q22)$_{1-396}$ und pTL-HA-ATX2(Q79)$_{1-396}$: Beide Plasmide enthalten Sequenzen, die für den N-terminalen Bereich von Ataxin-2 (AS 1-396), der den Polyglutaminbereich mit 22 oder 79 Glutaminen und die LSm-Domäne umfasst, kodieren.

pTL-HA-ATX2$_{254-475}$: Das entsprechende HA-Fusionsprotein umfasst die LSm- und die LSm assoziierte Domäne von Ataxin-2.

pTL-HA-ATX2$_{481-815}$: Das entsprechende HA-Fusionsprotein umfasst die Aminosäuresequenz 481-815 von Ataxin-2.

pTL-HA-ATX2$_{816-1313}$: Das entsprechende HA-Fusionsprotein umfasst den C-terminalen Bereich (AS 816-1313) von Ataxin-2.

2.1.7. Enzyme

2.1.7.1. Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase

Für die Amplifizierung von DDX6 aus einer humanen fötalen Hirn-cDNA-Bank (HFB) von Clontech wurde die Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase von Finnzymes nach den Angaben des Herstellers verwendet.

2.1.7.2. Vent-Polymerase

Diese Polymerase der Firma Firma New England Biolabs (NEB) wurde für die Verifizierung von *E.coli*-Transformanten mittels Kolonie-PCR nach den Angaben des Herstellers, verwendet.

2.1.7.3. Alkaline Phosphatase

Um die 5`-Enden von linearisierten Plasmiden zu dephosphorylieren, wurde Antarctic Phosphatase von NEB, nach den Angaben des Herstellers, verwendet.

2.1.7.4. Restriktionsenzyme

Folgende Restriktionsenzyme wurden im Laufe der Arbeit verwendet: SalI, NotI, BamHI, EcoRI und XhoI. Alle Enzyme wurden von der Firma NEB bezogen und nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.7.5. Ligase

Es wurde die T4-DNA-Ligase von NEB, nach Herstellerangaben, für die Ligation von DNA-Fragmenten in linearisierte Plasmide verwendet.

2.1.7.6. RNAse III

Zur Herstellung von esiRNA-Molekülen wurde RNAse III eingesetzt. Dieses Enzym wurde von Dr. Katarina Bilikova, MPI für molekulare Genetik, aufgereinigt und zur Verfügung gestellt.

2.1.8. Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden für die Amplifizierung und Sequenzierung von DDX6 aus der HFB (Clontech) eingesetzt:

Name	Sequenz	Hersteller
DDX6-CDS-s-Sal1	GAGTCGACAATGGGTCTGTCCAGTCAAAA	Sigma Aldrich
DDX6-as-Not1	TATAGCGGCCGCTGTCAAAGCATGCTTGTT	MWG Biotech
DDX6 1104 antisense	GATCAGTGCAAACAAGATTG	Invitrogen
DDX6 392 sense	ATGGAACAGGCAAGAGCGGT	Invitrogen

esiRNAi-Oligonukleotide für die Herstellung von esiRNA:

Name	Sequenz
esiRNA DDX6 Sense	CGTAATACGACTCACTATAGGGGAAGGGAGTAACCCAGTACTACG
esiRNA DDX6 antisense	CGTAATACGACTCACTATAGGGAAAAGAAAATGTCTGAGCTCTAAGTCTT

Die T7-Promotor-Sequenz ist rot markiert.

2.1.9. Antikörper

Name	Organismus	Hersteller	Verdünnung für Westernblot	Verdünnung für Mikroskopie
anti-DDX6-N-Terminus	Kaninchen	Novus Biologicals	1: 5000	1:500
anti-DDX6-C-Terminus	Kaninchen	Novus Biologicals	1:5000	1:500
anti-Ataxin-2	Maus	BD Bioscience	1:500	1:200
anti-Dcp1	Kaninchen	Bertrand Seraphin, Centre de Genetique Moleculaire, Gif-sur-Yvette	-	1:900
anti-Flag	Kaninchen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	1:5000	-
anti-HA	Maus	Roche Diagnostics	1:5000	1:500
Peroxidasegekoppelter anti-Maus-Antikörper		Sigma-Aldrich Chemie GmbH	1:10000	-
Peroxidasegekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper		Sigma-Aldrich Chemie GmbH	1:10000	-
Cy3-anti-Kaninchen		Jackson ImmunoResearch	-	1:500
Fitc-anti-Maus		Jackson ImmunoResearch	-	1:500
anti-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH	1:5000	-
Dynabead anti-Maus IgG	Schaf	Dynal Biotech	-	-
Dynabead anti-Kaninchen IgG	Schaf	Dynal Biotech	-	-

2.1.10. Protein- und DNA-Standards

DNA-Standard:

Als DNA-Marker für die Agarosegelelektrophorese wurde der „1 kb DNA Ladder“ und der „100 bp DNA Ladder“ von NEB verwendet.

RNA-Standard:

Als RNA-Marker für die Agarosegelelektrophorese wurde der „RiboRuler™ RNA Ladder, Ultra Low Range“ von Fermentas verwendet.

Protein-Standard:

Für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurde der „Prestained Protein Marker Broad Range“ von NEB oder der „PageRuler peqGOLD Prestained Protein-Marker III“ von peqlab verwendet.

Alle Marker wurden nach Herstellerangaben verwendet.

2.2. Methoden

2.2.1. Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) können DNA-Abschnitte amplifiziert werden. Um die DDX6-kodierende Region aus einer fötalen, aus humanen Gehirn gewonnene cDNA-Bank (HFB von Clontech), zu amplifizieren, wurden die Oligonukleotide DDX6-CDS-s-SalI und DDX6-as-NotI verwendet. Eine PCR-Reaktion enthielt:

0,4 µl dNTPs (Endkonzentration 200 µM)
10 µl 5x Phusion-Puffer
1 µl sense Primer (Endkonzentration 0,4 µM)
1 µl antisense Primer (Endkonzentration 0,4 µM)
1 µl HFB
1 µl Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Endkonzentration 2 Units)
35,6 µl Wasser

Verwendet wurde ein Thermozykler der Firma MJ Research. Mit folgendem Programm wurde die PCR durchgeführt:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Denaturierung	96°C	5 Minuten
2	Denaturierung	96°C	30 Sekunden
3	Annealing	60°C	45 Sekunden
4	Elongation	72°C	50 Sekunden
5	Elongation	72°C	5 Minuten

Die Schritte 2 – 4 wurden in 35 Zyklen wiederholt.
Im Anschluss wurden 5 µl des PCR-Ansatzes mit 5x Ladepuffer versetzt und eine Agarosegelelektrophorese zur Überprüfung des Produktes durchgeführt, wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben.

Im Falle einer Kolonie-PCR zur Überprüfung von Plasmiden in *E.coli*, wurden die *E.coli*-Klone in den entsprechenden PCR-Puffer eingerührt. Ein PCR-Ansatz enthielt in diesem Falle Vent-Polymerase, den entsprechenden Vent-Polymerase-Puffer, 6 µl 25 mM Magnesiumsulfat und zusätzlich noch pro Ansatz 5 µl SQ-Lösung. Es wurden hier nur 25 Zyklen des PCR-Programms durchgeführt.

2.2.2. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen. Dazu wurde der PCR-Ansatz mit dem fünffachen Volumen an PB-Puffer versetzt, gemischt und auf eine QIAquick-Säule gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm für eine Minute. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (13000 rpm; 1Minute) wurde die DNA mit 40 µl sterilem Wasser eluiert.

2.2.3. Enzymatische Modifizierung von DNA

2.2.3.1. Restriktionsverdau

Um DNA einem Restriktionsverdau zu unterziehen, wurden die vom Hersteller angegebenen Einheiten an Restriktionsenzym und der entsprechende Puffer verwendet. Die Ansätze wurden für 2-4 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.3.2. Dephosphorylierung

Zur 5`-Dephosphorylierung linearisierter und gereinigter Plasmid-DNA wurde diese mit 1 µl Antarctic-Phosphatase und 1x Antarctic-Puffer versetzt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde der Ansatz anschließend für 10 Minuten bei 65°C inkubiert.

2.2.4. Ligation

Zur Ligation von linearisiertem Vektor und DNA-Fragment, wurden diese in einem 20 µl-Ansatz mit 2 µl T4-DNA-Ligase-Puffer und 1 µl T4-DNA-Ligase versetzt. Die Ligationsreaktion erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.2.5. Transformation von *E.coli*

50 µl chemisch kompetente Zellen (XL1-Blue) wurden mit dem Ligationsansatz gemischt und eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sekunden bei 42°C. Anschließend wurde der Ansatz sofort wieder auf Eis überführt. Nach Zugabe von 800 µl LB-Medium wurden die Ansätze für eine Stunde bei 37°C und 500 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze auf LB-Platten mit Ampizillin ausplattiert und die Platten für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Transformanten auf die Anwesenheit des Konstrukts mittels Kolonie-PCR überprüft, wie unter Punkt 2.2.1 beschrieben. Bei einem positiven Befund, wurde der entsprechende *E.coli*-Klon in LB/Amp-

Medium angezogen und ein Glyzerolstock der Kultur angelegt. Anschließend erfolgte eine Isolierung der Plasmid-DNA, um über einen Restriktionsverdau das Konstrukt weitergehend zu überprüfen (siehe 2.2.6 und 2.2.3.1).

2.2.6. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde das E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit 1 (Classic-Line) verwendet. Die entsprechenden *E.coli*-Transformanten wurden in 3 ml LB-Medium mit Ampizillin bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert (1 Minute; 130000 rpm) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Lösung 1/ RNAaseA resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 250 µl Lösung 2 und einer Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde das Lysat durch Zugabe von 350 µl Lösung 3 neutralisiert und zentrifugiert (5 Minuten; 13000 rpm). Der Überstand wurde auf eine HiBind-Miniprep-Zentrifugensäule geladen und zentrifugiert (1 Minute; 130000 rpm). Im Danach zwei Waschschritte mit 500 µl HB-Puffer und 750 µl DNA-Waschpuffer und anschließender Zentrifugation (1 Minute; 130000 rpm). Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde, zur vollständigen Entfernung des Ethanols erneut zentrifugiert (1 Minute; 130000 rpm). Die Plasmid-DNA wurde mit 50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.2.7. Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung oder Aufreinigung von DNA-Konstrukten wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 % Agarose in TAE-Puffer gelöst, mit Ethidiumbromid versetzt und in die Gelkammer gegossen. Die entsprechenden DNA-Proben wurden mit 10x Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels geladen. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 30-45 Minuten bei 100 mA.

2.2.8. Aufreinigung eines DNA-Fragmentes aus einem Agarosegel

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte über QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen. Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde die entsprechende Bande am UV-Tisch möglichst exakt ausgeschnitten. Das Gelstück wurde mit dem dreifachen Volumen an QG-Puffer versetzt und der Ansatz für ca. 10 Minuten bei 50°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit dem einfachen Volumen an Isopropanol versetzt, gemischt und der Ansatz auf eine QIAquick-Säule aufgetragen und zentrifugiert (1 Minute; 130000 rpm). Im Anschluss wurde mit 500 µl QG-Puffer und mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Um sicherzustellen, dass alles Ethanol aus der Säule entfernt werden konnte, wurde nach dem letzten Waschritt ein zweites Mal zentrifugiert (1 Minute; 130000 rpm). Anschließend wurde die DNA mit 30-50 µl sterilem Wasser eluiert.

2.2.9. Sequenzierung

Um zu überprüfen, ob das gewünschte DNA-Fragment im richtigen Leseraster und ohne Mutationen in den Zielvektor eingefügt wurde, wurde das entsprechende DNA-Konstrukt sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte bei Dr. M. Meixner am DLMBC-Service-Zentrum, Institut für Genetik der Humbold-Universität Berlin.

2.2.10. Transformation von *S. cerevisae*

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in 2 ml YPD-Medium bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (O.D.) bei 600 nm gemessen und eine neue Kultur mit einer O.D. von 0,3 mit YPD-Medium eingestellt. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Kultur für ca. vier Stunden bei 30°C bis eine O.D. von ca. 0,6 bis 0,8 erreicht war. Nach Zentrifugation (2000 rpm; 5 Minuten) der Hefekultur, wurde das Pellet in 10 ml TE-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (2000 rpm; 5 Minuten). Die sedimentierten Zellen wurden in 1 ml Hefetransformations-Lösung 1 aufgenommen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 30 µl der Hefezellen mit 1 µg Plasmid-DNA, 5 µl Heringssperma-DNA (c = 2 µg/µl) und 230 µl Hefetransformations-Lösung 2 versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Ansätze für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Vor dem Hitzeschock (7 Minuten bei 42°C), erfolgte eine Zugabe von 30 µl DMSO. Die Hefezellen wurden zentrifugiert (5000 rpm; 3 Minuten), in 50 µl Wasser aufgenommen und auf das entsprechende Selektionsmedium ausplattiert. Die Platten wurden für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

2.2.11. Yeast-Two-Hybrid-System

Das Yeast-Two-Hybrid System (Y2H) ist eine Methode, mit der man Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* nachweisen kann. Das Prinzip des Y2H beruht darauf, dass Transkriptionsfaktoren zwei Domänen besitzen, eine DNA-Bindedomäne (BD) und eine Polymerase II-Aktivierungsdomäne (AD). Um eine Interaktion von Proteinen zu testen werden Aktivierungs- und Bindedomäne jeweils an eines der zu testenden Proteine fusioniert. Das hier verwendete Prey-Plasmid pACT4-1b enthält die Sequenzen für die Gal4-Aktivierungsdomäne und die pBTM-Bait-Plasmide für die LexA-Bindedomäne. Der verwendete Hefestamm L40ccua besitzt die Reportergene *HIS3*, *LacZ* und *URA 3*, die von Promotoren transkribiert werden, die unter Kontrolle der GAL1-upstream activating sequence (UAS) stehen, welche die Gal4-BD erkennt.
Wenn ein BD-Fusionsprotein (Bait-Protein) mit einem AD-Fusionsprotein (Prey-Protein) interagiert, befinden sich beide Domänen in räumlicher Nähe und fungieren als vollständiger Transkriptionsfaktor. In diesem Fall kommt es zu einer Transkription der folgenden Reportergene.

2.2.11.1. Yeast-Two-Hybrid-Analysen

Ein Nachteil dieses Systems ist, dass durch Autoaktivierer (Transkription der Reportergene ohne spezifische Interaktion) falsch positive Ergebnisse auftreten können. Diese können daraus resultieren, dass z.B. das Bait-Protein selber eine Aktivierungsdomäne, oder aber seltener das Prey-Protein eine kompatible BD enthält und damit zur Transkription führt. Eine weitere Möglichkeit ist, dass es sich bei einem der beiden untersuchten Proteine, um ein Protein handelt, dass physiologisch mit vielen Proteinen „unspezifisch" interagiert.
Um auszuschließen, dass die verwendeten Konstrukte ohne einen Interaktionspartner in der Lage sind die Transktiption der Reportergene auszulösen, wurde erst einmal ein Test auf Autoaktivierung durchgeführt. Dafür wurde das Prey-Plasmid zusammen mit dem Bait-Vektor, der nur die Sequenz der BD enthält, in den Hefestamm L40ccua kotransformiert. Nach der Transformation (siehe 2.2.10) wurde die Hefesuspension auf SD II-Medium ausplattiert und die Platten für 3 Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden einzelne Transformanten in 100 µl sterilem Wasser in Mikrotiterplatten eingerührt und, zur Überprüfung der Aktivität der Reportergene, auf eine SDII-Platte, eine SDIV-Platte und eine SDII-Membran gestempelt. Die Platten wurden 3 Tage bei 30°C inkubiert und das Wachstum analysiert. Die Transkription des *lacZ*-Gens wurde mittels β-Galactosidase-Assay überprüft. Dafür wurde eine sterile Schale mit 2 Stück Whatmanpapier, welche mit β-Gal-Puffer getränkt wurden, ausgelegt. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch Inkubation der Membran in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde die Membran auf das Whatmanpapier gelegt und für 3-4 Stunden bei 37 °C inkubiert. Wenn keine Aktivität der drei Reportergene nachgewiesen werden konnte, also keine Autoaktivierung vorlag, konnte damit ein Y2H-Test durchgeführt werden. Dafür wurde das Prey-Plasmid jeweils mit den Ataxin-2-Bait-Konstrukten kotransformiert und auf SDII-Medium ausplattiert. Die Platten wurden für drei Tage bei 30°C inkubiert. Jeweils 6 Transformanten wurden in 100 µl Wasser in Mikrotiterplatten eingerührt und auf eine SDII-Platte, eine SDIV-Platte und eine SDII-Membran gestempelt. Nach Inkubation von 3-4 Tagen bei 30°C wurde mit der Membran ein β-Galaktosidase-Assay durchgeführt und das Wachstum auf SDII und SDIV überprüft.

2.2.12. Zellkultur

Die Zell-Linien COS1, HEK293T und SH-SY5Y wurden in 20 ml DMEM /Penizillin/Streptavidin (PenStrep)-Medium bei 37°C und 6 % CO_2 kultiviert. Zur Kultivierung wurden die Zellen alle 3-4 Tage in neue Flaschen mit einer Konfluenz von 20-30 % umgesetzt. Dazu wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurden diese mit 1 ml 1x Trypsin versetzt und für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in 10-15 ml DMEM/PenStrep aufgenommen und 0,5 ml dieser Suspension in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml

frischem Zellkulturmedium/PenStrep überführt. Alle Reagentien wurden vor Verwendung bei 37°C inkubiert.

2.2.12.1. Koimmunopräzipitation

Die Koimmunopräzipitation ist eine Methode mit der mögliche Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* überprüft werden können. Dazu wird einer der potentiellen Interaktionspartner mit einem spezifischen Antikörper aus den Zell-Lysaten isoliert. Der entsprechende Interaktionspartner sollte an dieses Protein assoziiert sein und sich dann mit einem spezifischen Antikörper nachweisen lassen. Man kann Koimmunopräzipitationen mit endogenen oder transient überexprimierten Proteinen durchführen. Für die Koimmunopräzipitation von endogenen Proteinen wurden HEK293T und SH-SY5Y-Zellen verwendet. Die Zellen, die zu 50-70% konfluent waren, wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und mit 400 µl (6 well-Platten) oder 250 µl (12well-Platten) Zellkultur-Lysepuffer versetzt und zur Lyse der Zellen für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration der Lysate mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt. Dazu wurde in einer Plastik-Küvette 800 µl PBS und 200 µl Bio-Rad-Lösung gemischt. Anschließend wurden jeweils 5 µl des Lysates hinzupipettiert. Die optische Dichte wurde bei 595 nm gemessen. Als Nullwert dienten 5 µl des Lysepuffers.
Für die Koimmunopräzipitation wurden jeweils 500 µg Protein des entsprechenden Lysats verwendet. Der Ansatz wurde auf einem Rollrad für eine Stunde bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Dabei handelte es sich entweder um Maus-anti-Ataxin-Antikörper (5 µl) oder um Kaninchen-anti-DDX6 (N-Terminus)-Antikörper (1 µl). Als Kontrolle wurde jeweils eine Probe gleicher Proteinmenge ohne den Primärantikörper eingesetzt. Anschließend wurden pro Ansatz 15 µl Magnet-Dynabeads (anti-Maus-IgG- oder anti-Kaninchen-IgG beschichtet) vorbereitet, indem sie zweimal mit PBS/3 % BSA gewaschen und in 15 µl PBS/3 % BSA aufgenommen wurden. Diese wurden dann zu den entsprechenden Ansätzen dazugegeben und drei Stunden auf dem Rollrad bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden die Dynabeads zweimal mit PBS/3 % BSA und zweimal mit PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen, die Dynabeads in 15 µl Laemmlipuffer aufgenommen und die Ansätze zur Elution der Proteine für fünf Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert.

2.2.12.2. Transfektion von Säugerzellen

Bei der Transfektion von Säugerzellen werden Säugerexpressionplasmide mit einem Transfektionsreagens inkubiert, wobei es zur Ausbildung von Komplexen zwischen Plasmid und Transfektionsreagens kommt, welche an die Zellmembran binden. Dieser Komplex wird dann durch unspezifische Endocytose von den Zellen aufgenommen.

Für die Transfektion wurden die entsprechenden Zell-Linien verwendet, die zu 50-70% konfluent waren. 1 µg der Plasmid-DNA wurde mit 100 µl DMEM-Medium ohne FCS/Penstrep und Polyfect Transfektions Reagens (Qiagen) versetzt. Die Menge des eingesetzten Transfektionsreagens richtet sich nach der Zell-Linie. Für COS1-Zellen wurden 8 µl und für SH-SY5Y 12 µl eingesetzt. Anschließend wurden diese Ansätze für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, mit 600 µl DMEM/PenStrep-Medium versetzt und zu den Zellen gegeben, die einmal mit sterilem PBS gewaschen und mit 1,5 ml frischem DMEM/PenStrep-Medium versetzt worden waren. Anschließend wurden die Zellen für 24-48 Stunden bei 37°C und 6% CO_2 inkubiert und dann für weitere Analysen eingesetzt.

2.2.13. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-PAGE ist eine Methode, um Proteingemische elektrophoretisch unter denaturierenden Bedingungen ihrer molekularen Masse nach zu trennen.
Für die Herstellung eines SDS-Gels wurde das Mini Protean 3 System von Biorad verwendet. Im ersten Schritt wurde ein 10 %iges Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dessen Polymerisierung wurde das Isopropanol vollständig entfernt und ein 5 %iges Sammelgel gegossen. Die Gelkammer wurde zusammengebaut und mit 1x Elektrophoresepuffer gefüllt. Im Anschluss wurde das Gel mit den Proben beladen. Als Marker wurden 10 µl Prestained Protein Marker auf das Gel aufgetragen. Zum Sammeln der Proben als dinstinkte Bande im Sammelgel wurde die Elektrophorese für ca. 15 Minuten bei 70 V durchgeführt. Anschließend wurde die Voltzahl auf 180 erhöht.

2.2.14. Western-Blot

Beim Westernblot handelt es sich um eine Methode, mit der man Proteine, die vorher elektrophoretisch aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert, wo diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen gebunden bleiben. Eingesetzt wurde das Semidry-Blotsystem PerfectBlue von peqlab. Auf die Anode wurden drei in Blotpuffer getränkte Whatmanpapiere gelegt. Darauf folgte die ebenfalls in Blottpuffer getränkte Nitrozellulosemembran. Auf die Membran wurde das Gel gelegt, gefolgt von drei in Blotpuffer getränkten Whatmanpapieren. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 mA für eine Stunde.

2.2.15. Immunnachweis von Proteinen

Nach erfolgtem Proteintransfer (2.2.14) wurde die Nitrozellulosemembran für eine Stunde in Blockpuffer inkubiert und zweimal mit PBS für 10 Minuten gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem Primärantikörper (1:2000 bis 1:5000 in 0,5% BSA und 0,02% NaN_2 in PBS) für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut mit PBS (2x 10 Minuten) gewaschen und mit dem Peroxidasegekoppelten

Sekundärantikörper (1:10000 in 2% Milchpulver in PBS) für 1-3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, bevor erneut mit PBS (2x 10 Minuten) gewaschen wurde. Der enzymatische Nachweis erfolgte mit Super Signal West Femto Trial Kit von PerkinElmer Life Science. Dieses Reagenz enthält Luminol, welches durch die Peroxidase oxidiert wird. Bei dieser Reaktion wird Licht bei 428 nm emittiert, wodurch die Antikörperbindung auf einem lichtempfindlichem Film (Kodack XAR5) visualisiert wird.

2.2.16. RNAi-Experimente

Als RNAi bezeichnet man einen posttranskriptionellen Vorgang, bei dem doppelsträngige (ds) RNA (z.B. virale RNA) durch das Enzym DICER, das zu den RNAsen Typ III gehört, in einzelsträngige 21-23 bp lange Fragmente gespalten wird, die short interfering RNAs (siRNA) genannt werden. Diese siRNA-Moleküle binden komplementär an Ziel-mRNA und bewirken so in Zusammenarbeit mit dem Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) den Abbau dieser mRNA. Das führt dazu, dass die Translation des entsprechenden Proteins stark eingeschränkt ist. Dieser zelleigene Mechanismus kann für die gezielte Reduktion der Expression von Proteinen ausgenutzt werden.

2.2.16.1. Herstellung der esiRNA

Um esiRNA-Moleküle herstellen zu können, die so spezifisch sind, dass es nicht in einem zu starken Ausmaß zu Überlappungen mit anderen mRNA-Sequenzen kommt, wurde die Software Deqor (http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html) verwendet. Diese Software dient dazu, den entsprechenden Abschnitt in der Ziel-mRNA zu identifizieren.

Im Anschluss wurden für die Sequenz Oligonukleotide generiert, an die jeweils die T7-Promotor-Sequenz angehängt wurde (2.1.8). Mithilfe dieser Oligonukleotide wurde das Fragment aus der HFB amplifiziert. Hierbei ist darauf zu achten, dass das entsprechende Fragment zwischen 500 und 1000 Basenpaare (bp) lang ist, da sonst die Prozessivität der RNAse III im späteren Verlauf eingeschränkt ist. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt, in 40 µl sterilem RNAse freien Wasser eluiert und durch Agarose-gelelektrophorese überprüft. Bei guter Ausbeute erfolgte im nächsten Schritt die *in vitro*-Transkription des DNA-Fragments, um doppelsträngige RNA zu erhalten. Dafür wurde das „MEGAscript™“ T7 *in vitro* transcription kit von Ambion verwendet. Folgender Reaktionsansatz wurde erstellt:

250 ng PCR-Produkt
8 µl NTPs
2 µl 10x T7-Reaktionspuffer
2 µl T7 Enzym-Mix

ad 20 µl Nuklease freies Wasser

Folgendes PCR-Programm wurden in einem Gradientenzykler der Firma MJ Research durchgeführt:

	Schritt	Temperatur	Zeit
1	Transkription	37°C	4 Stunden
2	Annealing	90°C	3 Minuten
3		Senkung der Temperatur um 0,1°C/30 s auf 30°C	
4		30°C	1 Stunde 30 Minuten
5		25°C	1 Stunde
6		7°C	unendlich

Im Anschluss wurde 1 µl der PCR-Reaktion in Nuklease-freien Wasser verdünnt (1:20) und die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop gemessen. Außerdem wurde der Erfolg der *in vitro* Transkription über eine Agarosegelelektrophorese überprüft. Bei entsprechend ausreichender Konzentration erfolgte die Inkubation der dsRNA mit RNAse III, um 18-25 bp große esiRNA-Moleküle zu erhalten. Dazu wurden 40 µg der dsRNA mit 100 µl RNAse III-Reaktionspuffer und mit 4 µl RNAse III für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Um zu überprüfen, ob die Restriktion der dsRNA erfolgreich war, wurden 3 µl des Ansatzes auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Bei einem positiven Ergebnis wurde die Reaktion durch die Zugabe von 4 µl 0,5 M EDTA pH 8 gestoppt. Dann wurde die esiRNA aufgereinigt. Für die Aufreinigung wurden 200 µl Q-Sepharose FastFlow (Amersham Biosciences) und 500 µl Equilibrierungspuffer in eine Micro-Bio-Spin Chromatographie-Säule der Firma BioRad Laboratories gegeben und für eine Minute bei 1000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Equilibrierungspuffer gewaschen. Die Probe wurde auf die Säule geladen und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation wurde die Säule mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und erneut zentrifugiert, wobei in beiden Schritten der Durchfluss verworfen wurde. Im Anschluss daran wurden 300 µl Elutionspuffer auf die Säule gegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und der Elutionsschritt wiederholt. Im nächsten Schritt wurde zur Fällung der esiRNA 500 µl Isopropanol dazu gegeben und die Ansätze für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 15 Minuten bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet zweimal mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen. Das RNA-Pellet wurde dann luftgetrocknet, in 20 µl Nuklease freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration mittels Nanodrop ermittelt.

2.2.16.2. Transfektion von COS1- und SH-SY5Y-Zellen mit esiRNA-Molekülen

Für die Transfektion von esiRNA-Molekülen wurden jeweils $6*10^4$ Zellen in 6-Well-Platten umgesetzt und mit DMEM/PenStrep-Medium auf 1,1 ml aufgefüllt. 200 ng der esi-RNA wurden in 100 µl DMEM-Medium aufgenommen und 6 µl (COS1) oder 8 µl (SH-SY5Y) HIPerfect von Qiagen dazugegeben. Diese Ansätze wurden für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, und die RNA-Ansätze anschließend in die entsprechenden Wells gegeben. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37°C und 6% CO_2 inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder für einen Immunnachweis lysiert oder für die Mikroskopie vorbereitet (siehe 2.2.17). Als Kontrollen erfolgten Transfektionen mit einer unspezifischen non-silencing RNA und eine Behandlung mit HIPerfect ohne Zugabe einer RNA.

2.2.17. Fluoreszenzmikroskopie

Um die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen zu analysieren, eignet sich die Fluoreszenzmikroskopie. Dabei werden endogene oder transient exprimierte Proteine mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper sichtbar gemacht. Um die Lokalisation von ATX2 und DDX6 zu untersuchen, wurden die entsprechenden Zellen auf Deckgläsern kultiviert und für Überexpressionsanalysen oder RNAi-Experimente mit einem Konstrukt transfiziert. Sie sollten für die Mikroskopie eine Konfluenz von ca. 80 % aufweisen. Anschließend wurden die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und dann für 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Zellen mit 0,05 % Triton X-100 in PBS (3x 5 Minuten; RT) gewaschen, um die Zellmembranen durchlässig zu machen. Daraufhin erfolgte eine Inkubation in PBS/ 3 % BSA (30 Minuten), um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Im nächsten Schritt wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur mit den entsprechenden primären Antikörpern inkubiert. Nach dreimaligen Waschen mit 0,05 % Triton X-100 in PBS erfolgte die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern (1h, RT). Im Folgenden wurden die Ansätze zweimal mit 0,05 % Triton X-100 in PBS und zweimal mit PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Zellkernfärbung mit Hoechst (1:600 in 0,05% Triton X-100 in PBS) für 45 Sekunden. Es wurde einmal mit 50 mM Ammoniumchlorid und zweimal mit PBS für 5 Minuten gewaschen. Nach weiteren zwei Waschschritten mit PBS wurden das Deckglas auf einen Objektträger mit einem Tropfen Mountingmedium gelegt. Die konfokale Mikroskopie erfolgte an einem Laserscanning Mikroskop LSM510 Meta der Firma Zeiss.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der Interaktion von ATX2 und DDX6

Aufgrund der strukturellen und funktionellen Konservierung von Pbp1/ATX2 und Dhh1/DDX6 sollte in dieser Arbeit überprüft werden, ob die Interaktion der Hefehomolge Pbp1 und Dhh1 auf das humane System übertragen werden kann. Interessanterweise ist auch Dhh1 am zellulären RNA-Metabolismus beteiligt. Das humane Homolog von Dhh1 ist die RNA-Helikase DDX6. Da DDX6 in der Lage ist, Dhh1 in einem dhh1-Deletionsstamm zu komplementieren, spricht das auch dafür, dass dieses Protein konserviert ist.

3.1.1. Charakterisierung der Interaktion von ATX2 und DDX6 mittels Y2H-Analyse

3.1.1.1. Klonierung des Y2H-Vektors pACT4-1b DDX6

Um zu überprüfen, ob eine Interaktion von ATX2 und DDX6 vorliegt, sollte zunächst eine Yeast-Two-Hybrid-Analyse durchgeführt werden, da mit dieser Methode direkte Protein-Protein-Interaktionen nachgewiesen werden können. Dazu musste zunächst ein DDX6-Prey-Protein hergestellt werden, die entsprechenden Bait-Proteine waren in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden [39]. Dafür wurde die kodierende Sequenz von DDX6 aus einer HFB-cDNA Bank (Clontech) mittels PCR amplifiziert. Als Primer-Paar wurden die Oligonukleotide DDX6-CDS-s-SalI und DDX6-as-NotI verwendet, welche für Klonierungszwecke an den 5`-Enden die Erkennungssequenzen für SalI bzw. NotI enthalten. Die PCR erfolgte wie unter 2.2.1 beschrieben, bei einer Annealingtemperatur von 60°C. Anschließend wurden 5 µl der PCR-Ansätze mit Ladepuffer versetzt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert, ob das richtige Amplifikat vorhanden war (Abb. 7).

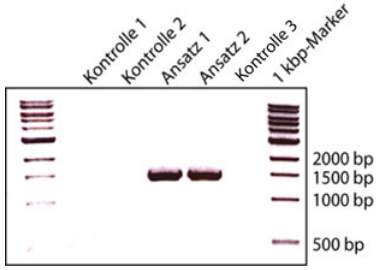

Abb. 7: Überprüfung der PCR zur Amplifizierung der kodierenden Sequenz von DDX6. Darstellung eines 1% Agarosegels; Kontrolle 1: PCR-Ansatz ohne antisense-Primer; Kontrolle 2: PCR-Ansatz ohne sense-Primer; Ansatz 1 und 2: PCR-Ansatz; Kontrolle 3: ohne Template

Wie in Abbildung 7 ersichtlich, wurden DNA-Fragmente einer Länge von 1500 bp amplifiziert, welches der Länge der kodierenden Sequenz von DDX6 (1419 bp) entspricht. Deshalb wurden die PCR-Ansätze mittels „QIAquick PCR Purification Kit“, wie unter Punkt 2.2.2

beschrieben, aufgereinigt und mit 40 µl sterilem Wasser eluiert. Im Anschluss wurde das DNA-Fragment mit den Restriktionsendonukleasen SalI und NotI behandelt und erneut mittels „QIAquick PCR Purification Kit“ aufgereinigt. Der Prey-Vektor pACT4-1b (2.1.6.1) wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonuklesen SalI und NotI behandelt. Anschließend wurde der linearisierte Vektor durch eine Agarasoegelelektrophorese von dem nicht-linearisierten Vektor getrennt, ausgeschnitten und mittels „Qiaquick gel extraction kit“ aufgereinigt (siehe 2.2.8). Nach der Aufreinigung wurde der Vektor mit Antarctic Phosphatase behandelt (siehe 2.2.3.2), um das 5`-Ende zu dephosphorylieren und damit eine Religation des Vektors zu verhindern. Im Anschluss erfolgte die Ligation und Transformation in *E.coli* wie unter 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben und die erhaltenen *E.coli*-Kolonien wurden auf die Anwesenheit des entsprechenden Plasmids hin überprüft. Hierzu wurden 7 *E.coli*-Klone auf eine LB/AMP-Platte ausgestrichen und einer Kolonie-PCR unterzogen (3.2.1). Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte anschließend über eine Agarosegelelektrophorese (Abb.8).

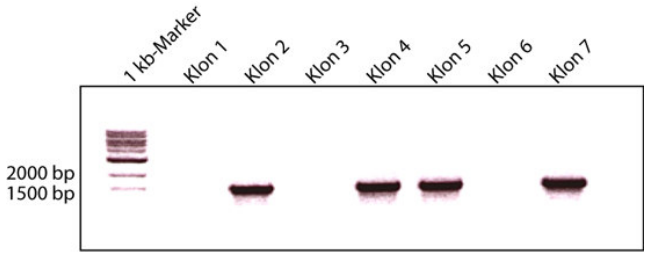

Abb. 8: Verifizierung des Plasmids pACT4-1b-DDX6 mittels Kolonie-PCR. Darstellung eines 1% Agarosegels.

Wie aus Abbildung 8 ersichtlich, konnte bei 4 der getesteten 7 Transformanten ein DNA-Fragment der richtigen Länge (1500 bp) amplifiziert werden. Zur weiteren Analyse wurden diese 4 Transformanten über Nacht in LB/Amp-Medium angezogen und nachfolgend die Plasmid-DNA, wie in Punkt 2.2.6 beschrieben, isoliert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA zweier Klone mit den Restriktionsendonukleasen SalI und NotI behandelt. Zur Analyse des Restriktionsverdaus wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt (Abb. 9).

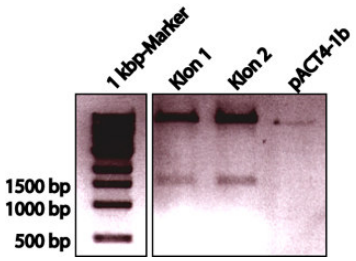

Abb. 9: Restriktionsverdau mit SalI und NotI zur Kontrolle der isolierten pACT4-1b-DDX6-Plasmide. Als Kontrolle wurde der Vektor pACT4-1b ebenfalls mit SalI/NotI behandelt. Darstellung eines 1% Agarosegels.

Beide Klone zeigten zusätzlich zur Vektorbande eine weitere Bande bei ca. 1500 bp (Abb. 9), so dass davon auszugehen ist, dass die entsprechende DNA-Sequenz in den Vektor integriert worden ist.
Nachfolgend wurde eine Sequenzanalyse der beiden Klone vorgenommen, um zu überprüfen, ob das DDX6-Fragment mutationsfrei amplifiziert wurde. Diese Sequenzanalyse ergab, dass keine Mutationen in der Sequenz von Klon 1 vorlag, hingegen Klon 2 eine Punktmutation aufwies. Der Klon 1 wurde nachfolgend als pACT4-1b-DDX6 bezeichnet und für die Y2H-Analyse eingesetzt.

3.1.1.2. Yeast-Two-Hybrid-Analyse

Das Y2H-System beruht darauf, dass zwei potentielle Interaktionspartner jeweils an eine Aktivierungs- bzw. eine Bindedomäne fusioniert und diese Fusionsproteine in Hefe koexprimiert werden. Bei einer Interaktion der Fusionsproteine kommen beide Domänen in räumliche Nähe und sind damit in der Lage als Transkriptionsfaktor zu fungieren, was zur Transkription der Reportergene führt.
Damit ausgeschlossen werden kann, dass die Fusionsproteine per se in der Lage sind die Transkription der Reportergene auszulösen und somit falsch positive Ergebnisse hervorgerufen werden können (Autoaktivierung), wurde zunächst das Fusionsprotein Gal4AD-DDX6 auf Autoaktivierung getestet. Hierzu wurden der Prey-Vektor pACT4-1b-DDX6 und der Bait-Vektor pBTM117c, der nur die LexA-Bindedomäne beinhaltet, in den Hefestamm L40ccua kotransformiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf SDII-Medium ausplattiert und vier der resultierenden Hefeklone zur Überprüfung der Aktivität der Reportergene auf SDIV-Medium und auf eine SDII-Membran gestempelt. Anschließend wurden die Platten für 3 Tage bei 30°C inkubiert und die Aktivität der Reportergene überprüft.
Wie aus Abbildung 10 ersichtlich wird, konnte bei keinem der Klone ein Wachstum auf SDIV-Medium festgestellt werden. Zudem war auch der β-Galaktosidase-Assay negativ, d.h. es konnte keine β-Galaktosidaseaktivität nachgewiesen werden (Abb. 10). Somit ist das Fusionsprotein Gal4AD-DDX6 nicht autoaktivierend und konnte für die entsprechende Y2H-Analyse verwendet werden.

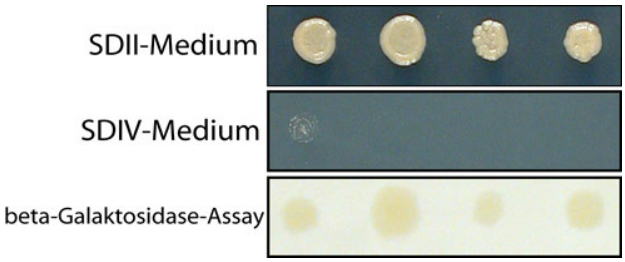

Abb. 10: Autoaktivierungstest von pACT4-1b-DDX6. Alle 4 Klone wurden mit pBTM117c und pACT4-1b-DDX6 kotransformiert.

Um nun zu überprüfen, ob ATX2 und die RNA-Helikase DDX6 im Y2H-System interagieren, wurden die Baitvektoren pBTM117c, pBTM117c-ATX2(Q22)$_{1-396}$, pBTM117c-ATX2(Q79)$_{1-396}$, pBTM117c-ATX2$_{254-475}$, pBTM118-ATX2$_{481-815}$ und pBTM116-ATX2$_{816-1313}$ verwendet. Die ATX2-Baitproteine sind im Voraus schon von Markus Ralser auf Autoaktivität getestet worden [39]. In diesen Analysen wurde ausgeschlossen, dass die entsprechenden LexA-Fusionsproteine autoaktiv sind.

Die entsprechenden Bait-Vektoren wurden jeweils mit dem Vektor pACT4-1b-DDX6 in den Hefestamm L40ccua kotransformiert und die Transformationsansätze auf SDII-Medium ausplattiert. Nach dreitägiger Inkubation bei 30°C wurden jeweils 4 der Transformanten isoliert und auf SDII- und SDIV-Medium, sowie auf eine SDII-Membran gestempelt. Anschließend wurden die Platten für 3 Tage bei 30°C inkubiert und nachfolgend das Wachstum der Hefeklone und die Aktivität des LacZ-Reportergens analysiert.

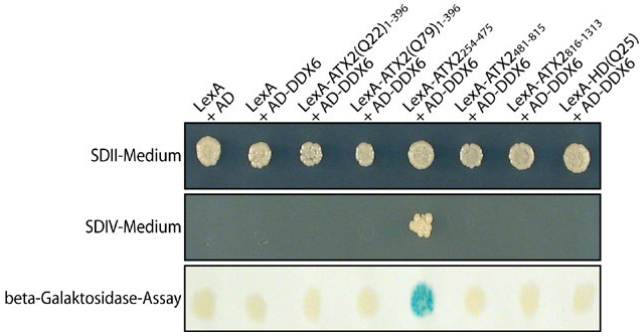

Abb. 11: Y2H-Analyse von DDX6 und den ATX2-Fragmenten. Dargestellt ist jeweils ein Klon, der entsprechenden Kotransformationen.

Es zeigte sich, dass Hefezellen, die die Fusionsproteine LexA-ATX2$_{254-475}$ (LSm/LSmAD) und Gal4AD-DDX6 koexprimierten, in der Lage waren auf SDIV-Medium zu wachsen, d.h. die Reportergene *HIS3* und *URA3* wurden aktiviert. Zudem zeigte auch der β-Galaktosidase-Assay eine Blaufärbung, was auf die Aktivität der β-Galaktosidase und damit eine Transkription des *lacZ*-Reportergens, zurückzuführen ist (Abb. 11). Hingegen konnte keine Reportergenaktivität für Hefezellen detektiert werden, die das Fusionsprotein GAL4AD-DDX6 in Kombination mit den anderen LexA-ATX2-Fusionsproteinen exprimierten. Somit konnte mit dieser Analyse, die Interaktion von DDX6 und ATX2 im Yeast-Two-Hybrid System nachgewiesen werden, wobei für die Interaktion die Lsm/LsmAD von ATX2 verantwortlich ist. Anhand dieses Experimentes zeigte sich, dass die Y2H-Interaktion von Pbp1 und der RNA-Helikase Dhh1 auf das humane System übertragbar ist.

3.1.2. Expression von ATX2 bzw. DDX6 in den Δdhh1- bzw. Δpbp1-Stämmen

Zusätzlich zur Identifizierung der Interaktion von ATX2 und DDX6 im Y2H-System sollte nun zunächst überprüft werden, ob beide Proteine in gemeinsamen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Dazu wurden Deletionsstämme von Pbp1 und Dhh1 verwendet, und der jeweilige humane Interaktionspartner in diesen Stämmen überexprimiert, um zu überprüfen, ob eine genetische Wechselwirkung vorliegt und damit eine Veränderung im Phänotyp auftritt.

3.1.2.1. Klonierung des Hefeexpressionsvektors p423Gall-DDX6

Um zu überprüfen, ob die Expression von humanen DDX6 einen Einfluss auf den Phänotyp des Pbp1-Deletionsstammes besitzt, wurde die kodierende Sequenz von DDX6 in den Hefeexpressionsvektor p423Gall kloniert. Hierzu wurde das Fragment mittels der Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI aus dem Vektor pTL-FlagC-DDX6 isoliert und über ein Agarosegel aufgereinigt. Der Vektor p423Gall wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI linearisiert, über ein Agarosegel aufgereinigt und mit Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Im Anschluss erfolgte die Ligation und Transformation in *E.coli* wie unter 2.2.4 und 2.2.5 beschrieben. Die erhaltenen *E.coli*-Kolonien wurden auf die Anwesenheit des entsprechenden Plasmids hin überprüft. Hierzu wurden 16 *E.coli*-Klone auf eine LB/AMP-Platte ausgestrichen und einer Kolonie-PCR unterzogen (siehe 3.2.1). Die Analyse der Kolonie-PCR erfolgte mittels Agarosegel-elektrophorese (Abb. 12).

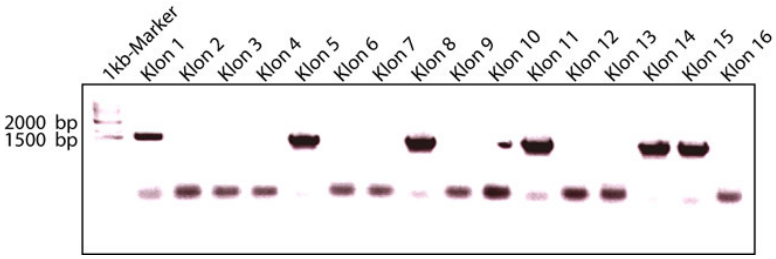

Abb. 12: Verifizierung des Plasmids p423Gall-DDX6 mittels Kolonie-PCR. Darstellung eines 1% Agarosegels.

Diese Analyse ergab, dass bei 6 der 16 Transformanten ein DNA-Fragment der entsprechenden Länge von 1500 bp amplifiziert werden konnte (Klon 1, 5, 8, 11, 14 und 15). Zur weiteren Überprüfung wurden vier dieser Klone über Nacht in LB/Amp-Medium angezogen. Anschließend wurde die Plasmid-DNA, wie in Punkt 2.2.6 beschrieben, isoliert und mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI behandelt, um die Anwesenheit des „Inserts“ zu überprüfen. Die Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 13).

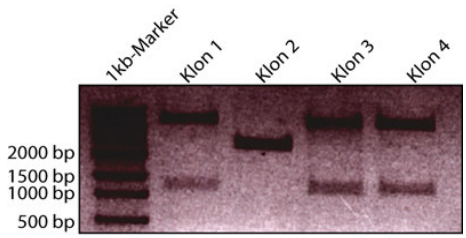

Abb. 13: Restriktionsverdau mit BamHI und SalI zur Kontrolle der isolierten p423Gall-DDX6-Plasmide. Darstellung eines 1% Agarosegels.

In Abbildung 13 ist das entsprechende Agarosegel dargestellt. Es zeigte sich, dass bei der DNA der Klone 1, 3 und 4, neben der Vektorbande, eine zusätzliche Bande von 1500 bp auftritt. Das spricht dafür, dass bei diesen Plasmiden, das entsprechende Fragment inseriert wurde. Bei der DNA von Klon 2 ist diese Bande nicht vorhanden. Mit dem Plasmid Nummer 3 wurde im folgenden weitergearbeitet und der entsprechende Vektor als p423Gall-DDX6 bezeichnet.

3.1.2.2. Phänotypische Analysen der Expression von ATX2 bzw. DDX6

Für den Test auf eine genetische Wechselwirkung wurden die Deletionsstämme BY4741 Δpbp1 und yRP2066 (Δdhh1) und die entsprechenden Wildtyp-Stämme, BY4741 und yRP2065, verwendet. Der Vektor p423 Gall-DDX6 wurde in den Wildtyp BY4741 und in den Deletionsstamm BY4741 Δpbp1 transformiert, um den Einfluss der Expression von DDX6 in einem pbp1-Deletionsstamm zu analysieren. Um zu überprüfen, ob die Expression von humanen ATX2 mit 22 oder 79 Glutaminen einen Einfluss auf den Phänotyp eines dhh1-Deletionsstammes hat und damit eine genetische Wechselwirkung vorliegt, wurden die entsprechenden Vektoren p423Gall-ATX2-(22), p423Gall-ATX2 (39) und p423Gall-ATX2 (79) [39], sowohl in den Wildtyp yRP2065, als auch in den entsprechenden Deletionsstamm yRP2066 transformiert. Als Kontrolle wurden alle Stämme ebenfalls mit dem Vektor p423Gall transformiert. Die Ansätze wurden auf SC-HIS+Glucose-Medium ausplattiert und 3 Tage bei 30°C inkubiert. Da das Plasmid p423Gall einen induzierbaren Gal1-Promotor besitzt, der durch Galaktose im Nährmedium aktiviert wird, lässt sich die Expression des folgenden Gens durch die Zugabe des entsprechenden Zuckers in das Nährmedium induzieren. Glucose hingegen reprimiert diesen Promotor. Die verwendeten Stämme sind auxotroph für die Synthese von Histidin, so dass es hier als Selektionsmarker diente. Zur Analyse wurden die entsprechenden Klone in 100 µl sterilem Wasser eingerührt und auf eine SC-HIS+Glucose-Platte sowie eine SC-HIS+Galaktose-Platte gestempelt. Diese Platten wurden anschließend für 3 Tage bei 30°C inkubiert.

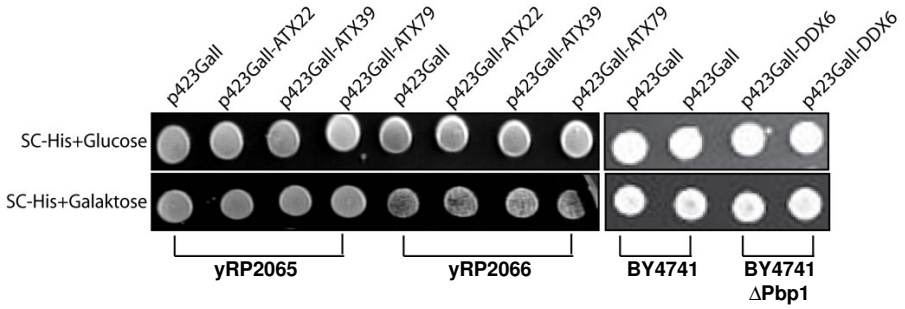

Abb. 14: yRP2065 und yRP2066 transformiert mit p423Gall, p423Gall ATX2 (22), p423Gall ATX2 (39) und p423Gall ATX2 (79); und BY4741 und BY4741Δpbp1 transformiert mit p423Gall und p423Gall DDX6 auf SC-His+Glucose- und SC-His+Galaktose-Medium

Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, gab es keinen Unterschied im Wachstum zwischen den unterschiedlichen Hefeklonen, bei Expression von ATX2-Q22, ATX2-Q39 oder ATX2-Q79 im Wildtyp yRP2065, und bei Expression von DDX6 im BY4741-Wildtyp-Stamm. Entsprechendes galt auch für die Deletions-Transformanten yRP2066 (ATX2 Q22, ATX2 Q39 oder ATX2 Q79) und BY4741 Δpbp1 (DDX6). Auch hier konnten unter diesen Bedingungen keine Unterschiede im Wachstum, bezüglich der Kontrolle und im Vergleich zum Wildtyp, festgestellt werden.

3.1.3. Nachweis der Interaktion von ATX2 und DDX6 in Säugerzellen

Im weiteren Verlauf sollten die Resultate der Y2H-Analyse *in vivo* in einem Säugersystem verifiziert werden. Zu diesem Zweck sollte eine Koimmunopräzipitation (2.2.12.1) mit endogen exprimierten Proteinen durchgeführt werden. Deshalb wurde zunächst überprüft, ob die zur Verfügung stehenden Zell-Linien DDX6 exprimieren. Dazu wurden COS1-, HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen kultiviert und, wie unter 2.2.12.1 beschrieben, lysiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden gleiche Proteinmengen der Lysate mit Laemmli-Puffer versetzt und eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2.2.13) durchgeführt. Die aufgetrennten Proteine im SDS-Gel wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (2.2.14) und ein Immunnachweis von DDX6 durchgeführt (2.2.15). Als primärer Antikörper für den Immunnachweis von DDX6 wurde anti-DDX6-N-Terminus verwendet und als sekundärer Antikörper anti-Kaninchen-POD. Die Visualisierung der Antikörperbindung erfolgte wie unter 2.2.15 beschrieben. Diese Analyse ergab, dass in allen drei Zell-Lysaten ein entsprechendes Signal bei 54 kDa, welches der molekularen Masse von DDX6 entspricht, nachgewiesen werden konnte (Abbildung 15).

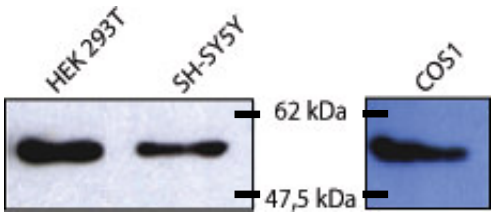

Abb.15: Nachweis der endogenen Expression von DDX6 in HEK 293T-, SH-SY5Y- und COS1-Zellen. Dargestellt ist ein Immunoblot.

Für das ATX2-Protein wurden entsprechende Analysen bereits in der Arbeitsgruppe durchgeführt und nachgewiesen, dass ATX2 ebenfalls in den drei Zell-Linien exprimiert wird.

Zum Nachweis der Interaktion von ATX2 und DDX6 wurden HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen verwendet. Der Nachweis der Interaktion in humanen Neuroblastomazellen (SH-SY5Y) ist von Bedeutung, da ATX2 mit expandierter Polyglutamineinheit speziell in neuronalen Zellen pathogen wirkt. Nach Herstellung der Lysate wurden die Ansätze mit anti-DDX6-N-Terminus inkubiert. Nachfolgend wurden die Ansätze mit anti-Kaninchen-IgG-Dynabeads behandelt, wie unter 2.2.12.1 beschrieben. Zum Nachweis, ob ATX2 in Assoziation mit DDX6 präzipitiert wurde, wurden die Ansätze einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließend einem Immunoblot unterzogen. Für den Immunnachweis wurde als primärer Antikörper anti-Ataxin-2 verwendet. Als sekundärer Antikörper diente ein anti-Maus-Antikörper, an den Peroxidase (POD) gekoppelt war. Desweiteren sollte auch analysiert werden, ob DDX6 mit einem Antikörper gegen ATX2 präzipitiert werden kann. Dazu wurden die Koimmunopräzipitationen ebenfalls mit anti-Ataxin-2 durchgeführt. Dementsprechend wurden anti-Maus-IgG-Dynabeads verwendet. Als primärer und sekundärer Antikörper für den Immunnachweis wurden anti-DDX6-N-Terminus und anti-Kaninchen-POD verwendet. Als Kontrolle diente in diesen Analysen jeweils ein Zell-Lysat, welches ausschließlich mit den Dynabeads inkubiert wurde. Dies gibt Aufschluss darüber, ob der entsprechende Interaktionspartner unspezifisch an die Dynabeads bindet.

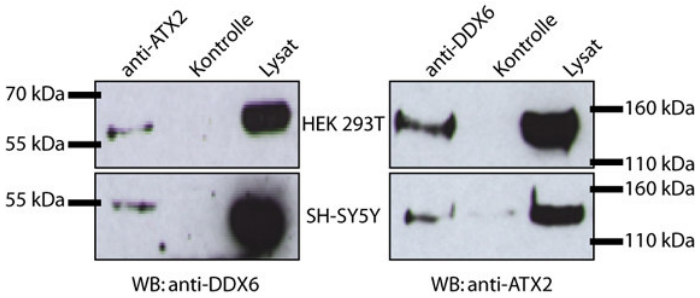

Abb.16: Nachweis der Interaktion von ATX2 und DDX6 in HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen. Dargestellt ist ein Immunoblot.

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich, ist es gelungen, sowohl ATX2 mit einem Antikörper gegen DDX6, als auch DDX6 mit einem Antikörper gegen ATX2, aus beiden Zell-Lysaten zu präzipitieren. Da in den Kontrollproben kein ATX2 bzw. DDX6 nachgewiesen werden konnte,

d.h. weder ATX2 noch DDX6 unspezifisch an die Dynabeads gebunden hat, konnte die Interaktion von DDX6 und ATX2 in zwei Säugerzell-Linien verifiziert werden.

3.1.4. Kolokalisation von ATX2 und DDX6 in Säugerzellen

Da eine Interaktion von ATX2 und DDX6 im Y2H-System und in Säugerzellen gezeigt wurde, sollte nun analysiert werden, ob beide Proteine im selben Zell-Kompartiment lokalisiert sind. Zu diesem Zweck wurden COS1-, HEK293T- sowie SH-SY5Y-Zellen, wie in Punkt 2.2.17 beschrieben, für die Mikroskopie vorbereitet (2.2.17). Als Primärantikörper wurden anti-Ataxin-2 und anti-DDX6 eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden Fitc-anti-Maus und Cy3-anti-Kaninchen Antikörper verwendet. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit Hoechst.

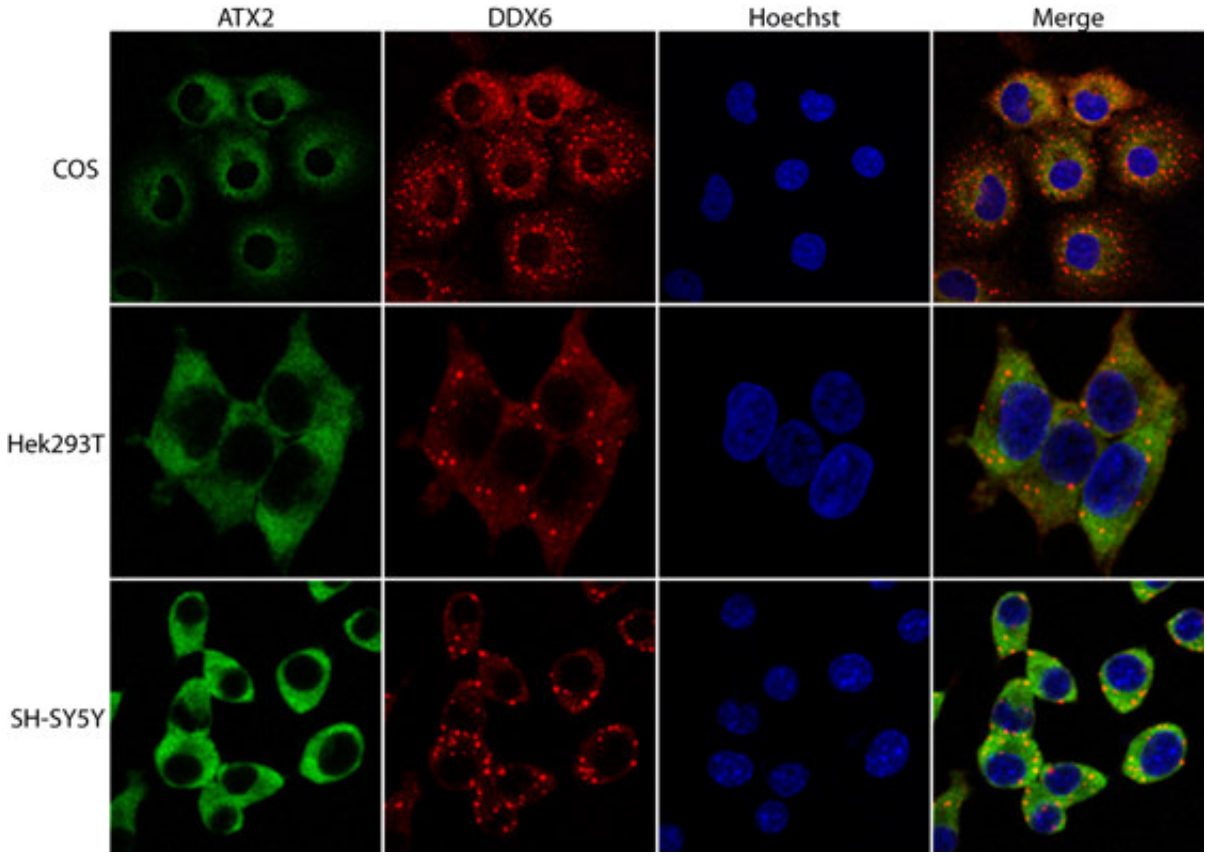

Abb. 17: Lokalisation von endogenem ATX2 und DDX6. COS1-, HEK293T- und SH-SY5Y-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst angefärbt.

Wie in Abbildung 17 ersichtlich ist DDX6 cytoplasmatisch lokalisiert, akkumuliert aber überwiegend in diskreten cytoplasmatischen Strukturen, den sogenannten P-Bodies. ATX2 hingegen zeigt keine Akkumulierung in diesen zellulären Strukturen, sondern ist gleichmäßig im Cytoplasma verteilt.

3.2. Analysen zum Einfluss der intrazellulären DDX6-Konzentration

Für die RNA-Helikase DDX6 konnte eine Überexpression in bestimmten Tumoren nachgewiesen werden, was darauf hinweist, dass DDX6 an der Entstehung und Entwicklung dieser Tumoren beteiligt sein könnte [44, 45].
Es sollte hier analysiert werden, ob eine Reduzierung bzw. Erhöhung der zellulären DDX6-Konzentration, einen Einfluss auf die Konzentration und Lokalisation von ATX2 hat.

3.2.1. Einfluss einer verringerten DDX6-Konzentration auf die zelluläre Lokalisation und Konzentration von ATX2

Zunächst sollte untersucht werden, ob eine stark verringerte DDX6-Konzentration einen Einfluss auf die endogene ATX2-Lokalisation bzw. Konzentration hat. Eine Methode, die das ermöglicht ist die RNA interference (RNAi). Dieser zelleigene Mechanismus kann für diese Art von Experimenten ausgenutzt werden, indem man Zellen mit synthetisierter si-RNA transfiziert und damit die Expression eines Zielgens unterbunden wird.

3.2.1.1. Herstellung der esiRNA

Mit Hilfe der Deqor-Software (http://cluster-1.mpi-cbg.de/Deqor/deqor.html) [46] wurde die Zielsequenz in der DDX6-mRNA so ausgewählt, dass die Überlappungen mit anderen mRNAs möglichst gering sind, um zu verhindern, dass diese ebenfalls der RNAi unterliegen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Sequenz nicht kürzer als 500 bp lang ist, da sonst die Prozessivität der RNAse III eingeschränkt ist. Im Folgenden ist die ausgewählte Sequenz der DDX6-mRNA, die 672 bp lang ist, dargestellt:

GAAGGGAGTAACCCAGTACTACGCATATGTAACTGAGCGCCAAAAAGTACACTGCCTCA
ACACACTTTTCTCCAGGCTTCAGATAAACCAGTCGATCATTTTCTGTAACTCCTCTCAGC
GAGTTGAATTGCTAGCCAAGAAGATTTCTCAACTGGGTTATTCTTGCTTCTATATTCATG
CTAAAATGAGGCAGGAACATCGAAATCGTGTATTTCATGATTTCCGAAATGGCTTATGCC
GCAATCTTGTTTGCACTGATCTGTTTACCCGAGGTATTGATATACAAGCTGTGAATGTGG
TAATAAACTTTGATTTCCCAAAGCTGGCAGAGACCTATCTCCATCGTATTGGAAGATCAG
GTCGCTTTGGTCATCTTGGCTTAGCCATCAACTTGATCACATATGATGATCGCTTCAACC
TGAAAAGTATTGAGGAGCAGCTGGGAACAGAAATTAAACCTATTCCGAGCAACATTGAT
AAGAGCCTGTATGTGGCAGAATACCACAGCGAGCCTGTAGAAGATGAGAAACCTTAACA
AGCATGCTTTGACAAATTACAAAAGGCTCGTTTGGATCTGTGACACATCGTTTTGGGGG
GAATGCTCTTCTCTTTGTGGGTTTTTCATCTTTTATTTTGGAACTATGAAGACTTAGAGCT
CAGACATTTTCTTTT

Mithilfe der Oligonukleotide esiRNA DDX6 sense und esiRNA DDX6 antisense wurde das entsprechende Fragment mittels PCR aus der HFB (Clontech) amplifiziert. Anschließend wurden die Produkte der PCR mittels Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 18).

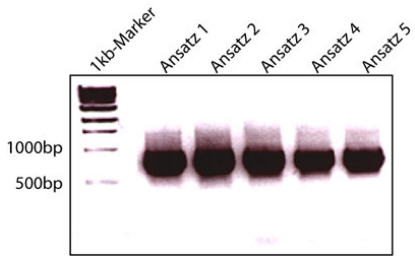

Abb. 18: Überprüfung der PCR zur Amplifizierung des RNAi DDX6-Fragments. Dargestellt ist ein 1% Agarosegel.

Wie in Abbildung 18 ersichtlich, konnte ein Fragment der entsprechenden Länge von ca. 700 bp amplifiziert werden. Nach Aufreinigung des DNA-Fragments wurde eine *in vitro* Transkription, wie unter 2.2.16.1 beschrieben, durchgeführt. Nachfolgend wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft, ob die *in vitro*-Transkription erfolgreich war. Es konnte bei beiden Ansätzen eine Bande von ca. 700 bp Länge nachgewiesen werden (Abb. 19). Diese Ansätze konnten somit zur Herstellung von esiRNA-Molekülen verwendet werden.

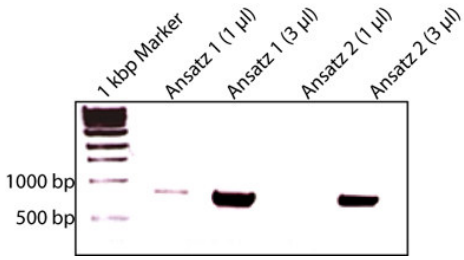

Abb.19: Überprüfung der *in vitro* Transkription des DDX6-Fragments. Dargestellt ist ein 1% Agarosegel.

Zunächst wurde die Konzentration der dsRNA bestimmt und jeweils 40 µg mit RNAse III (2.2.16.1) für eine Stunde bei 37°C behandelt. Der Erfolg der Restriktion wurde erneut mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Wie in Abbildung 20 ersichtlich, war die Restriktion von Ansatz 2 und 3 erfolgreich, da im Agarosegel Banden von einer Länge 25 bp detektiert werden konnten. Daraufhin wurde die Restriktion mittels EDTA gestoppt und die esi-RNA, wie in 2.2.16.1 beschrieben, aufgereinigt.

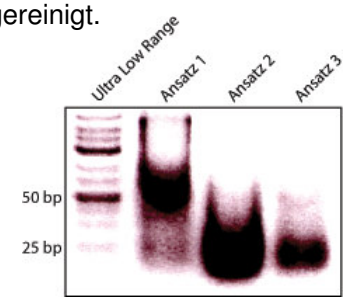

Abb. 20: Herstellung der esiRNA mittels RNAseIII-Restriktion. Dargestellt ist ein 3% Agarosegel.

3.2.1.2. RNAi

Im nächsten Schritt wurden SH-SY5Y- und COS1-Zellen, wie in Punkt 2.2.16.2 beschrieben, mit der esi-RNA transfiziert und für 72 Stunden kultiviert. Der Erfolg der DDX6-Reduktion wurde mittels Westernblot überprüft, welcher in Abbildung 21 dargestellt ist.

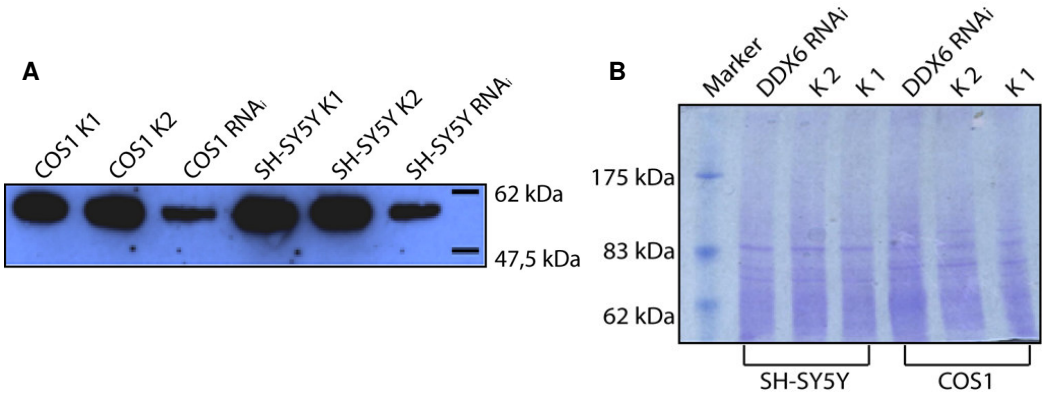

Abb. 21: Überprüfung der Reduktion von DDX6 in COS1- und SH-SY5Y-Zellen. A: Immunoblot, B: Coomassie gefärbtes SDS-Gel; Kontrolle 1: Zellen, die mit „non silencing“ RNA transfiziert wurden; Kontrolle 2: Zellen, die mit Transfektionsreagenz behandelt wurden.

Um zu überprüfen, ob gleiche Proteinmengen der Lysate aufgetragen wurde, wurden dieselben Volumina der Proben einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese unterzogen und das Gel mit Coomassie gefärbt. Wie in Abbildung 21 B ersichtlich wird, wurden gleiche Proteinmengen aufgetragen.
In allen Proben konnte im Immunblot eine Bande bei ca. 54 kDa detektiert werden (Abb. 21 A), was der molekularen Masse von DDX6 entspricht. Die Intensität der DDX6-Bande in der mit esiRNA behandelten Probe ist wesentlich geringer als in den Kontrollproben, auch wenn nach 72 Stunden noch DDX6 nachgewiesen werden konnte.

Im weiteren Verlauf wurde nun der Einfluss einer erniedrigten DDX6-Konzentration auf ATX2 analysiert. Dafür wurden COS1- und SH-SY5Y-Zellen, wie in 2.2.16.2 beschrieben, mit der DDX6-esiRNA transfiziert und auf Deckgläsern für 72 Stunden kultiviert. Als Kontrollen wurden Zellen mit einer unspezifischen „non silencing“ RNA tranfiziert, sowie ausschließlich mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Als primäre Antikörper wurden anti-Ataxin-2 und anti-DDX6-C-Terminus verwendet und dementsprechend dienten als sekundäre Antikörper Fitc-anti-Maus und Cy3-anti-Kaninchen. Um einen Vergleich der endogenen Proteinkonzentrationen zwischen den esiRNA- und den nicht-transfizierten Proben vornehmen zu können, wurden die Laser-Einstellungen bei den nicht transfizierten Proben eingestellt und für die transfizierten Proben übernommen.

In Abbildung 22 sind die entsprechenden Aufnahmen dargestellt. Die Behandlung der COS1- und SH-SY5Y-Zellen mit Transfektionsreagenz (Kontrolle), hatte keinen Einfluss auf die

Lokalisation von endogenem ATX2 oder DDX6 (Abb. 22 Reihe 1 und 3). Auch die Transfektion mit einer „non silencing“ RNA hatte keinen Effekt auf beide Proteine (nicht dargestellt). DDX6 zeigt die typische Lokalisation in den P-Bodies und ATX2 eine cytoplasmatische Verteilung. Im Falle der RNAi-Proben, welche bei gleichen Lasereinstellungen aufgenommen wurde, ist in der Mikroskopie klar zu erkennen, dass die Immunreaktivität der DDX6-Färbung stark reduziert ist. Auffällig ist, dass DDX6 in den RNAi-Proben kaum noch in den P-Bodies lokalisiert ist, sondern eine cytoplasmatische Verteilung aufweist. Die Konzentration an endogenem ATX2 scheint durch die Reduktion an DDX6 nicht beeinflusst. Allerdings kommt es, besonders in den COS1-Zellen, zu einem gehäuften Auftreten an Zellen, die sogenannte Stress Granules (SG) ausbilden, in denen ATX2 lokalisiert ist.

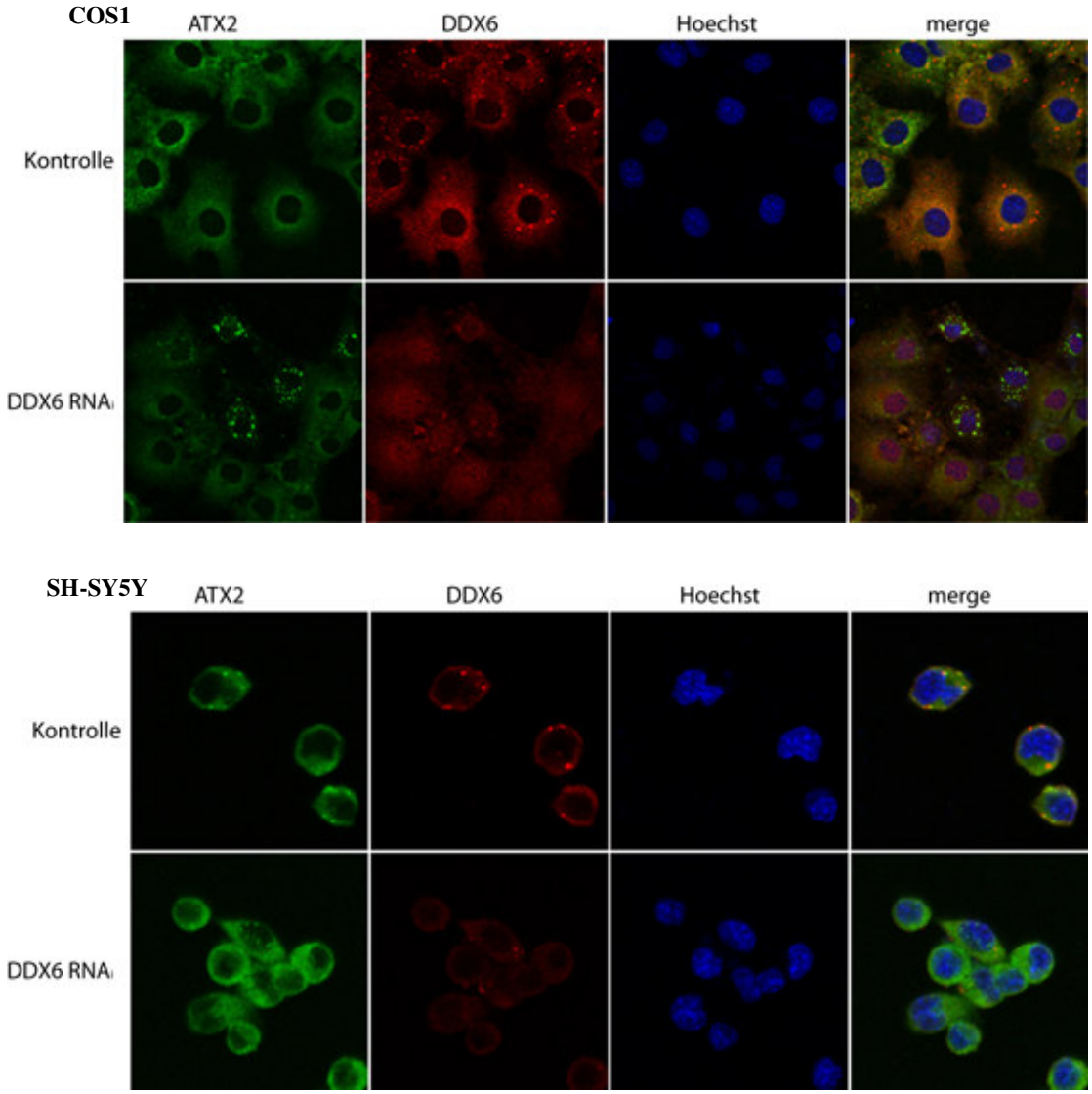

Abb. 22: Einfluss einer reduzierten DDX6-Konzentration auf endogenes ATX2. Die Kontrollzellen wurden nur mit Transfektionsreagenz behandelt. COS1- und SH-SY5Y-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst gefärbt.

3.2.2. Einfluss einer erhöhten DDX6-Konzentration auf die zelluläre Lokalisation und Konzentration von ATX2

In diesen Experimenten sollte untersucht werden, ob eine erhöhte Konzentration von DDX6 einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation und die Konzentration von ATX2 hat. Dazu wurden transiente Überexpressionsanalysen durchgeführt und die zelluläre Lokalisation der Proteine mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

3.2.2.1. Klonierung des Säugerexpressionsvektors pTL-FlagC-DDX6

Zur Überexpressionsanalyse in Säugerzellen wurde das Plasmid pTL-FlagC-DDX6 generiert. Hierzu wurde das 1500 bp lange DNA-Fragment, welches die DDX6 kodierende Sequenz beinhaltet, aus dem Plasmid pACT4-1b-DDX6 mit den Restriktionsenzymen SalI und NotI isoliert und mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und anschließend aufgereinigt. Da der Säugerexpression-Vektor pTL-FlagC zwei SalI-Schnittstellen besitzt, wurde neben NotI, die Restriktionsendonuklaese XhoI verwendet. Diese besitzt kompatible Enden mit der SalI-Schnittstelle. Nachfolgend wurde der linearisierte Vektor aufgereinigt und das 5`-Ende dephosphoryliert. Im Anschluss erfolgte die Ligation und Transformation in *E.coli*, wie unter 2.2.5 beschrieben. Drei der erhaltenen Transformanten wurden über Nacht bei 37°C in LB/Amp-Medium angezogen und die Plasmid-DNA aus diesen Kulturen isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und SalI behandelt und mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Bei Integration der DDX6-Sequenz in den Vektor sollten Banden der Länge von ca. 2800 bp, 1600 bp und 1100 bp entstehen.

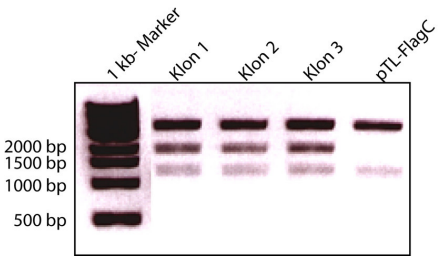

Abb. 23: Überprüfung der Restriktionsanalyse von pTL-FlagC DDX6 mit BamHI und SalI. Dargestellt ist ein 1% Agarosegel. Als Kontrolle wurde der Vektor pTL-FlagC ebenfalls der Restriktionsanalyse unterzogen.

Wie in Abbildung 23 dargestellt ist, zeigten alle drei isolierten Plasmide das erwartete Bandenmuster, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass die DDX6-Sequenz in den Vektor ligiert worden ist. Im Folgenden wurde mit Klon 1, der als pTL-FlagC-DDX6 bezeichnet wurde, weitergearbeitet.

3.2.2.2. Transiente Überexpression von DDX6 in COS1-Zellen

Um nun den Einfluss von überexprimiertem DDX6 auf die Lokalisation bzw. Konzentration von endogenem ATX2 zu untersuchen, wurden COS1-Zellen, wie in Punkt 2.2.12.2 beschrieben, mit dem Plasmid pTL-FlagC-DDX6 transfiziert. Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Zellen nach 24 stündiger Inkubation auf dem Deckglas fixiert und mit den Primärantikörpern anti-Flag und anti-ATX2 behandelt. Als Sekundärantikörper dienten die fluoreszenzmarkierten Fitc-anti-Maus- und Cy3-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt.

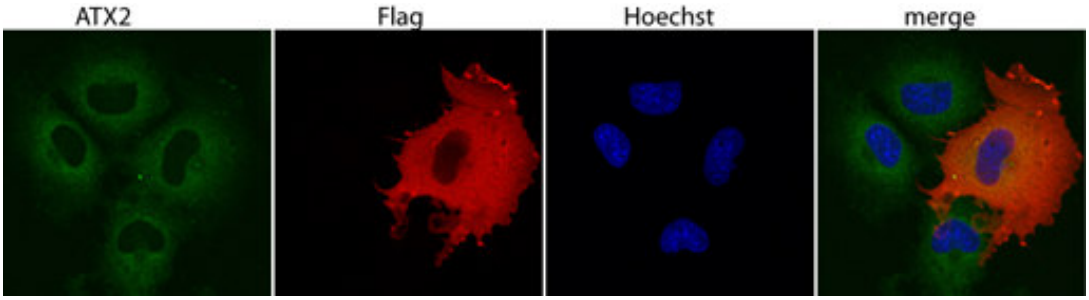

Abb. 24: Einfluss einer akkumulierten DDX6-Konzentration auf die endogene ATX2-Lokalisation. COS1-Zellen wurden mit DDX6 transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst gefärbt.

Es zeigte sich, dass bei hohen intrazellulären DDX6-Konzentrationen, keine Lokalisation von DDX6 in den P-Bodies zu beobachten ist (Abb. 24). Weiterhin hatte eine hohe DDX6-Konzentration keinen Einfluss auf die Lokalisation bzw. die Konzentration von endogenem ATX2 (Abb. 24).

3.3. Analysen zum Einfluss einer intrazellulären ATX2-Akkumulierung

Es ist bekannt, dass in SCA2-Patienten, die zelluläre ATX2-Konzentration in den Purkinjezellen des Cerebellums erhöht ist [21] und eine erhöhte ATX2-Konzentration in der stark heterogenen Gruppe von Neuroblastoma-Tumoren eine mögliche Apoptose begünstigt [47]. Zudem wurde in Zellkulturexperimenten nachgewiesen, dass eine zelluläre Überexpression von ATX2 zu einer Akkumulierung von T-Plastin führt, welches seinerseits bei Dysregulation zur Krebsentstehung und Progression beiträgt. Aus diesem Grund sollte der Einfluss einer erhöhten zellulären Konzentration an ATX2 auf die Lokalisation und Konzentration von DDX6 analysiert werden.

3.3.1. Transiente Überexpression von ATX2 in COS1- und SH-SY5Y-Zellen

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von ATX2 einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation und Konzentration von DDX6 hat, wurden transiente Überexpressions-Analysen durchgeführt und ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Hierbei wurde ATX2-Q79 mit in die Analysen einbezogen, um mögliche Unterschiede festzustellen.
Für die transiente Überexpression von ATX2 in Säugerzellen, wurden die Plasmide pTL-HA-ATX2 (22) und pTL-HA-ATX2 (79) verwendet [39]. SH-SY5Y– und COS1-Zellen wurden mit diesen Plasmiden transfiziert, wie in Punkt 2.2.12.2 beschrieben, und für 24 Stunden inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen für die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet, indem sie auf dem Deckglas fixiert und mittels Antikörper gefärbt wurden. Als Primärantikörper wurde anti-HA und anti-DDX6 N-Terminus verwendet. Als Sekundärantikörper dienten die fluoreszenzmarkierten Fitc-anti-Maus- und Cy3-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. Als Kontrolle wurden jeweils untransfizierte Zellen mit den entsprechenden Primär- und Sekundärantikörpern behandelt.
Neben den SH-SY5Y-Zellen wurden auch COS1-Zellen in diese Analysen mit einbezogen, da sich gezeigt hat, dass sie im Gegensatz zu SH-SY5Y unter normalen Bedingungen immer P-Bodies – und auch in großer Zahl - besitzen. SH-SY5Y-Zellen weisen eine größere Variabilität in der Anzahl der P-Bodies auf. Aus diesem Grund wären mögliche Veränderungen der P-Bodies, in Anzahl und Form, in den COS1-Zellen besser zu erkennen.

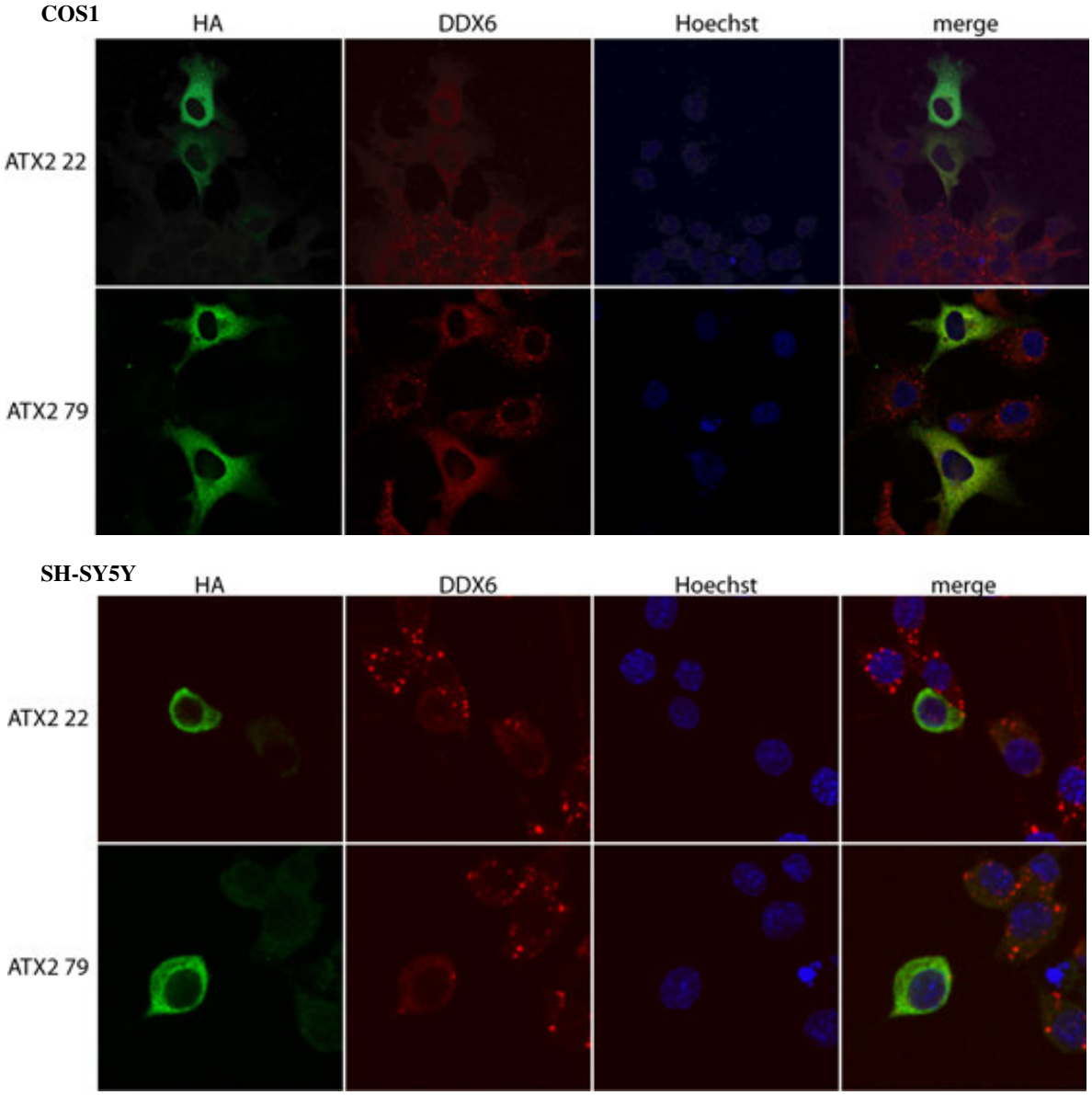

Abb. 25: Einfluss einer akkumulierten ATX2-Konzentration auf die endogene DDX6-Lokalisation. COS1- und SH-SY5Y-Zellen wurden mit Ataxin-2, mit 22 bzw. 79 Glutaminen, transfiziert und mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst gefärbt.

Wie in Abbildung 25 ersichtlich zeigten COS1-Zellen, die ATX2-Q22 oder ATX2-Q79 überexprimierten, eine Reduktion in der Anzahl der P-Bodies im Vergleich zu den nicht überexprimierenden Zellen. Dieses Phänomen konnte ebenfalls bei SH-SY5Y-Zellen beobachtet werden (Abb. 25). Auch hier ließ sich bei einem Teil der Zellen, welche ATX2 Q22 oder Q79 überexprimierten, ein Einfluss auf die P-Body-Anzahl beobachten.

Um zu überprüfen, ob sich die Struktur der P-Bodies bei ATX2-Überexpression auflöst, wurde dieses Experiment erneut durchgeführt, wobei ein anderer P-Body-Marker, das Protein Dcp1, verwendet wurde. COS1-Zellen wurden entsprechend mit den Plasmiden pTL-HA-ATX2 (22) und pTL-HA-ATX2 (79) transfiziert und für 24 Stunden inkubiert. Als

Primärantikörper diente hier neben anti-ATX2, anti-Dcp1. Dcp1 ist wie DDX6 cytoplasmatisch lokalisiert, wobei es ebenfalls in den P-Bodies akkumuliert. Zu einem gewissen Grad ist Dcp1 auch im Nukleus zu finden (Abb. 26 Reihe 1).

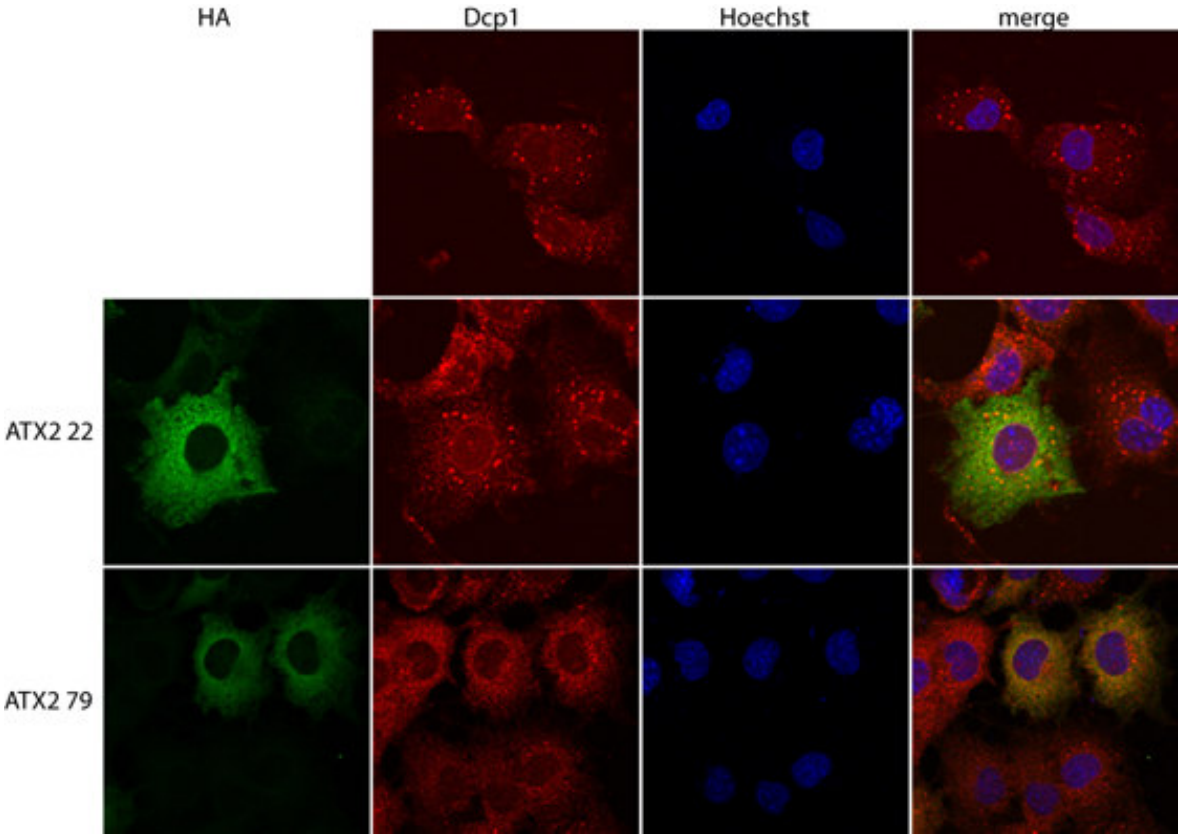

Abb. 26: Einfluss einer akkumulierten ATX2-Konzentration auf die endogene Dcp1-Lokalisation. Reihe 1: Endogene Lokalisation von Dcp1 und Reihe 2 und 3: Überexpression von ATX2-Q22 und ATX2-Q79. wurden COS1-Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Nuklei wurden mit Hoechst gefärbt.

Bei Überexpression von ATX2 Q22 und ATX Q79 konnte allerdings kein Einfluss auf die Zahl der Dcp1 enthaltenen P-Bodies festgestellt werden (Abb. 26 Reihe 2 und 3). Die Lokalisation von Dcp1 unterscheidet sich in Bezug auf untransfizierte Zellen nicht.

Daraus lässt sich schließen, dass bei einer erhöhten ATX2-Konzentration, DDX6 aus den P-Bodies rekrutiert wird, wobei die Struktur der P-Bodies selbst aber bestehen zu bleiben scheint.

3.3.2. Transiente Überexpression der ATX2-Fragmente in COS1-Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass ATX2 und DDX6 über die LSm/LSmAD miteinander interagieren und bei Überexpression von ATX2, DDX6 aus den P-Bodies rekrutiert zu werden scheint. Um zu überprüfen, ob die Interaktion dieser Proteine für dieses Phänomen verantwortlich sein kann oder andere Bereiche von ATX2 die Zusammensetzung der P-Bodies beeinflussen, wurden Überexpressionanalysen mit den Fragmenten von Ataxin-2 durchgeführt und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.
Dazu wurden COS1-Zellen jeweils mit den Vektoren (pTL-HA-ATX2(Q22)$_{1-396}$, pTL-HA-ATX2(Q79)$_{1-396}$, pTL-HA-ATX2$_{254-475}$, pTL-HA-ATX2$_{481-815}$ und pTL-HA-ATX2$_{816-1312}$ [39] transfiziert, für 24 Stunden auf Deckgläsern kultiviert und anschließend fixiert. Als Primärantikörper wurde anti-HA und anti-DDX6 N-Terminus verwendet. Als Sekundärantikörper dienten die Fluoreszenzmarkierten FITC-anti-Maus- und Cy3-anti-Kaninchen-Antikörper. Die Zellkerne wurden mit Hoechst angefärbt. In Abbildung 27 sind die entsprechenden Mikroskopie-Bilder dargestellt.
Diese Analysen ergaben, dass die Überexpression des N-Terminus von Ataxin (ATX2 1-396) sowohl mit 22 als auch mit 79 Glutaminen zu einer cytoplasmatischen Verteilung und einer Akkumulierung des Fragments im perinuklearen Raum (Abbildung 27 Reihe 1 und 2) führte, wobei die Akkumulierung beim N-Terminus mit 79 Glutaminen stärker auftritt. Das endogene DDX6 weist hier eine weniger distinkte Verteilung auf. Die Überexpression der LSm/LSmAD von ATX2 (ATX2 254-475) zeigt eine cytoplasmatische Verteilung des Fragments. Interessanterweise ist die endogene Lokalisation von DDX6 verändert, da die Zahl der DDX6-enhaltenen P-Bodies, wie es auch schon bei der Überexpression des vollständigen ATX2 beobachtet werden konnte, hier reduziert ist. (Abbildung 27 Reihe 3). Die Überexpressionen von ATX2 481-815 oder dem C-terminalen Fragment von ATX2 (ATX2 816-1312), wiesen auch eine cytoplasmatische Verteiltung auf. Beide Fragmente hatten keinen Einfluss auf die Lokalisation von DDX6 (Abbildung 27 Reihe 4 und 5).

Interessanterweise zeigt dieses Ergebnis, dass der Bereich von Ataxin-2 (LSm/LSmAD), der mit DDX6 interagiert, auch für die veränderte Lokalisation von DDX6 bei erhöhter Ataxin-2-Konzentration verantwortlich ist.

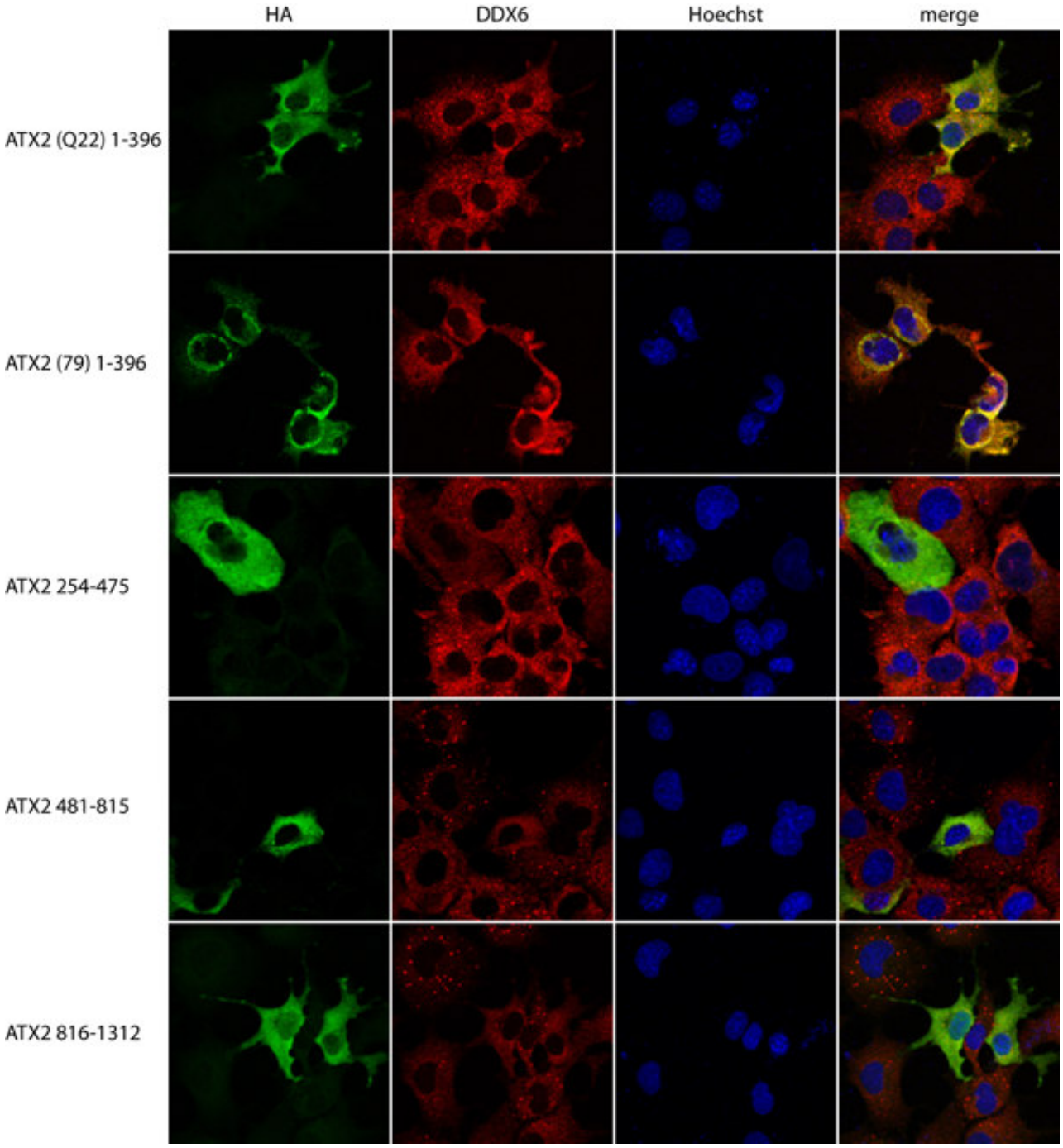

Abb. 27: Einfluss der ATX2-Fragmente auf die DDX6-Lokalisierung. COS1-Zellen wurden nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenz analysiert. Der Zellkern wurde mit Hoechst gefärbt.

4. Diskussion

Wie bereits erwähnt, konnte in einem Yeast-Two-Hybrid-Hochdurchsatzverfahren eine Interaktion der *S. cerevisae*-Proteine Pbp1 und Dhh1 gezeigt werden. Da ATX2 und Pbp1 funktional miteinander verwnadt sind, war es das Ziel dieser Arbeit, zu überprüfen, ob diese Interaktion auf das humane System übertragen werden kann. Um diese Interaktion auch für die humanen Homologe ATX2 und DDX6 nachzuweisen, wurden Yeast-Two-Hybrid-Experimente und Koimmunopräzipiatationen durchgeführt. Tatsächlich konnte auch die Interaktion zwischen ATX2 und DDX6 innerhalb dieser Arbeit mit beiden Systemen nachgewiesen werden. Durch diese Analysen konnte der Bereich von ATX2, der für die Interaktion verantwortlich ist, auf die LSm/LSmAD eingegrenzt werden. Es konnte keine Interaktion zwischen dem N-Terminus von ATX2, der ebenfalls die LSm-Domäne enthält, und DDX6 festgestellt werden. Daraus läßt sich schließen, dass für die Interaktion zwischen ATX2 und DDX6 die LSm-Domäne nicht ausreichend ist, sondern auch die LSmAD benötigt wird. Die LsmAD ist wenig charakterisiert, wohingegen über die LSm-Domäne merhr bekannt ist. Die LSm-Domäne ist hoch konserviert und es ist bekannt, dass LSm-Proteine über diese Domänen oligomere Ringstrukturen ausbilden, die dann RNA binden können. Möglicherweise ist auch ATX2 in der Lage, oligomere Ringstrukturen über die LSm-Domäne mit anderen LSm-Proteinen auszubilden [28]. Da DDX6 hingegen nicht über eine LSm-Domäne verfügt, handelt es sich hier nicht, um die typische Assoziation zweier LSm-Proteine. Hingegen weist DDX6 einige hochkonservierte Domänen auf, welche auf eine RNA-Bindung und eine Beteiligung am zellulären RNA-Metabolismus schließen lassen.
Erstmals wurde das entsprechende *DDX6*-Gen, welches auf dem Chromosom 11q23.3 lokalisiert ist, in einer Chromosomentranslokation t(11;14)(q23;q32) der humanen B-Zell-Lymphom-Zell-Linie RC-K8 entdeckt und beschrieben [48, 49]. Es umfasst eine genomische Sequenz von 74,7 kb, enthält 13 Exons und kodiert für die RNA-Helikase DDX6 (DEAD Box polypeptid 6), welche aus 483 Aminosäuren besteht und eine molekulare Masse von 54 kDa besitzt. DDX6 gehört zur Hauptgruppe der RNA/DNA-Helikasen, die in fünf Superfamilien (SF1-SF5) unterteilt wird. DEAD-Box-Proteine, wie DDX6, gehören aufgrund ihrer strukturellen Merkmale zur Superfamilie 2 und wurden in allen Eukaryonten und vielen Prokaryonten gefunden. DEAD-Box-RNA-Helikasen sind mit fast allen RNA-Prozessen, von Transkription bis zum RNA-Abbau, assoziiert worden und besitzen 9 konservierte Domänen, die an der ATPase und Helikase-Aktivität sowie der RNA-Bindung beteiligt sind [50]. Diese Motive befinden sich in einer sogenannten „CORE“-Region, die 350-400 Aminosäuren umfasst [51, 52] und in zwei Domänen (DEXDc- und HELICc-Domäne) organisiert sind. Die N- und C-terminalen Bereiche der DEAD-Box-Proteine dagegen sind hoch variabel. In Abbildung 28 ist schematisch der Aufbau von DDX6 dargestellt.

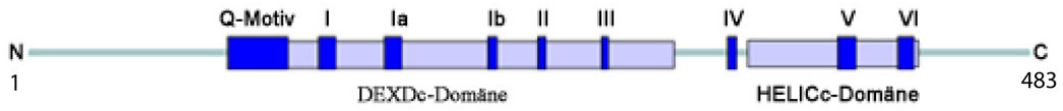

Abbildung 28: Schematische Darstellung von DDX6. DDX6 besteht aus zwei globulären Domänen, der DEXDc- (AS115-312) und der HELICc-Domäne (348-429); Beide Domänen bilden zusammen die „Core"-Region aus, die innerhalb der DEAD-Box-Proteine hoch konserviert ist und das Q-Motiv und die Motive I-VI umfasst

Die Motive 1 und 2 werden auch Walker A und B genannt und sind in allen DNA und RNA-Helikasen vorhanden. Motiv 1 ist an der NTP-Bindung beteiligt und essentiell für die NTPase und Helikase-Aktivität. Motiv 2, welches in DEAD-Box-Proteinen namensgebend ist, besitzt hier die Consensussequenz Asp-Glu-Ala-Asp (DEAD). Der Glutamat-Rest in diesem Motiv koordiniert Mg^{2+}. Motiv 2 ist essentiell für die NTP-Hydrolyse (Walker 1982). Das Q-Motiv ist wahrscheinlich ein Adenin-Bindemotiv und damit an der NTP-Bindung beteiligt. Bei Motiv V handelt es sich um ein RNA-Bindemotiv, welches zusammen mit Motiv Ia, Ib und IV wirkt. NTPase und Helikase-Aktivität werden vermutlich durch Motiv III miteinander verbunden [53]. Interessant wäre es nun, herauszubekommen, welche Domäne von DDX6 nit Interaktion vermittelt.

Desweiteren ist die Interaktion zwischen ATX2 und DDX6, in Bezug auf ihre zelluläre Rolle, äußerst interessant, da die entsprechenden Homologe, mit dem RNA-Metabolismus und der Regulation der Translation in Zusammenhang gebracht werden. Das *S. cerevisae*-Homolog, von DDX6, Dhh1, interagiert mit Pop2 und Ccr4 [54], beides Bestandteile des Ccr4/Not-Komplexes, der für die Deadenylierung von mRNA verantwortlich ist, und assoziiert außerdem mit den Degradierungsfaktoren Pat1/Mtr1 und der 5`-3`-Exoribonuklease Xrn1. Dhh1-defiziente Stämme akkumulieren deadenylierte mRNA, die aber noch die 5`-Cap-Struktur besitzt, so dass eine Stimulation des Decappings durch Dhh1 vermutet wird [43]. Es ist maßgeblich an der Reprimierung der Translation beteiligt ist, da die Translationsrepression in dhh1-defizienten Stämmen gestört ist. Die Überexpression von Dhh1 in Hefe führt zu einer Abnahme an Polysomen, einer gesteigerten Translationsrepression und einer vermehrten Zahl an P-Bodies, in denen Dhh1 lokalisiert ist. Es gibt Hinweise, dass Dhh1 die Formierung des 48S-Preinitiationskomplexes verhindert oder auflöst und darüber die Translation reguliert [55]. Interessanterweise konnte für einen dhh1-Deletionsstamm gezeigt werden, dass die ROS-Produktion gesteigert wird und DNA-Schäden akkumulieren. Möglicherweise führt eine gesteigerte mRNA-Stabilität in diesem Fall zu einer erhöhten Konzentration bestimmter Proteine, wodurch eine Apoptose gefördert wird [56]. Weitere eukaryontische Homologe von DDX6 spielen ebenfalls eine signifikante Rolle in der Gametogenese und der frühen Embryogenese [57]. Ste13, das *S. pombe*-Homolog ist essentiell für die sexuelle Reproduktion und CGH-1 (*Caenorhabditis elegans)* ist für die Germatogenese [58] und den Schutz vor Keimbahn-Apoptose nötig. Die Abwesenheit von CGH1 induziert über einen unbekannten Mechanismus Apoptose in Keimzellen von *C.*

elegans. Xp54 (*Xenopus*) und Me31B (*Drosophila*) sind integrale Bestandteile der „stored (maternal) mRNP particles“ in den Oozyten [59-61]. Man vermutet, dass sie hier in die Translationskontrolle involviert sind [60, 62]. Xp54 oligomerisiert RNA-abhängig und interagiert außerdem mit CPEB (Cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) [63], einem translationsregulierenden Protein, welches in P-Bodies lokalisert ist und in die SG rekrutiert wird. Es assoziiert als Oligomer an die 3´-UTR deadenylierter mRNA. Diese Oligomerisierung von Xp54 ist essentiell für die Regulation der Translation in *Xenopus*. Zusätzlich dazu führen Mutationen, die die Helikase-Aktivität beeinträchtigen zu einer Aktivierung der Translation, was dafür spricht, dass die Repression der Translation von mRNAs, über die Helikaseaktivität von Xp54 reguliert wird [63-65].

Sowohl Dhh1 als auch DDX6 lokalisieren in diskreten cytoplasmatischen Strukturen, den sogenannten P-Bodies [66]. Neben nicht-translatierter mRNA sind Proteine des 5`-3`-mRNA-Abbaus (z.B. Dcp1, Dcp2 und Xrn1), des „nonsense-mediateted“ mRNA-Abbaus, der RISC-Komplex und andere mRNA-stabilisierende und destabilisierende Proteine ebenfalls in den P-Bodies akkumuliert. P-Bodies sind Orte des mRNA-Abbaus, wobei dieser nicht zwingend stattfindet, sondern die mRNA auch wieder in den translatierbaren Pool übertreten kann. Die Entstehung der P-Bodies ist RNA-anhängig und es besteht eine reziproke Beziehung zwischen Translation und P-Body-Anzahl. Ist die Translations-Initiation inhibiert, so steigt die Anzahl an P-Bodies. Bei einer Inhibition der Translations-Elongation dagegen lösen sich die P-Bodies auf, was dafür spricht, dass ihre Formierung RNA-abhängig ist [77]. Zusätzlich wurden P-Bodies mit RNA-Interferenz und microRNA-induzierter Translations-Inhibition in Verbindung gebracht [67-70]. Man nimmt also an, dass P-Bodies Strukturen sind, in denen die Translation von mRNA über verschiedene Abbau- und „Silencing“-Prozesse reguliert wird [35] und sie nicht ausschließlich Orte des mRNA-Abbaus sind. Interessanterweise wird DDX6 unter Stress-Bedingungen in sogenannte Stress Granules rekrutiert (SG) [44].
SGs sind reversible cytoplasmatische Aggregate von Translations-Preinitiationskomplexen, die während Stressbedingungen entstehen. Dabei werden „housekeeping“-mRNAs aus den Polysomen in die SG rekrutiert, wo sie in einem translationsinaktiven Zustand gespeichert oder an Orte der Translationinitiation oder des mRNA-Abbaus delegiert werden können [32, 33]. SG lösen sich nach Beendigung des Stresses wieder auf und ermöglichen damit einen schnellen Wiedereintritt der gespeicherten mRNA in die Translation. P-Bodies und Stress Granules können in Kontakt miteinander treten und Anderson stellte die Hypothese auf, dass auf diesem Wege mRNAs zwischen beiden Strukturen ausgetauscht werden könnten [32], z.B. über Proteine wie RAP55 [71], und so auch gespeicherte mRNA dem Abbau in den P-Bodies zugeführt werden könnten. Sowohl ATX2 als auch sein Interaktionspartner PABP sind interessanterweise ebenfalls Bestandteile von SG.

Interessanterweise wurden Veränderungen in der zellulären Konzentration von DDX6 mit pathologischen Mechanismen in Zusammenhang gebracht. DDX6 wird ubiquitinär exprimiert,

wobei die Expression im humanen Lungen- und Hirngewebe sehr schwach ist. In einigen Tumoren, die sich von diesen Geweben ableiten (Neuroblastom, Glioblastom und Lungenkarzinom), konnte allerdings eine verstärkte Expression an DDX6 nachgewiesen werden, so dass angenommen wird, dass es eine Rolle in der Tumorgenese spielt [74, 75]. Aufgrund dessen, sollte durch RNAi-Experimente und Überexpressionsanalysen in der Zellkultur überprüft werden, ob eine veränderte DDX6-Konzentration einen Einfluss auf die Lokalisation und Konzentration von ATX2 hat. Im ersten Ansatz wurde eine Erniedrigung der zellulären DDX6-Konzentration, über RNAi-Experimente, analysiert. Dabei zeigte sich, dass eine verringerte DDX6-Konzentration keinen Einfluss auf die Lokalisation und die Konzentration von ATX2 hatte. Da keine vollständige Reduktion erreicht werden konnte, war noch endogenes DDX6 zu detektieren. Dieses war allerdings nicht mehr in den P-Bodies lokalisiert. In den SG, die durch die esiRNA-Transfektion in den COS1-Zellen zum Teil induziert wurden, akkumulierte das vorhandene DDX6 weiterhin. Auch bei der transienten Überexpression von DDX6 akkumulierte es nicht in den P-Bodies. Dagegen wurde bei Überexpression von Dhh1 in Hefezellen eine Akkumulierung in den P-Bodies beobachtet [76]. Hefezellen besitzen jedoch keine SG, und die P-Bodies weisen hier viele Eigenschaften von SG auf [77, 78]. In anderen Studien konnte beobachtet werden, dass die Lokalisation von DDX6 stark von der intrazellulären Konzentration abhängt. Eine geringe Überexpression führte zu einer Akkumulierung von DDX6 in den P-Bodies, wobei bei einer starken Überexpression DDX6 ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert war [79]. Es scheint, dass Veränderungen in der zellulären Konzentration von DDX6, einen Einfluss auf die Bildung der P-Bodies, oder zumindest auf die Lokalisation von DDX6 in den P-Bodies, haben. Dieses Ergebnis ist interessant, da wie bereits erwähnt, die Konzentration an zellulärem DDX6 in vielen Tumoren erhöht ist. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Zahl/Proportion/Zusammensetzung etc. der P-Bodies an der Tumorentstehung und einigen Autoimmunerkrankungen beteiligt ist [80]. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von DDX6 in COS7- und SW480-Zellen, zu einer Erhöhung der Konzentration des c-myc-Proteins führt, was auf eine erhöhte mRNA-Stabilität oder Translationsrate zurückgeführt wurde [81]. Eine Deregulation der myc-Proteine wird ebenfalls mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht, da es als Transkriptionsfaktor den Eintritt in die S-Phase vermittelt, wobei in bestimmten Phasen die myc-Konzentration hochreguliert wird. Möglicherweise führt eine veränderte Lokalisation von DDX6, ausgelöst durch eine variierte Konzentration, zu einer verminderten Translationsrepression.

Ein weiterer wichtiger Befund dieser Arbeit war, dass die transiente Überexpression von ATX2 in COS1-und SH-SY5Y-Zellen hingegen einen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation von DDX6 hatte. Die Analysen zeigten, dass bei Überexpression von ATX2 in diesen Zell-Linien, DDX6 nicht mehr die typische cytoplasmatische Akkumulierung in den P-Bodies aufwies. Mit einem anderen P-Body-Marker, Dcp1, konnte allerdings ausgeschlossen werden, dass diese Strukturen sich auflösten, sondern DDX6 ist unter diesen Bedingungen

nicht mehr Bestandteil der P-Bodies. Dabei zeigte sich, dass dieses Phänomen unabhängig von der Länge der PolyQ-Einheit ist, da sowohl die Überexpression von ATX2-Q22 als auch von ATX2-Q79, zu diesem Ergebnis führte. Aufrgrund der erhöhten intrazellulären Konzentration an ATX2 in den Purkinjezellen von SCA2-Patienten, kann dieses Ergebniss durchaus für die Pathogenese von SCA2 von Bedeutung sein.

Um den Bereich innerhalb des ATX2-Proteins zu bestimmen, der für die Rekrutierung von DDX6 aus den P-Bodies verantwortlich ist, wurden die ATX2-Fragmente ebenfalls überexprimiert. Die Überexpression der LSm/LSmAD von ATX2 führte zu demselben Ergebnis, auch hier wurde DDX6 aus den P-Bodies rekrutiert. Dabei handelt es sich, interessanterweise, genau um die Domäne, die nach den vorliegenden Y2H-Ergebnissen, für die Interaktion von ATX2 mit DDX6 verantwortlich ist. Die Überexpression des N-terminalen Bereichs hatte ebenfalls einen Einfluss auf die Lokalisation von DDX6, wobei dieses zusammen mit dem überexprimierten Fragment im perinukleären Raum akkumulierte. Nach den vorliegenden Ergebnissen könnte die Expression des N-Terminus mit 79 Glutaminen, zu einer stärkeren Akkumulierung führen. Zusammenfassend kann man aus den Überexpressionsanalysen schließen, dass eine erhöhte ATX2-Konzentration einen Einfluss auf die Zusammensetzung der P-Bodies hat, indem DDX6 aus den P-Bodies rekrutiert wird. Es scheint möglicherweise, als wenn dies über eine direkte Interaktion von ATX2 mit DDX6 geschieht, da für diesen Effekt, die mit DDX6-interagierenden Domänen LSm und LSmAD ausreichend sind. Vorausgesetzt, die zelluläre Lokalisation von DDX6 ist entscheidend für die Funktion des Proteins in der Translationsregulation, könnte also eine erhöhte ATX2-Konzentration durchaus einen Einfluss auf die Regulation der Translation und auf die mRNA-Stabilität haben. Dieses Ergebnis ist auch interessant unter dem Gesichtspunkt, dass die Expressionsrate von ATX2, wie schon erwähnt, in die Progression von humanen Neuroblastom-Tumoren involviert ist [47]. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, dass die zelluläre Konzentration an expaniertem ATX2, in den von Degeneration betroffenen Hirnregionen von SCA2-Patienten, stark erhöht ist [13]. Auch konnte gezeigt werden, dass die zelluläre Expression an ATX2 mit dem Alter in den Purkinjezellen ansteigt [82]. Da bei gesteigerter ATX2-Konzentration die Lokalisation von DDX6 verändert ist, stellt sich die Frage, ob die dadurch möglicherweise beeinträchtigte Translationsregulation in der Pathogenese von SCA2-Patienten und im Alterungsprozess eine Rolle spielt.

5. Ausblick

Die Spinozerebellare Ataxie 2 ist eine neurodegenerative Erkrankung, die zu den Polyglutaminerkrankungen zählt und typischerweise im mittleren Lebensalter auftritt und innerhalb von ein bis zwei Jahrzehnten zum Tode führt. Die Funktion von Ataxin-2, dem SCA2 zugrundeliegenden Protein ist noch nicht aufgeklärt. Es gibt allerdings Hinweise, die es u.a. mit dem RNA-Metabolismus in Verbindung bringen. Innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ATX2 mit der RNA-Helikase DDX6 interagiert, wobei diese Interaktion über die LSm- und die LSm- assoziierte Domäne von ATX2 vermittelt wird. Da über die LSm assoziierte Domäne ist sehr wenig bekannt, wäre es nun interessant zu überprüfen, ob die LSmAD alleine ausreicht, die Interaktion von ATX2 mit DDX6 zu vermitteln oder ob beide Domänen zusammen an der Interaktion beteiligt sind. Zudem konnte hier festgestellt werden, dass Variationen der intrazellulären DDX6-Konzentration einen Einfluss auf die Lokalisation dieser RNA-Helikase besitzen. Ebenso wurde gezeigt, dass die Überexpression des Interaktionspartners ATX2 eine ähnliche Lokalisationsänderung von DDX6 hervorruft. Der Einfluss von ATX2 auf die Lokalisation von DDX6, ist dabei unabhängig von der Länge der Polyglutamineinheit. Da in SCA2-Patienten die ATX2-Konzentration jedoch erhöht ist, könnte dieser Befund mit der Pathogenese im Zusammenhang stehen. Aus diesem Grund, wäre es interessant zu überprüfen, ob die veränderte Lokalisation einen Einfluss auf die Translationsregulation besitzt.

6. Literatur

1. **Ralser, M., et al.,** ***An integrative approach to gain insights into the cellular function of human ataxin-2.*** **J Mol Biol, 2005. 346(1): p. 203-14.**
2. **Reddy, P.S. and D.E. Housman,** ***The complex pathology of trinucleotide repeats.*** **Curr Opin Cell Biol, 1997. 9(3): p. 364-72.**
3. **Cummings, C.J. and H.Y. Zoghbi,** ***Trinucleotide repeats: mechanisms and pathophysiology.*** **Annu Rev Genomics Hum Genet, 2000. 1: p. 281-328.**
4. **Margolis, R.L.,** ***The spinocerebellar ataxias: order emerges from chaos.*** **Curr Neurol Neurosci Rep, 2002. 2(5): p. 447-56.**
5. **Stevanin, G., A. Durr, and A. Brice,** ***Spinocerebellar ataxias caused by polyglutamine expansions.*** **Adv Exp Med Biol, 2002. 516: p. 47-77.**
6. **Bates, G.,** ***Huntingtin aggregation and toxicity in Huntington's disease.*** **Lancet, 2003. 361(9369): p. 1642-4.**
7. **Harjes, P. and E.E. Wanker,** ***The hunt for huntingtin function: interaction partners tell many different stories.*** **Trends Biochem Sci, 2003. 28(8): p. 425-33.**
8. **Schols, L., et al.,** ***Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis.*** **Lancet Neurol, 2004. 3(5): p. 291-304.**
9. **Harding, A.E.,** ***The clinical features and classification of the late onset autosomal dominant cerebellar ataxias. A study of 11 families, including descendants of the 'the Drew family of Walworth'.*** **Brain, 1982. 105(Pt 1): p. 1-28.**
10. **Paulson, H.L., et al.,** ***Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3.*** **Neuron, 1997. 19(2): p. 333-44.**
11. **Holmberg, M., et al.,** ***Spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7): a neurodegenerative disorder with neuronal intranuclear inclusions.*** **Hum Mol Genet, 1998. 7(5): p. 913-8.**
12. **Mangiarini, L., et al.,** ***Exon 1 of the HD gene with an expanded CAG repeat is sufficient to cause a progressive neurological phenotype in transgenic mice.*** **Cell, 1996. 87(3): p. 493-506.**
13. **Huynh, D.P., et al.,** ***Nuclear localization or inclusion body formation of ataxin-2 are not necessary for SCA2 pathogenesis in mouse or human.*** **Nature Genetics 2000. 26(1): p. 44-50.**
14. **Koeppen, A.H.,** ***The pathogenesis of spinocerebellar ataxia.*** **Cerebellum, 2005. 4(1): p. 62-73.**
15. **Sinha, K.K., et al.,** ***Autosomal dominant cerebellar ataxia: SCA2 is the most frequent mutation in eastern India.*** **J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2004. 75(3): p. 448-52.**
16. **Giunti, P., et al.,** ***The role of the SCA2 trinucleotide repeat expansion in 89 autosomal dominant cerebellar ataxia families. Frequency, clinical and genetic correlates.*** **Brain, 1998. 121 (Pt 3): p. 459-67.**
17. **Moseley, M.L., et al.,** ***Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families.*** **Neurology, 1998. 51(6): p. 1666-71.**
18. **Koeppen, A.H.,** ***The hereditary ataxias.*** **J Neuropathol Exp Neurol, 1998. 57(6): p. 531-43.**
19. **Durr, A., et al.,** ***Autosomal dominant cerebellar ataxia type I in Martinique (French West Indies). Clinical and neuropathological analysis of 53 patients from three unrelated SCA2 families.*** **Brain, 1995. 118 (Pt 6): p. 1573-81.**
20. **Orozco, G., et al.,** ***Dominantly inherited olivopontocerebellar atrophy from eastern Cuba. Clinical, neuropathological, and biochemical findings.*** **J Neurol Sci, 1989. 93(1): p. 37-50.**

21. **Huynh, D.P., et al.,** ***Expression of ataxin-2 in brains from normal individuals and patients with Alzheimer's disease and spinocerebellar ataxia 2.*** **Ann Neurol, 1999. 45(2): p. 232-41.**
22. **Imbert, G., et al.,** ***Cloning of the gene for spinocerebellar ataxia 2 reveals a locus with high sensitivity to expanded CAG/glutamine repeats.*** **Nat Genet, 1996. 14(3): p. 285-91.**
23. **Pulst, S.M., et al.,** ***Moderate expansion of a normally biallelic trinucleotide repeat in spinocerebellar ataxia type 2.*** **Nat Genet, 1996. 14(3): p. 269-76.**
24. **Sanpei, K., et al.,** ***Identification of the spinocerebellar ataxia type 2 gene using a direct identification of repeat expansion and cloning technique, DIRECT.*** **Nat Genet, 1996. 14(3): p. 277-84.**
25. **Sahba, S., et al.,** ***Genomic structure of the human gene for spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) on chromosome 12q24.1.*** **Genomics, 1998. 47(3): p. 359-64.**
26. **Riess, O., et al.,** ***SCA2 trinucleotide expansion in German SCA patients.*** **Neurogenetics, 1997. 1(1): p. 59-64.**
27. **Choudhry, S., et al.,** ***CAG repeat instability at SCA2 locus: anchoring CAA interruptions and linked single nucleotide polymorphisms.*** **Hum Mol Genet, 2001. 10(21): p. 2437-46.**
28. **Albrecht, M., et al.,** ***Structural and functional analysis of ataxin-2 and ataxin-3.*** **Eur J Biochem, 2004. 271(15): p. 3155-70.**
29. **Thore, S., et al.,** ***Crystal structures of the Pyrococcus abyssi Sm core and its complex with RNA. Common features of RNA binding in archaea and eukarya.*** **J Biol Chem, 2003. 278(2): p. 1239-47.**
30. **Neuwald, A.F. and E.V. Koonin,** ***Ataxin-2, global regulators of bacterial gene expression, and spliceosomal snRNP proteins share a conserved domain.*** **J Mol Med, 1998. 76(1): p. 3-5.**
31. **Albrecht, M.a.T.L.,** ***Novel Sm-like proteins with long C-terminal tails and associated methyltransferases.*** **FEBS Lett, 2004. 569(1-3): p. 18-26.**
32. **Kedersha, N. and P. Anderson,** ***Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability.*** **Biochem Soc Trans, 2002. 30(Pt 6): p. 963-9.**
33. **Kedersha, N., et al.,** ***Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules.*** **Mol Biol Cell, 2002. 13(1): p. 195-210.**
34. **Kedersha, N., et al.,** ***Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules.*** **J Cell Biol, 2000. 151(6): p. 1257-68.**
35. **Anderson P, K.N.,** ***RNA granules.*** **J Cell Biol. , 2006. 172(6): p. 803-8. .**
36. **Shibata, H., D.P. Huynh, and S.M. Pulst,** ***A novel protein with RNA-binding motifs interacts with ataxin-2.*** **Hum Mol Genet, 2000. 9(9): p. 1303-13.**
37. **Kiehl TR, S.H., Pulst SM. Related Articles, Links,** ***The ortholog of human ataxin-2 is essential for early embryonic patterning in C. elegans.*** **J Mol Neurosci., 2000. 15(3): p. 231-41.**
38. **Kiehl, T.R., et al.,** ***Generation and characterization of Sca2 (ataxin-2) knockout mice.*** **Biochem Biophys Res Commun, 2006. 339(1): p. 17-24.**
39. **Ralser, M., et al.,** ***Ataxin-2 and huntingtin interact with endophilin-A complexes to function in plastin-associated pathways.*** **Hum Mol Genet, 2005. 14(19): p. 2893-909.**
40. **Reutens, A.T. and C.G. Begley,** ***Endophilin-1: a multifunctional protein.*** **Int J Biochem Cell Biol, 2002. 34(10): p. 1173-7.**
41. **Satterfield, T.F., S.M. Jackson, and L.J. Pallanck,** ***A Drosophila homolog of the polyglutamine disease gene SCA2 is a dosage-sensitive regulator of actin filament formation.*** **Genetics, 2002. 162(4): p. 1687-702.**

42. **Coller, J.M., et al.,** ***The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes.*** **Rna, 2001. 7(12): p. 1717-27.**
43. **Fischer N, W.K.,** ***The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1.*** **EMBO J. , 2002. 21(11): p. 2788-97. .**
44. **Wilczynska, A., et al.,** ***The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules.*** **J Cell Sci, 2005. 118(Pt 5): p. 981-92.**
45. **Abdelhaleem,** ***Over-expression of RNA helicases in cancer.*** **Anticancer Res., 2004. 24(6): p. 3951-3.**
46. **Henschel, A., F. Buchholz, and B. Habermann,** ***DEQOR: a web-based tool for the design and quality control of siRNAs.*** **Nucleic Acids Res, 2004. 32(Web Server issue): p. W113-20.**
47. **Wiedemeyer, R., et al.,** ***Ataxin-2 promotes apoptosis of human neuroblastoma cells.*** **Oncogene, 2003. 22(3): p. 401-11.**
48. **Lu, D. and J.J. Yunis,** ***Cloning, expression and localization of an RNA helicase gene from a human lymphoid cell line with chromosomal breakpoint 11q23.3.*** **Nucleic Acids Res, 1992. 20(8): p. 1967-72.**
49. **Akao, Y., et al.,** ***The RCK gene associated with t(11;14) translocation is distinct from the MLL/ALL-1 gene with t(4;11) and t(11;19) translocations.*** **Cancer Res, 1992. 52(21): p. 6083-7.**
50. **Tanner, N.K.,** ***The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition.*** **Cell Cycle, 2003. 2(1): p. 18-9.**
51. **Tanner, N.K. and P. Linder,** ***DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions.*** **Mol Cell, 2001. 8(2): p. 251-62.**
52. **Caruthers, J.M. and D.B. McKay,** ***Helicase structure and mechanism.*** **Curr Opin Struct Biol, 2002. 12(1): p. 123-33.**
53. **Cordin, O., et al.,** ***The DEAD-box protein family of RNA helicases.*** **Gene, 2006. 367: p. 17-37.**
54. **Hata, H., et al.,** ***Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from Saccharomyces cerevisiae.*** **Genetics, 1998. 148(2): p. 571-9.**
55. **Coller J, P.R.,** ***General translational repression by activators of mRNA decapping.*** **Cell, 2005. 122(6): p. 875-86.**
56. **Mazzoni, C., et al.,** ***A truncated form of KlLsm4p and the absence of factors involved in mRNA decapping trigger apoptosis in yeast.*** **Mol Biol Cell, 2003. 14(2): p. 721-9.**
57. **Matsumoto, K., et al.,** ***Expression of rck/p54, a DEAD-box RNA helicase, in gametogenesis and early embryogenesis of mice.*** **Dev Dyn, 2005. 233(3): p. 1149-56.**
58. **Maekawa, H., et al.,** ***The ste13+ gene encoding a putative RNA helicase is essential for nitrogen starvation-induced G1 arrest and initiation of sexual development in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe.*** **Mol Gen Genet, 1994. 244(5): p. 456-64.**
59. **Ladomery, M., E. Wade, and J. Sommerville,** ***Xp54, the Xenopus homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes.*** **Nucleic Acids Res, 1997. 25(5): p. 965-73.**
60. **Nakamura, A., et al.,** ***Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during Drosophila oogenesis.*** **Development, 2001. 128(17): p. 3233-42.**
61. **Tseng-Rogenski, S.S., et al.,** ***Functional conservation of Dhh1p, a cytoplasmic DExD/H-box protein present in large complexes.*** **Nucleic Acids Res, 2003. 31(17): p. 4995-5002.**

62. **Smillie, D.A. and J. Sommerville,** ***RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles.*** **J Cell Sci, 2002. 115(Pt 2): p. 395-407.**
63. **Minshall, N. and N. Standart,** ***The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer.*** **Nucleic Acids Res, 2004. 32(4): p. 1325-34.**
64. **Minshall, N., G. Thom, and N. Standart,** ***A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking.*** **Rna, 2001. 7(12): p. 1728-42.**
65. **Andrei, M.A., et al.,** ***A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies. .*** **Rna, 2005. 11(5): p. p. 717-27.**
66. **Sheth, U. and R. Parker,** ***Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies.*** **Science, 2003. 300(5620): p. 805-8.**
67. **Liu, J., et al.,** ***MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.*** **Nat Cell Biol, 2005. 7(7): p. 719-23.**
68. **Sen, G.L. and H.M. Blau,** ***Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies.*** **Nat Cell Biol, 2005. 7(6): p. 633-6.**
69. **Ding, L., et al.,** ***The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in C. elegans.*** **Mol Cell, 2005. 19(4): p. 437-47.**
70. **Pillai, R.S., et al.,** ***Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells.*** **Science, 2005. 309(5740): p. 1573-6.**
71. **Yang, W.H., et al.,** ***RNA-associated protein 55 (RAP55) localizes to mRNA processing bodies and stress granules.*** **Rna, 2006. 12(4): p. 547-54.**
72. **Ciosk, R., M. DePalma, and J.R. Priess,** ***ATX-2, the C. elegans ortholog of ataxin 2, functions in translational regulation in the germline.*** **Development, 2004. 131(19): p. 4831-41.**
73. **Tharun, S., et al.,** ***Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay.*** **Nature, 2000. 404(6777): p. 515-8.**
74. **Akao, Y., et al.,** ***The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues.*** **Cancer Res, 1995. 55(15): p. 3444-9.**
75. **Abdelhaleem, M.,** ***Do human RNA helicases have a role in cancer?*** **Biochim Biophys Acta, 2004. 1704(1): p. 37-46.**
76. **Coller, J. and R. Parker,** ***General translational repression by activators of mRNA decapping.*** **Cell, 2005. 122(6): p. 875-86.**
77. **Teixeira, D., et al.,** ***Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs.*** **Rna, 2005. 11(4): p. 371-82.**
78. **Brengues, M., D. Teixeira, and R. Parker,** ***Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies.*** **Science, 2005. 310(5747): p. 486-9.**
79. **Fenger-Gron, M., et al.,** ***Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping.*** **Mol Cell, 2005. 20(6): p. 905-15.**
80. **Yu, J.H., et al.,** ***Ge-1 is a central component of the mammalian cytoplasmic mRNA processing body.*** **Rna, 2005. 11(12): p. 1795-802.**
81. **Hashimoto, K., et al.,** ***Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines.*** **Carcinogenesis, 2001. 22(12): p. 1965-70.**
82. **Koyano, S., et al.,** ***Neuronal intranuclear inclusions in spinocerebellar ataxia type 2: triple-labeling immunofluorescent study.*** **Neurosci Lett, 1999. 273(2): p. 117-20.**