

**Aus dem  
Department für Diagnostische Labormedizin  
der Universität Tübingen  
Institut für Medizinische Genetik und angewandte Genomik**

**Analysen zur Modifikation der  
Promotoraktivität des  
Transportproteingens Karyopherin  $\alpha$ -3  
als möglicher Therapieansatz bei der  
Spinocerebellären Ataxie Typ 3**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**Schröder, Carolina Alexandra Licia**

**2023**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. O. Rieß  
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Wissinger

Tag der Disputation: 28.04.2022

Meinen Eltern in tiefer Verbundenheit und Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Einführung in die Pathogenese der SCA3.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Epidemiologie .....</b>	<b>1</b>
<b>1.3 Klinik der SCA3 .....</b>	<b>2</b>
1.3.1 Klassifikation .....	2
1.3.2 Mittleres Erkrankungsalter und mittlere Überlebensrate.....	5
1.3.3 Klinische Manifestation und Symptome .....	6
1.3.4 Diagnosestellung .....	7
<b>1.4 Ätiologie der SCA3: Trinukleotidexpansion im ATXN3 Gen.....</b>	<b>8</b>
<b>1.5 Das Ataxin-3 Protein.....</b>	<b>10</b>
1.5.1 Funktion des Ataxin-3 Proteins .....	10
1.5.2 Lokalisation des Ataxin-3 Proteins.....	12
1.5.3 Intranukleäre Inklusionen und Transport des Ataxin-3 Proteins .....	14
<b>1.6 Das Transportprotein Karyopherin <math>\alpha</math>-3 (KPNA3) .....</b>	<b>17</b>
<b>1.7 Therapie der SCA3.....</b>	<b>20</b>
1.7.1 Supportive Therapie.....	20
1.7.2 Therapeutische Ansätze .....	21
<b>1.8. Fragestellung dieser Arbeit .....</b>	<b>24</b>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Materialien .....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Kits und Reagentien.....	27
2.1.2 Puffer.....	28
2.1.3 Molekularbiologische Materialien .....	29
2.1.4 Mikrobiologische Materialien.....	31
2.1.5 Zellbiologische Materialien.....	32
2.1.6 FDA-Medikamentenbibliothek.....	33
2.1.7 Proteinbiochemische Materialien .....	33
2.1.8 Verbrauchsmaterialien .....	34
2.1.9 Geräte .....	36
2.1.10 Software .....	38
<b>2.2 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>39</b>
2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	39
2.2.2 Methoden im Rahmen der Klonierung .....	40
<b>2.3 Mikrobiologische Methoden .....</b>	<b>48</b>
2.3.1 Herstellung von Agarplatten.....	48
2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	49
2.3.3 Transformation und Ausplattierung auf Agarplatten .....	49
2.3.4 Retransformation .....	51
<b>2.4 Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>52</b>
2.4.1 Allgemeine Zellkultur-Methoden .....	52
2.4.2 Zellkultur im Rahmen des Western-Blots.....	53
2.4.3 Zellkultur im Rahmen des Luciferase Assays .....	54
<b>2.5 Luciferase Assay .....</b>	<b>59</b>
2.5.1 Allgemeines Prinzip des Luciferase Assays .....	59

2.5.2 Durchführung des Luciferase Assays .....	60
2.5.3 Auswertung des Luciferase Assays .....	62
<b>2.6 Medikamenten-Screening .....</b>	<b>63</b>
2.6.1 Getestete Wirkstoffe und Konzentrationsbereiche.....	63
2.6.2 Verdünnung der Wirkstoffe .....	64
2.6.3 Auswertung des Medikamenten-Screenings .....	67
<b>2.7 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>67</b>
2.7.1 Bradford-Assay .....	67
2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese .....	69
2.7.3 Western-Blot .....	70
<b>2.8 Statistik .....</b>	<b>72</b>
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>74</b>
<b>3.1 Durch die Etablierung und Optimierung des Luciferase Assays als Reporter-gen Assay wird die Promotoraktivität von <i>KPNA3</i> zuverlässig messbar. ....</b>	<b>74</b>
3.1.1 Überblick über die verwendeten Konstrukte .....	75
3.1.2 Variationen in der Zellkultur .....	77
3.1.3 <i>Quenching</i> der Lumineszenz der Firefly-Reaktion .....	83
3.1.4 Weitere Variationen in der Durchführung des Luciferase Assays.....	89
3.1.5 Überführung des Assays von einer 96- <i>Well</i> -Platte in eine 384- <i>Well</i> -Platte: Endversion nach Etablierung .....	91
<b>3.2 Der SNP rs11618521 innerhalb des <i>KPNA3</i> Promotors reguliert die <i>KPNA3</i> Promotoraktivität. ....</b>	<b>92</b>
<b>3.3 Die erfolgreiche Klonierung einer PEST-Sequenz in die verwendeten Konstrukte senkt signifikant die Halbwertszeit der Luciferase.....</b>	<b>95</b>
3.3.1 Verarbeitung des <i>gBlock</i> Gen-Fragments.....	95
3.3.2 Klonierung einer PEST-Sequenz in das pGL3- <i>KPNA3</i> -G Konstrukt mit einem Fragment des <i>KPNA3</i> Promotors.....	97
3.3.3 Klonierung einer PEST-Sequenz in das pLUC- <i>ATXN3</i> /Ca Konstrukt mit einem Fragment des <i>ATXN3</i> Promotors .....	102
3.3.4 PEST-Konstrukte senken im Luciferase Assay und Western-Blot signifikant die Halbwertszeit der Luciferase. ....	105
<b>3.4 Durchführung eines Medikamenten-Screenings zur Testung von der Wirkung elf unterschiedlicher Wirkstoffe auf die <i>KPNA3</i> Promotoraktivität ..</b>	<b>107</b>
3.4.1 Zu den Wirkstoffen .....	107
3.4.2 Etablierung des Medikamenten-Screenings .....	109
3.4.3 Divalproex Natrium zeigt eine vom SNP rs11618521 abhängige Modulation der <i>KPNA3</i> Promotoraktivität. ....	111
3.4.4 Die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Divalproex Natrium und Natriumbutyrat zeigen eine mögliche Wirkung auf die <i>ATXN3</i> Promotoraktivität.....	116
3.4.5 Sorafenib Tosylate zeigt eine mögliche Wirkung auf die <i>KPNA3</i> und <i>ATXN3</i> Promotoraktivitäten. ....	118
3.4.6 Benserazid HCl und Artemether zeigen eine mögliche Wirkung auf die <i>ATXN3</i> Promotoraktivität.....	119
3.4.7 Ergebnisse weiterer getesteter Wirkstoffe: Clotrimazol, Bleomycinsulfat, Furosemid, Zolmitriptan, Rizatriptanbenzoat und Disulfiram .....	122
<b>3.5 Zusammenfassung Ergebnisse .....</b>	<b>127</b>
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>130</b>
<b>4.1 Durch die Etablierung und Optimierung des Luciferase Assays als Reporter-gen Assay wird die Promotoraktivität von <i>KPNA3</i> zuverlässig messbar. ....</b>	<b>130</b>

<b>4.2 Der SNP rs11618521 innerhalb des <i>KPNA3</i> Promotors reguliert die <i>KPNA3</i> Promotoraktivität. ....</b>	<b>134</b>
<b>4.3 Die erfolgreiche Klonierung einer PEST-Sequenz in die verwendeten Konstrukte senkt signifikant die Halbwertszeit der Luciferase.....</b>	<b>137</b>
<b>4.4 Durchführung eines Medikamenten-Screenings zur Testung von der Wirkung elf unterschiedlicher Wirkstoffe auf die <i>KPNA3</i> Promotoraktivität ..</b>	<b>140</b>
4.4.1 Allgemeine Überlegungen zur Interpretation der Ergebnisse .....	142
4.4.2 Divalproex Natrium zeigt eine vom SNP rs11618521 abhängige Modulation der <i>KPNA3</i> Promotoraktivität. ....	145
4.4.3 Die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Divalproex Natrium und Natriumbutyrat zeigen eine mögliche Wirkung auf die <i>ATXN3</i> Promotoraktivität.....	150
4.4.4 Sorafenib Tosylate zeigt eine mögliche Wirkung auf die <i>KPNA3</i> und <i>ATXN3</i> Promotoraktivitäten. ....	151
4.4.5 Benserazid HCl und Artemether zeigen eine mögliche Wirkung auf die <i>ATXN3</i> Promotoraktivität.....	152
<b>4.5 Schlussfolgerung.....</b>	<b>155</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>158</b>
<b>6. Englische Zusammenfassung .....</b>	<b>160</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>162</b>
<b>8. Erklärung zum Eigenanteil.....</b>	<b>189</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>190</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
AAO:	<i>Age at onset</i> / Erstmanifestationsalter
ADCA:	Autosomal-dominant vererbte zerebelläre Ataxien
AK:	Antikörper
ATP:	Adenosintriphosphat
ATXN3:	<i>Ataxin-3</i> Gen
bp:	Basenpaare
BHS:	Blut-Hirn-Schranke
BSA:	<i>Bovine serum albumin</i> / Bovines Serumalbumin
C/EBP:	CCAAT/ Enhancer-Binding-Proteine
Da:	Dalton
dH <sub>2</sub> O:	Destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O:	Doppel-destilliertes Wasser
DLR:	Dual-Glo Luciferase Reagenz
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	<i>Desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
dNTPs:	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS:	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DSR:	Dual-Glo Stop&Glo Reagenz
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> / Ethylendiamintetraessigsäure
ERAD:	Endoplasmatisches Retikulum- assoziierte Degradation
FDA:	<i>Food and Drug Administration</i> / Behörde für Lebens- und Arzneimittel
F-Luc:	Firefly-Luciferase
F-Lum:	Firefly-Lumineszenz
FOXP3:	Forkhead-Box-Protein P3
G:	Guanin
x g	<i>g-force</i> (= Relative Zentrifugalbeschleunigung)

GAPDH:	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HDAC:	Histon-Deacetylase
HDACi:	Histon-Deacetylase Inhibitoren
HEK-293T:	<i>Human Embryonic Kidney 293T</i> / menschliche embryonale Nierenzellen 293T
HWZ:	Halbwertszeit
Inc.:	<i>Incorporated</i>
Kat. Nr.:	Katalognummer
kb:	Kilobase
KPNA2:	Karyopherin $\alpha$ -2 = Importin <i>subunit</i> $\alpha$ -1
KPNA3:	Karyopherin $\alpha$ -3 = Importin <i>subunit</i> $\alpha$ -4
KPNB1:	Karyopherin $\beta$ -1 = Importin <i>subunit</i> $\beta$ -1
LB:	<i>Lysogeny Broth</i>
Luc:	Luciferase
miRNA:	microRNA
mRNA:	<i>Messenger RNA</i> / proteinkodierende RNA
n:	Anzahl der Versuche / Probanden
NCBI:	<i>National Center for Biotechnology Information</i> / Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NES:	<i>Nuclear export signal</i> / Nukleäres Export Signal
NIH:	<i>National Institutes of Health</i> / Nationale Gesundheitsinstitute
NLS:	<i>Nuclear localization signal</i> / Kernimportsignal
NPC:	<i>Nuclear pore complex</i> / Kernpore
ns:	nicht-signifikant
OD:	Optische Dichte
p:	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR:	<i>Polymerase chain reaction</i> / Polymerase-Kettenreaktion
polyQ:	Polyglutamin
RLA:	Relative Luciferase-Aktivität
RLU:	<i>Relative light/ luminescence unit</i> / Relative Lichteinheiten
R-Luc:	Renilla-Luciferase
R-Lum:	Renilla-Lumineszenz

RNA:	<i>Ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
rpm:	<i>Revolutions per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RRR:	<i>Relative Response Ratio</i>
SCA3:	Spinozerebelläre Ataxie Typ 3
SDS-Page:	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> / Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM:	<i>Standard error of the mean</i> / Standardfehler
SNP:	<i>Single nucleotide polymorphism</i> / Einzelnukleotidpolymorphismus
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
TBE:	Tris-Borat-EDTA
TBS:	<i>Tris-buffered Saline</i>
TBS-T:	<i>Tris-buffered Saline- Tween 20</i>
TE-Puffer	Tris EDTA-Puffer
U:	<i>Unit</i> (Enzymeinheit)
UIM:	<i>Ubiquitin-interacting motif</i> / Ubiquitin-interagierendes Motiv
UTR:	<i>Untranslated region</i> / untranslatierte Region
VPA:	<i>Valproic acid</i> / Valproinsäure
vs.:	versus
v/v:	<i>Volume per volume</i> / Volumen pro Volumen
WT:	Wildtyp
w/v:	<i>Weight per volume</i> / Gewicht pro Volumen
X:	-fach

## **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: Visualisierung der Ätiologie der SCA3 mithilfe eines vereinfachten Schaubildes des <i>ATXN3</i> Gens und des Ataxin-3 Proteins.....	9
Abbildung 2: Gegenüberstellung der Immunhistochemie von Neuronen (hier aus dem Hirnstamm) von nicht an SCA3 erkrankten Probanden (A) vs. von SCA3-Patienten (B).....	14
Abbildung 3: Schematische Darstellung der therapeutischen Ansätze bei der Behandlung der SCA3.....	22
Abbildung 4: Gleichung zur Bestimmung des einzusetzenden Verhältnisses von Vektor zu Insert für die Ligation.....	46
Abbildung 5: Gleichung zur Bestimmung der Molarität der Enden, um das Verhältnis von Vektor zu Insert für die Ligation abzuschätzen.....	46
Abbildung 6: Ausplattierung eines Retransformationsansatzes auf eine Agarplatte.....	51
Abbildung 7: Berechnung der ungefähren Gesamtzahl der Zellen in einer Suspension mithilfe der Neubauer-Zählkammer nach Auszählung der vier Quadranten.....	55
Abbildung 8: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Transfektion vor der Durchführung des Luciferase Assays.....	56
Abbildung 9: Katalysierte biolumineszente Reaktionen der Firefly- und Renilla-Luciferase.....	60
Abbildung 10: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte bei der Durchführung des <i>Dual-Glo Luciferase Assay Systems</i> von Promega.....	60
Abbildung 11: Berechnung der <i>Relative Response Ratio</i> (RRR), um mehrere Luciferase Assays miteinander vergleichen zu können.....	62
Abbildung 12: Erste Verdünnungsmethode der Wirkstoffe.....	64
Abbildung 13: Zweite Verdünnungsmethode der Wirkstoffe.....	65
Abbildung 14: Aufbau des Transfers im Rahmen des Western-Blots.....	70
Abbildung 15: Flussschema der einzelnen Methoden bei der Durchführung eines Luciferase Assays mit genauer Angabe der optimierten Parameter (in grün) im Rahmen der Etablierung.....	75
Abbildung 16: Vereinfachtes Schema der verwendeten Konstrukte.....	76
Abbildung 17: Luciferase Assay, bei dem eine Variation der Zellzahl im Rahmen der Etablierung vorgenommen wurde.....	79
Abbildung 18: Gegenüberstellender Vergleich zweier Versuchsansätze bei der Durchführung von Luciferase Assays, bei denen die Zellen nach Subkultivierung zum einen direkt aus der Zellsuspension für die weitere Versuchsdurchführung eingesetzt wurden („Zellen in Suspension“), und zum anderen zunächst pelletiert wurden („Zellen pelletiert“)......	80
Abbildung 19: Gegenüberstellender Vergleich zweier Versuchsansätze zur schnelleren und effektiven Durchführbarkeit der Transfektion im Rahmen des Luciferase Assays.....	82
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Grundidee des <i>Dual-Glo Luciferase Assay Systems</i> von Promega.....	83
Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese zur Untersuchung der Reinheit zweier unterschiedlicher Präparationen des pRL-CMV Vektors.....	85

Abbildung 22: Variation der Inkubationszeit mit dem Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) im Rahmen des Luciferase Assays.....	88
Abbildung 23: Gegenüberstellung zweier Ansätze zur Reduzierung der Reagenzmenge im Rahmen des Luciferase Assays, indem die Zugabe von jeweils 20 bzw. 10 µl des Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) miteinander verglichen wurden.....	90
Abbildung 24: Schematische Darstellung des <i>KPNA3</i> Promotors und des <i>KPNA3</i> Gens. ....	93
Abbildung 25: Der SNP rs11618521 innerhalb des <i>KPNA3</i> Promotors reguliert die <i>KPNA3</i> Promotoraktivität. ....	94
Abbildung 26: Auf ein 1,5 %-iges TBE-Testgel aufgetragene, amplifizierte <i>gBlock</i> - Sequenzen. ....	97
Abbildung 27: Schematische Darstellung des Prinzips der Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes durch Einfügen einer PEST-Sequenz in das pGL3-KPNA3-G Konstrukt, das ein Fragment des <i>KPNA3</i> Promotors enthält. ....	98
Abbildung 28: Gegenüberstellung der Puffer <i>NEBuffer 2.1</i> und <i>CutSmart</i> für den Restriktionsverdau des Konstruktes pGL3-KPNA3-G. 1,5 %-iges TBE-Testgel. ....	99
Abbildung 29: Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes. ....	100
Abbildung 30: Ausschnitt der Sequenz des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mit Strang (von 5' nach 3') und Gegenstrang (von 3' nach 5').. ....	102
Abbildung 31: Schematische Darstellung des Prinzips der Klonierung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes durch Einfügen einer PEST-Sequenz in das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt, das ein Fragment des <i>ATXN3</i> Promotors enthält. ....	103
Abbildung 32: Ausschnitt der Sequenz des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes mit Strang (von 5' nach 3') und Gegenstrang (von 3' nach 5'). ....	105
Abbildung 33: Auswirkungen einer zusätzlichen C-terminalen PEST-Sequenz auf die Halbwertszeit der Firefly-Luciferase (F-Luc).....	106
Abbildung 34: Luciferase Assays, bei denen transfizierte Zellen mit Sorafenib Tosylate (A und B) und Benserazid HCl (C und D) für 24 h inkubiert wurden.....	110
Abbildung 35: Zeitliche Abfolge der Versuchsdurchführung des Medikamenten-Screenings.....	111
Abbildung 36: Luciferase Assays bei Zugabe von Divalproex Natrium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-A (A) und pGL3-KPNA3-G (B).....	112
Abbildung 37: Luciferase Assays bei Zugabe von 100 µM (A), 300 µM (B) und 500 µM (C) Divalproex Natrium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G.....	113
Abbildung 38: Vergleich von mit dem pGL3-KPNA3-A (mit SNP= A) oder pGL3-KPNA3-G (mit SNP= G) transfizierten Zellen, zu denen entweder kein Wirkstoff oder 100 µM bzw. 500 µM Divalproex Natrium zugegeben wurden.....	115
Abbildung 39: Luciferase Assays bei Zugabe von Divalproex Natrium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). ....	116

Abbildung 40: Luciferase Assays bei Zugabe von Natriumbutyrat zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). .....	117
Abbildung 41: Luciferase Assays bei Zugabe von Sorafenib Tosylate zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A, B), pGL3-KPNA3-G-PEST (C) und pLUC- ATXN3/Ca-PEST (D).....	119
Abbildung 42: Luciferase Assays bei Zugabe von Benserazid HCl zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC- ATXN3/Ca-PEST (C).....	120
Abbildung 43: Luciferase Assays bei Zugabe von Artemether zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). .....	121
Abbildung 44: Luciferase Assays bei Zugabe von Clotrimazol zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC- ATXN3/Ca-PEST (C).....	122
Abbildung 45: Luciferase Assays bei Zugabe von Bleomycinsulfat zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). .....	123
Abbildung 46: Luciferase Assays bei Zugabe von Furosemid zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC- ATXN3/Ca-PEST (C).....	124
Abbildung 47: Luciferase Assays bei Zugabe von Zolmitriptan zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC- ATXN3/Ca-PEST (C) und Rizatriptanbenzoat zu den Konstrukten pGL3- KPNA3-G-PEST (D) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (E). ....	125
Abbildung 48: Luciferase Assays bei Zugabe von Disulfiram zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). ....	126

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Aufteilung einer Auswahl autosomal-dominant vererbter zerebellärer Ataxien (ADCAs) nach Harding.....	3
Tabelle 2: Klinische Subtypen der SCA3.....	4
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Kits und Reagentien.....	27
Tabelle 4: Verwendete Puffer unter Angabe ihrer Zusammensetzung und ihrer Einsatzbereiche.....	28
Tabelle 5: Verwendete Plasmide.....	29
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien in der Molekularbiologie.....	30
Tabelle 7: Verwendete chemisch kompetente Zellen.....	31
Tabelle 8: Verwendete Chemikalien in der Mikrobiologie.....	31
Tabelle 9: Verwendete Zelllinie.....	32
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien in der Molekularbiologie.....	32
Tabelle 11: Wirkstoffe, die im Rahmen des Medikamenten-Screenings getestet wurden.....	33
Tabelle 12: Primäre Antikörper (AK).....	33
Tabelle 13: Sekundäre Antikörper (AK).....	34
Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien; gegliedert nach ihren Einsatzschwerpunkten.....	34
Tabelle 15: Auflistung der eingesetzten Geräte; gegliedert nach ihren Einsatzschwerpunkten.....	36
Tabelle 16: Verwendete Software-Programme für gesammelte Informationen über den SNP sowie für die Auswertung von Klonierungen, Luciferase Assays und Western-Blots, und für das Kreieren von Graphen sowie die statistische Auswertung.....	38
Tabelle 17: Schrittweise Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.....	41
Tabelle 18: Verwendete Primer unter Angabe ihrer Sequenz.....	41
Tabelle 19: <i>Touchdown</i> -PCR-Programm mit <i>Pwo</i> -Polymerase.....	42
Tabelle 20: Verwendete Restriktionsendonukleasen für den Restriktionsverdau.....	43
Tabelle 21: Zusammenfassung einiger Besonderheiten beim Ausgießen von Agarosegelen.....	44
Tabelle 22: Verwendete Molekülmassenstandards für die Agarosegelelektrophorese.....	45
Tabelle 23: Verwendeter Primer für die Sequenzierung unter Angabe der Konzentration und der Sequenz.....	47
Tabelle 24: Verwendete Zellzahl in bestimmtem Volumen pro <i>Well</i> abhängig von der Kulturplatte.....	55
Tabelle 25: Transfektion von HEK-293T Zellen in einer 96- <i>Well</i> -Platte mit Berücksichtigung der Angaben im <i>Fast-Forward</i> Protokoll ( <i>Attractene Transfection Reagent</i> , QIAGEN GmbH).....	57
Tabelle 26: Transfektion von HEK-293T Zellen in einer 384- <i>Well</i> -Platte.....	58
Tabelle 27: Auflistung der getesteten Wirkstoffe unter Angabe der molaren Masse, der Molarität der verwendeten Stammlösungen und der Lösungsmittel, in denen die Wirkstoffe gelöst wurden.....	63
Tabelle 28: Pipettierschema für den Bradford-Assay.....	68

Tabelle 29: Zusammensetzung des Sammelgels und Trenngels für die SDS-Page. ....	69
Tabelle 30: Gegenüberstellender Vergleich von repräsentativen, gemessenen Rohdaten für die Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und Renilla Lumineszenz (R-Lum) (in Relativer Lichteinheit (RLU)) bei Kotransfektion der Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pRL-CMV in entweder HEK-293T Zellen oder HEK-293 Zellen. ....	78
Tabelle 31: Vergleich der im Rahmen eines Luciferase Assays erhobenen, aufgerundeten absoluten Werte der Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und Renilla-Lumineszenz (R-Lum) bei Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse der Konstrukt-DNA (mit einem Gen für die Firefly-Luciferase (F-Luc)) zur pRL-CMV DNA (mit einem Gen für die Renilla-Luciferase (R-Luc)). ....	87
Tabelle 32: Zusammenfassung der vorgenommenen Veränderungen bei der Reduzierung der Reagenzmengen des Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) bei der Durchführung des Luciferase Assays. ....	90
Tabelle 33: Gegenüberstellender Vergleich wichtiger Parameter für die Transfektion von HEK-293T Zellen und die Durchführung des Luciferase Assays in 96-Well-Platten und 384-Well-Platten. ....	91
Tabelle 34: Einzelheiten zum SNP rs116118521 innerhalb des <i>KPNA3</i> Promotors. ....	92
Tabelle 35: Details zum <i>gBlock</i> Gen-Fragment. ....	96
Tabelle 36: Auflistung der untersuchten Wirkstoffe mit Informationen zu den Wirkstofftypen, den Wirkmechanismen, den klinischen Einsätzen und der Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke (BHS). ....	107
Tabelle 37: Zusammenfassung der Wirkung von getesteten Wirkstoffen auf den <i>KPNA3</i> bzw. <i>ATXN3</i> Promotor. ....	129
Tabelle 38: Interpretation der Ergebnisse eines Luciferase Assays. ....	143

## **1. Einleitung**

### **1.1 Einführung in die Pathogenese der SCA3**

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3, kurz SCA3, in der Literatur auch als Machado-Joseph-Erkrankung (MJD) bekannt, ist eine neurodegenerative Erkrankung, die autosomal-dominant vererbt wird (Takiyama et al. 1993). Die genetische Erkrankungsursache liegt in einer Expansion eines Cytosin-Adenin-Guanin (CAG) Basentriplets im kodierenden Bereich des *Ataxin-3* Gens (*ATXN3*) (Kawaguchi et al. 1994). Diese Expansion führt im Ataxin-3 Protein, das von *ATXN3* kodiert wird, zu einem verlängerten Polyglutamin (polyQ)-Bereich, der seinerseits eine Aggregationsbildung des Proteins begünstigt. Diese Aggregate stellen ein zentrales Merkmal in der Pathogenese der SCA3 dar (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998).

SCA3 gehört somit zur Gruppe der polyQ-Expansions-Erkrankungen, zu denen noch acht weitere Erkrankungen gezählt werden: die Spinozerebellären Ataxien Typ 1, 2, 6, 7 und 17, die Dentatorubrale Pallidoluysische Atrophie (DRPLA), Chorea Huntington (engl. *Huntington's disease*) und die spinobulbäre Muskelatrophie (SBMA, auch Kennedy-Erkrankung genannt) (La Spada et al. 1991, Gispert et al. 1993, Huntington's Disease Collaborative Research Group 1993, Orr et al. 1993, Zhuchenko et al. 1997, Kanazawa 1999, Koide et al. 1999, Michalík et al. 1999).

### **1.2 Epidemiologie**

SCA3 ist die häufigste autosomal-dominant vererbte Ataxie weltweit (Coutinho und Andrade 1978, Takiyama et al. 1993, Ranum et al. 1995, Paulson 2012). Hierbei variiert der relative Anteil der SCA3 an allen SCAs von Land zu Land. In Ländern wie Brasilien (Jardim et al. 2001), Portugal (Vale et al. 2010, Silveira et al. 1998), Singapur (Zhao et al. 2002), China (Tang et al. 2000, Jiang et al. 2005) und Japan (Maruyama et al. 2002, Shibata-Hamaguchi et al. 2009) erreicht die SCA3 eine deutlich hohe relative Prävalenz im Vergleich zu den anderen SCAs. Aber auch in den Niederlanden (van de Warrenburg et al. 2002) und in Deutschland (Schöls et al. 1997) (mit einem Anteil von ca. 40 %), sowie

in Kanada (Kraft et al. 2005) oder in den USA (Moseley et al. 1998) (mit ca. über 20 %) macht die SCA3 einen beträchtlichen Teil aller SCAs aus. Auf den portugiesischen Azoren, auf denen das Erkrankungsbild der SCA3 zum ersten Mal beschrieben wurde, erreicht die SCA3 auf der Insel Flores die höchste weltweit bekannte Prävalenz von 1:239 (Stand: Januar 2008) (Sudarsky und Coutinho 1995, Bettencourt et al. 2008). Es gibt keine genaueren Daten über die allgemeine Prävalenz der Erkrankung, da bisher epidemiologische Daten nur für bestimmte Regionen vorliegen. Mehreren Studien zufolge wird die Prävalenz aller SCAs auf ca. 3 Fälle pro 100.000 Einwohner geschätzt, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass die eigentlichen Zahlen höher liegen (van de Warrenburg et al. 2002, Schöls et al. 2004, Bettencourt et al. 2008).

### **1.3 Klinik der SCA3**

#### **1.3.1 Klassifikation**

##### **1.3.1.1 Klinische Aufteilung der SCAs**

Da die Spinozerebellären Ataxien eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe repräsentieren, stellt sich der Versuch einer Klassifizierung als schwierig dar. Die SCAs werden zu den sogenannten zerebellären „Heredoataxien“ gezählt und gehören in die Gruppe der autosomal-dominant vererbten zerebellären Ataxien (ADCA). Die ADCAs werden hierbei in der Klassifikation nach Harding in drei klinisch definierte Gruppen aufgeteilt, denen als genetische Subtypen die Spinozerebellären Ataxien (SCAs) zugeordnet werden können (Harding 1982, Riess et al. 2001, Schöls et al. 2004, Whaley et al. 2011) (Tab. 1). Hierbei gibt es für diese Einteilung keine validierten diagnostischen Kriterien, sodass die Gruppierung anhand von klinischen, phänotypischen Merkmalen erfolgt. Dementsprechend ist die Aufteilung an manchen Stellen nicht ganz einheitlich, und sollte primär der Orientierung dienen. Es werden „rein“ zerebelläre Ataxien (ADCA III) von solchen Formen unterschieden, bei denen auch weitere neuronale Systeme mitbetroffen sind (ADCA I). ADCA II stellt hierbei eine eigene Kategorie dar, bei der im Rahmen der SCA7 eine pigmentöse Retina-

degeneration beobachtet wird. Die „rein“ zerebellären Ataxien (ADCA III) sind in der Regel nicht lebensverkürzend (Riess et al. 2001).

**Tabelle 1: Klinische Aufteilung einer Auswahl autosomal-dominant vererbter zerebellärer Ataxien (ADCAs) nach Harding.** SCA = Spinozerebelläre Ataxie. DRLPA = Dentatorubrale Pallidoluysische Atrophie. (Nach Harding 1982, Riess et al. 2001, Whaley et al. 2011).

ADCA	Klinische Unterscheidung	Klinisches Bild	Genetische Subtypen
I	System- übergreifende Formen	Ataxie plus weitere, variabel mitbetroffene neuronale Systeme: Optikusatrophie, Blickparesen, extrapyramidalmotorische Symptome, Spastik, Polyneuropathie, Inkontinenz, selten Demenz.	SCA1, SCA2, <b>SCA3</b> , SCA4, SCA8, SCA12, SCA13, SCA17, DRLPA
II		Ataxie plus zusätzliche pigmentöse Retinadegeneration.	SCA7
III	„Rein“ zerebelläre Ataxien	Zerebelläres Syndrom: Okulomotorikstörung, Dysarthrie, Gang-, Stand- und Extremitätenataxie. Gelegentlich auch milde Polyneuropathien oder Pyramidenbahnzeichen.	SCA5, SCA6, SCA10, SCA11, SCA14

Zusätzlich werden unter einem genetischen Gesichtspunkt solche SCAs unterschieden, die mit einer CAG-Expansion in der proteinkodierenden Region eines Gens einhergehen (Typ-1), von denjenigen Ataxien, bei denen sich das Trinukleotidrepeat in einer nichtkodierenden Region befindet (Typ-2) (Riess et al. 2001). Die SCA3 wird somit zum Typ-1 gezählt. Allerdings gibt es auch SCAs, die diesen Typen nicht zuordenbar sind, da sie keine Repeatexpansionen aufweisen (Riess et al. 2001).

### 1.3.1.2 Klinische Aufteilung der SCA3

Nicht nur die SCAs lassen sich klinisch in unterschiedliche Gruppen aufteilen. Auch innerhalb der SCA3 lassen sich sehr variable phänotypische Erscheinungsbilder finden; ein Phänomen, das mit dem Begriff der Pleomorphie ausgedrückt wird. Deswegen wurde auch die SCA3 in mehrere Subtypen unterteilt (Coutinho und Andrade 1978, Rosenberg 1992, Riess et al. 2008). Dabei sind die Grenzen zwischen den Typen zum Teil fließend, da sich manche Patienten nicht einem exakten Typen zuordnen lassen. So kann sich ein Typ im Laufe der Erkrankung zu einem anderen Typen entwickeln oder es kommen unterschiedliche Typen innerhalb einer Familie vor (Fowler 1984). Demzufolge ist die Einteilung von Patienten in Subtypen nur bedingt von klinischer Relevanz. Trotz allem zeigt die Aufteilung in Subtypen noch einmal deutlich die hohe klinische Heterogenität der SCA3 auf (Tab. 2).

**Tabelle 2: Klinische Subtypen der SCA3.** AAO: *Age at onset* / Erkrankungsalter. (Nach Riess et al. 2008).

Typ	Länge der CAG-Repeats	AAO	Klinisches Bild
I	längste <i>Repeats</i>	< 20 Jahre	Extrapyramidale Defizite (Dystonie, Bradykinesie), Pyramidale Defizite (Rigor, Spastik), oft geringe Ataxie.
II	breite Varianz, vor allem mittellange <i>Repeats</i>	20 - 50 Jahre	Zerebelläre Defizite (Ataxie), Pyramidale Defizite (Motoneuronsyndrom).
III	kürzeste <i>Repeats</i>	40 - 75 Jahre	Zerebelläre Defizite (Ataxie), periphere Neuropathie (Areflexie).
(IV)	nicht durch <i>Repeatlänge</i> erklärbar: andere Faktoren (Genetik und Umwelt)	variabel	Neuropathie, Parkinsonismus.
(V)	?	?	Ausschließlich spastische Paraplegie.

Der klinische Subtyp II wird am häufigsten beobachtet, gefolgt von Typ III und Typ I. Typ II zeichnet sich durch zerebelläre und pyramidale Defizite aus, während beim Typ III mit den kürzesten beobachteten *Repeats* außer zerebel-

lären Defiziten auch periphere Neuropathien beobachtet werden. Der Typ I ist durch die längsten *CAG-Repeats* charakterisiert und hat den frühesten AAO. Symptomatisch fallen hier extrapyramidale sowie pyramidale Defizite auf, wobei aber auch oft eine geringe Ataxie beobachtet wird (Lu et al. 2004). Auch die Typen IV und V wurden bereits vorgeschlagen, die jedoch beide bisher nicht einheitlich übernommen und akzeptiert wurden. Typ IV kann hierbei nicht durch die *Repeatlänge* erklärt werden, sodass andere Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Hier treten eine Neuropathie und Parkinsonismus als Symptome auf (Van Schaik et al. 1997). Beim Typ V wird ausschließlich eine spastische Paraplegie ohne eine zerebelläre Ataxie beobachtet (Wang et al. 2009, D'Abreu et al. 2010).

### **1.3.2 Mittleres Erkrankungsalter und mittlere Überlebensrate**

Die Erkrankung manifestiert sich als sehr heterogenes Bild und weist ein mittleres Erkrankungsalter (AAO (*Age at onset*)) von ca. 36 Jahren auf, wobei aber auch Erstmanifestationen bei Kindern mit 4 Jahren oder in einem sehr fortgeschrittenen Lebensalter (70 Jahre) bereits beobachtet wurden (Maciel et al. 2001, Riess et al. 2001, Carvalho et al. 2008, Saute und Jardim 2015, Sun et al. 2016). Hierbei korreliert die Länge der pathologischen CAG-Wiederholung umgekehrt proportional zu dem Erkrankungsalter (Maciel et al. 1995, Globas et al. 2008, Riess et al. 2001). Diese indirekte Korrelation zwischen *Repeat-Länge* und AAO sollte allerdings nur als statistische Aussage gewertet werden, da es nicht möglich ist, anhand der *Repeat-Länge* das Erkrankungsalter exakt vorherzusagen. Bei gleich langen Trinukleotidexpansionen werden individuell sehr unterschiedliche AAO beobachtet. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass außer der *Repeat-Länge* auch weitere modifizierende Gene sowie Umwelt- und Ernährungsfaktoren eine Rolle in der Variabilität des Erkrankungsalters spielen, die es im Einzelnen noch zu erforschen gilt (Riess et al. 2001).

Ein häufig auftretendes Phänomen bei den SCAs (außer bei der SCA6) ist die Antizipation, bei der es innerhalb einer Familie von der älteren zur jüngeren Generation hin zu einer früheren Erstmanifestation der Erkrankung bzw. zu schwereren Krankheitsverläufen kommt. Das Phänomen der Antizipation beruht

darauf, dass expandierte *Repeat*-Einheiten oft instabil von Generation zu Generation weitergegeben werden. So kann es sein, dass die Nachkommen eines SCA3-Patienten eine größere *Repeat*-Expansion und damit einhergehend in einem jüngeren Alter Symptome aufweisen als ihre Vorfahren (Cancel et al. 1997, Giunti et al. 1999). *De-novo*-Mutationen wurden für die SCA3 hingegen nicht beschrieben (Saute und Jardim 2015).

Die Erkrankung verläuft progredient und führt im Schnitt nach 6 bis 29 Jahren nach dem AAO zu einem frühzeitigen Tod durch typischerweise pulmonale Komplikationen und Kachexie (Sudarsky et al. 1992, Sequeiros und Coutinho 1993). Die mittlere Überlebensrate nach Auftreten der ersten Symptome liegt bei etwa 21 Jahren (Kieling et al. 2007, Sun et al. 2016).

### 1.3.3 Klinische Manifestation und Symptome

Die klinische Symptomatik ist abhängig von den Gehirnbereichen, die vom Nervenzellverlust betroffen sind (Riess et al. 2001). Betroffen sind bei SCA3-Patienten das Zerebellum mit dem *Nucleus dentatus*, sowie der Hirnstamm mit den *Nuclei pontis* (Sequeiros and Coutinho 1993, Paulson et al. 1997b, Schmidt et al. 1998). Außerdem können auch die Basalganglien, Hirnnerven und das Rückenmark betroffen sein (Rüb et al. 2008, Scherzed et al. 2012).

Als Leitsymptom aller SCAs ist eine progrediente Ataxie ohne Remissionen zu nennen. Diese äußert sich in Form einer Gangataxie durch Gangunsicherheit sowie durch eine Störung der Koordination von Bewegungen durch die Degeneration zerebellärer oder spinaler Systeme wie dem *Tractus spinocerebellaris* (Schöls et al. 1997). Es zeigt sich ein schlurfender, langsamer Gang und eine rhythmisch inhomogene, irreguläre und unkoordinierte Schrittfolge (Holmes 1939, Ebersbach et al. 1999, Palliyath et al. 1998, Serrao et al. 2012). Weitere zerebelläre Symptome sind eine Rumpfataxie, Extremitätenataxie sowie eine Dysarthrie. Außerdem können Störungen des *Nervus oculomotorius* mit dysmetrischen Blicksakkaden, einem Blickrichtungsnystagmus, einer verminderten Suppression des vestibulookulären Reflexes oder einer Ophthalmoplegie auftreten. Hierbei wird bei der SCA3 manchmal bereits vor Auftreten der Gangataxie die Entstehung von Doppelbildern beobachtet

(Riess et al. 2001), weswegen hier eine gezielte Untersuchung der Okulomotorik für eine frühzeitige Erkennung der Erkrankung indiziert ist (Wu C et al. 2017). Des Weiteren lassen sich als zerebelläre Symptome individuell auch eine muskuläre Hypotonie, Dysmetrie, Dysdiadochokinese oder ein Intentionstremor nachweisen (Lima und Coutinho 1980, Riess et al. 2001, Riess et al. 2008).

Je nach Subtyp der SCA3 (s. 1.3.1.2) können außer dem Zerebellum auch andere neuronale Systeme betroffen sein. In diesen Fällen treten z. B. auch extrapyramidale Symptome wie Dystonie, Rigor, Akinese, Bradykinese und Hypomimie auf. Wenn die Pyramidenbahnen betroffen sind, können die Patienten unter einer Spastik, gesteigerten Reflexen, spinalen Automatismen oder einem positiven Babinski-Zeichen leiden (Riess et al. 2001). Darüber hinaus kann es auch zu einer Polyneuropathie durch Beteiligung des peripheren Nervensystems mit Reflexabschwächung, atrophischen Paresen und Dysästhesien kommen. Auch autonome Systeme können betroffen sein, was zu Inkontinenz, Impotenz oder orthostatischer Dysregulation führen kann. Außerdem werden auch nichtmotorische Einschränkungen in Form von Schlafstörungen oder psychiatrischen Krankheitsbildern wie Depressionen und Angststörungen beobachtet (McMurtray et al. 2006, Almeida-Silva et al. 2013).

### **1.3.4 Diagnosestellung**

Eine Verdachtsdiagnose erfolgt mithilfe der klinischen Vorgeschichte. Die Schwere der Ataxie kann unter anderem mit dem sogenannten SARA (*Scale for the assessment and rating of ataxia*) Score bestimmt werden (Subramony 2007). In letzteren fließen der Gang, Stand, Sitz- und Sprachschwierigkeiten sowie der Finger-Nase-Versuch, Finger-Folge-Versuch, Knie-Hacken-Versuch und Tests zur Diadochokinese mit ein (Subramony 2007). Mittels bildgebender Verfahren wie Magnetresonanztomographie und Computertomographie kann die pathologische Makroanatomie sichtbar gemacht werden: Meistens lässt sich so eine zerebelläre Atrophie nachweisen, die sich in einigen Fällen auf eine pontozerebelläre Atrophie ausweitet (Burk et al. 1996). Dies zeigt sich in der Bildgebung vor allem durch eine Vergrößerung des vierten Ventrikels (Onodera

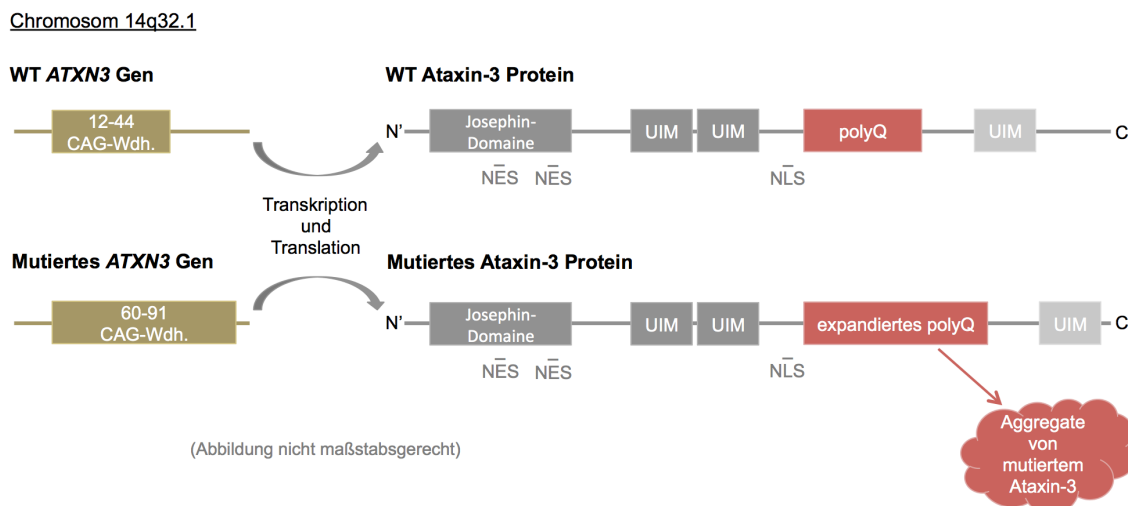
et al. 1998, Riess et al. 2008). Eine positive Familienanamnese gibt außerdem einen Anhalt für eine erbliche Ataxie. Die direkten Nachfahren eines SCA3-Patienten haben durch den autosomal-dominanten Erbgang eine 50 prozentige Chance auch an SCA3 zu erkranken. Deswegen ist jederzeit eine ausführliche Beratung und Aufklärung des Patienten zu gewährleisten. Die Bestätigung der Verdachtsdiagnose erfolgt dann anhand einer molekulargenetischen Diagnostik (Riess et al. 2001).

#### **1.4 Ätiologie der SCA3: Trinukleotidexpansion im ATXN3 Gen**

Das *ATXN3* Gen, das die genetische Grundlage der SCA3 bildet, liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 14q32.1 (Takiyama et al. 1993, Kawaguchi et al. 1994). Das Gen besteht aus insgesamt elf Exons (Kawaguchi et al. 1994, Ichikawa et al. 2001). In der Literatur findet man sehr viele genetische Studien, die sich mit der Anzahl der Trinukleotidrepeats befassen, und zum Teil leichte Abweichungen voneinander aufweisen (Saute und Jardim 2015). Normale Allele enthalten normalerweise 12 bis 44 CAG-Trinukleotidrepeats, wobei 93,5 % aller normalen Allele weniger als 31 CAG-Wiederholungen aufweisen (Cancel et al. 1995, Maciel et al. 1995, Ranum et al. 1995, Matsumura et al. 1996, Do Carmo Costa und Paulson 2012). In SCA3-Patienten, die eine volle Penetranz der Erkrankung zeigen und somit einen klassischen SCA3 Phänotypen aufweisen, werden ca. 60 bis 91 CAG-Wiederholungen beobachtet. Hierbei ist jedoch das kleinste Allel mit der vollen Penetranz nicht klar definiert (Kawaguchi et al. 1994, Cancel et al. 1995, Maciel et al. 1995, Ranum et al. 1995, Schöls et al. 1996, Saute und Jardim 2015). Die CAG-Wiederholungen zwischen 45 und 60 werden seltener beobachtet (Padiath et al. 2005, Do Carmo Costa und Paulson 2012).

Die genetische Ursache der SCA3 liegt somit in einer Expansion eines CAG-Basentriplets in der kodierenden Region des *ATXN3* Gens (Kawaguchi et al. 1994) (Abb. 1). Da CAG für die Aminosäure Glutamin kodiert, kommt es im Ataxin-3 Protein zu einem expandierten Polyglutamin (polyQ)- Bereich, der die Bildung von Aggregaten begünstigt, die pathologische Krankheitsmerkmale der SCA3 sind (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998). Der polyQ-Trakt

befindet sich C-terminal von zwei *Ubiquitin-interacting motifs* (UIMs) (Kawaguchi et al. 1994, Durr et al. 1996). Es sind mindestens zwei protein-codierende Isoformen des *ATXN3* Gens bekannt, die durch alternatives Spleißen und Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) modifiziert werden können. Somit entstehen unterschiedliche Varianten des Ataxin-3 Proteins, die sich vor allem C-terminal voneinander unterscheiden (Goto et al. 1997, Bettencourt et al. 2010, Weishäupl et al. 2019). Es wurde bereits gezeigt, dass die Splice-Varianten mit nur zwei UIMs eher Aggregate formen und weniger stabil sind als die Varianten mit drei UIMs (Harris et al. 2010, Weishäupl et al. 2019). Außerdem konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Varianten des Ataxin-3 Proteins auch unterschiedliche Auswirkungen auf den AAO haben (Weishäupl et al. 2019).



**Abbildung 1: Visualisierung der Ätiologie der SCA3 mithilfe eines vereinfachten Schaubildes des *ATXN3* Gens und des Ataxin-3 Proteins.** Die Abbildung ist nicht maßstabsgerecht, sondern soll nur einen Überblick über die wichtigsten Aspekte schaffen. Die genetische Ursache der SCA3 liegt in einer Expansion einer CAG-Wiederholung (CAG-Wdh.) in der kodierenden Region des *ATXN3* Gens mit Lokalisierung auf dem Chromosom 14q32.1 (Takiyama et al. 1993, Kawaguchi et al. 1994). Das Wildtyp (WT) Gen enthält 12 bis 44 CAG-Wiederholungen; im mutierten Gen werden hingegen 60 bis 91 Wiederholungen des Basentriplets beobachtet (Kawaguchi et al. 1994, Maciel et al. 1995, Schöls et al. 1996, Do Carmo Costa und Paulson 2012, Saute und Jardim 2015). Das *ATXN3* Gen kodiert für das Protein Ataxin-3, in dem es zu einem expandierten Polyglutamin (polyQ)-Bereich kommt. Aufgrund dieser Mutation bildet das mutierte Ataxin-3 Aggregate, die bei SCA3 als pathologische Krankheitsmerkmale bekannt sind (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998). Das Ataxin-3 Protein enthält eine N-terminale katalytische Region, die sogenannte Josephin-Domäne, die gefolgt wird von zwei *Ubiquitin-interacting motifs* (UIMs), dem polyQ-Trakt variabler Länge und je nach Isoform einem dritten UIM

(Kawaguchi et al. 1994, Durr et al. 1996). Das Ataxin-3 enthält 2 Nukleäre Export Signale (NES) in der Josephin-Domäne und ein Kernimportsignal (NLS) zwischen den ersten beiden UIMs und dem polyQ-Bereich (Antony et al. 2009, Macedo-Ribeiro et al. 2009).

In mehreren Studien wurde außerdem gezeigt, dass auch untranslatierte Transkripte mit expandiertem CAG-Trakt zu Dysfunktion und neuronaler Degeneration in *in vivo* SCA3-Modellen führen können, wodurch die RNA Toxizität eine wichtige Rolle in der Pathogenese der SCA3 zu spielen scheint (Li et al. 2008, Wang et al. 2011, Martí 2016). Weishäupl et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass das nichtexpandierte Ataxin-3 Allel protektive Eigenschaften ausübt, indem es, unabhängig von möglichen Isoformen, die pathologischen Mechanismen reduziert (Weishäupl et al. 2019).

### **1.5 Das Ataxin-3 Protein**

#### **1.5.1 Funktion des Ataxin-3 Proteins**

Das Ataxin-3 Protein hat ein Molekulargewicht von ungefähr 42 kDa und wird ubiquitär in Geweben exprimiert. Es zählt zu den deubiquitinierenden Enzymen, auch Deubiquitinasen genannt, die in der Lage sind, Polyubiquitin Ketten von Substratproteinen zu spalten und so freies Ubiquitin zur Verfügung zu stellen (Burnett et al. 2003, Burnett und Pittman 2005, Mao et al. 2005, Winborn et al. 2008, Nicastro et al. 2010). Die Josephin-Domäne am N-Terminus ist hierbei für die Ubiquitin-Protease-Aktivität von besonderer Relevanz (Nicastro et al. 2005). C-terminal befinden sich mehrere *Ubiquitin-interacting motifs* (UIMs), durch die das Ataxin-3 eng an Polyubiquitin-Ketten binden kann. Die UIMs und die Josephin-Domäne legen somit nahe, dass das Ataxin-3 wohl zum Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) gehört, durch das nicht mehr benötigte, fehlplatzierte oder falsch gefaltete Proteine durch Ubiquitin markiert werden (Wang et al. 2012). Die markierten Proteine gelangen daraufhin zu 26S-Proteasomen der Zelle, an denen sie ATP-abhängig hydrolysiert werden (Baumeister et al. 1998, Schmidt et al. 2002). Diese Annahme wird auch durch die Tatsache bekräftigt, dass Ataxin-3 direkt mit wichtigen Proteinen interagiert, die zum UPS gehören,

wie beispielsweise mit der Ubiquitin-Protein-Ligase Parkin, die auch im Rahmen des familiären Morbus Parkinson eine wichtige Rolle spielt (Durcan et al. 2011). Ataxin-3 spielt auch eine Rolle beim oxidativen Stress, indem es an der Expression von protektiven Genen beteiligt ist (Evert et al. 2003, Araujo et al. 2011). Somit übt das normale Ataxin-3 eine neuroprotektive Wirkung aus (Warrick et al. 2005, Rodrigues et al. 2010). Bei einer Überexpression des mutierten Ataxin-3 wurde hingegen beobachtet, dass Gene hochreguliert werden, die für Entzündungsproteine kodieren (Evert et al. 2001). Außerdem werden Entzündungsmediatoren aktiviert, die ihrerseits zu einer Überexpression von Zytokinen führen (Evert et al. 2003).

Ataxin-3 reguliert auch die Transkription, indem es mit Histonen und Transkriptionsaktivatoren wie dem CREB-*binding* Protein oder p300 sowie mit Transkriptionsrepressoren wie der Histon-Deacetylase 3 (HDAC3) interagieren kann (Li et al. 2002, Evert et al. 2003, Evert et al. 2006). In polyQ-Erkrankungen hingegen wurde bereits eine transkriptionelle Dysregulation beobachtet (Steffan et al. 2000, Wood et al. 2000, Li et al. 2002, Evert et al. 2006). Außerdem konnte auch gezeigt werden, dass Ataxin-3 Aggregate die Lokalisierung und Aktivität von Cajal-Körpern im Zellkern beeinflussen, die normalerweise in der RNA-Prozessierung eine wichtige Rolle spielen (Sun et al. 2007).

Ataxin-3 hat noch zahlreiche weitere Interaktionspartner, die für eine große Bandbreite an Funktionen sprechen. So wurde beispielsweise bereits beobachtet, dass das Ataxin-3 an die Polynukleotidkinase 3-Phosphatase binden kann, die an der DNA-Reparatur von DNA-Strangbrüchen beteiligt ist (Chatterjee et al. 2015, Gao et al. 2015). Auch wurde eine Interaktion mit der Checkpoint Kinase 1 beschrieben, die für die Arretierung des Zellzyklus nach DNA-Schäden verantwortlich ist (Tu et al. 2017). Darüber hinaus wurde eine Verbindung zwischen Ataxin-3 und dem Tumorsuppressor p53 gefunden, indem das Ataxin-3 die Stabilität und apoptotische Funktion des p53 reguliert. Die polyQ-Expansion führt dabei zu einer Verstärkung der Interaktion mit p53, die den Abbau von p53 vermindert. Dies zeigt sich in unterschiedlichen SCA3-Modellen durch eine erhöhte Apoptoserate (Liu et al. 2016). Des Weiteren interagiert Ataxin-3 mit den Zytoskelettproteinen Tubulin und Mikrotubuli-

assoziiertes Protein 2 (Mazzucchelli et al. 2009, Matos et al. 2011) sowie mit Proteinen wie Dynein und der HDAC6, die an der Bildung und Regulation von Aggresomen beteiligt sind (Burnett und Pittman 2005). Auch in der Endoplasmatisches Retikulum- assoziierten Degradation (ERAD) scheint Ataxin-3 mitbeteiligt zu sein, da es mit VCP (*Valosin-containing protein*), auch p97 genannt, interagiert (Zhong und Pittman 2006). Ebenso liegt der SCA3 eine Beeinträchtigung eines weiteren Proteindegradationssystem, der Autophagie, zugrunde, die in zahlreichen neurodegenerativen Erkrankungen beobachtet wird (Ravikumar et al. 2002, Cortes und La Spada 2015, Onofre et al. 2016). Während das WT Ataxin-3 über den polyQ-Trakt mit dem Beclin-1 Protein reagiert, das in der Regulation der Autophagie eine Rolle spielt, verhindert der expandierte polyQ-Bereich diese Interaktion (Ashkenazi et al. 2017).

Ob und wie der expandierte polyQ-Trakt im Rahmen der SCA3 die enzymatische Funktion des Ataxin-3 beeinflusst, ist noch nicht bekannt. Durch den expandierten polyQ-Trakt verändern sich allerdings die Bindungen zwischen Ataxin-3 und seinen Interaktionspartnern (Evert et al. 2003). Der Pathogenese der SCA3 scheinen somit sowohl die Bildung von Aggregaten durch die Expression des mutierten Ataxin-3 als auch der Verlust der Funktion des normalen Ataxin-3 zugrunde zu liegen (Evert et al. 2003, Araujo et al. 2011, Liu et al. 2016).

### **1.5.2 Lokalisation des Ataxin-3 Proteins**

Das Ataxin-3 Protein wird ubiquitär in Geweben exprimiert. Allerdings zeigen sich die der SCA3 zugrunde liegenden Pathologien nur im Bereich von Nervenzellen, die somit sensibler für die Veränderungen zu sein scheinen (Schmidt et al. 1998, Matos et al. 2011). Das Ataxin-3 Protein befindet sich innerhalb der Zelle primär im Zytoplasma. Dabei gibt es aber auch Zelltypen, in denen man das Ataxin-3 sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus findet (Paulson et al. 1997a, Wang et al. 1997, Schmidt et al. 1998, Tait et al. 1998, Trottier et al. 1998, Pozzi et al. 2008, Macedo-Ribeiro et al. 2009, Reina et al. 2010).

Es wurde bereits erkannt, dass die Lokalisation des expandierten Proteins innerhalb der Zelle eine grundlegende und wichtige Rolle in der Pathogenese der SCA3 spielt. Während sich das Ataxin-3 normalerweise im Zytoplasma befindet, beobachtet man Aggregate des mutierten Ataxin-3 Proteins vor allem im Zellkern. Hier bilden sie die sogenannten intranukleären Einschlusskörperchen, die die nukleäre Organisation und Transkription stören (Schmidt et al. 1998, Paulson et al. 1997b, Schöls et al. 2004, Sun et al. 2007). Auch axonale Inklusionen wurden bereits beobachtet (Seidel et al. 2010). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass der SCA3 Phänotyp in transgenen Mäusen deutlich stärker ausgeprägt ist, wenn sich das mutierte Ataxin-3 im Zellkern befindet. Wenn das Protein hingegen im Zytoplasma verbleibt, scheint es nicht so toxisch zu sein. Der Anteil an nukleärem, expandiertem Ataxin-3 korreliert damit direkt mit der Toxizität der Erkrankung (Bichelmeier et al. 2007).

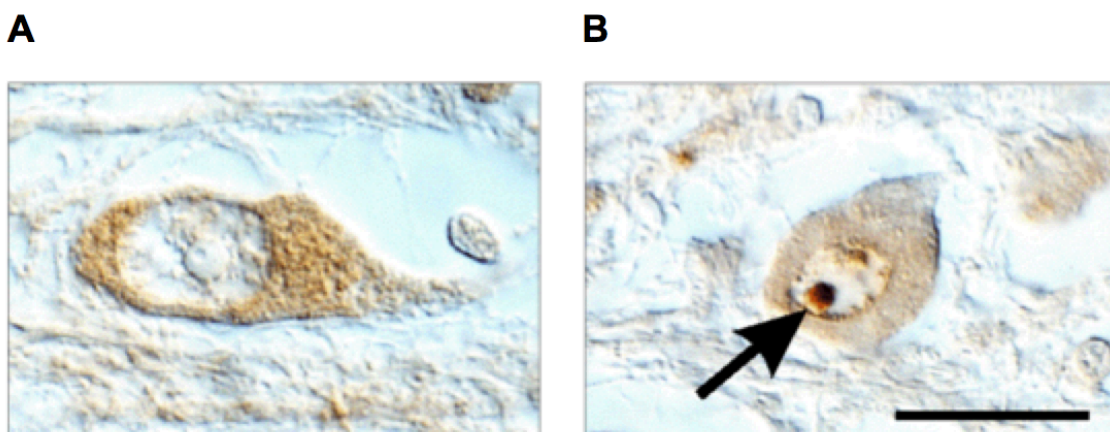
Weshalb sich die Aggregate vorwiegend im Zellkern bilden und nicht im Zytoplasma, ist nach wie vor Gegenstand der Forschung. Ein Erklärungsversuch könnte sein, dass während im Zytoplasma mehrere Proteindegradationssysteme (UPS, ERAD, Autophagie in Lysosomen) zur Verfügung stehen, im Zellkern Proteine nur über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut werden können. Dies könnte eine Ursache dafür sein, dass das mutierte Ataxin-3 im Zellkern nicht ausreichend degradiert wird, und es so vor allem im Zellkern zu mehr Aggregatbildung kommt (Ross und Poirier 2004, Iwata et al. 2005, Zhong und Pittman 2006, Bichelmeier et al. 2007, Iwata et al. 2009).

Darüber hinaus konnte auch bereits gezeigt werden, dass die Deubiquitinierungs-Aktivität von Ataxin-3 die Translokation von Ataxin-3 in den Nukleus fördert (Todi et al. 2007). Die Ubiquitinierung von Ataxin-3 an einem spezifischen Lysin-Rest reguliert hierbei die subzelluläre Lokalisierung von Ataxin-3 (Todi et al. 2010). Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch zellulärer Stress, der in der Zellkultur durch einen Hitzeschock ausgelöst werden kann, die Translokation des Ataxin-3 in den Nukleus fördert (Reina et al. 2010).

Posttranslational wird das Ataxin-3 modifiziert, indem es durch Caspasen und Calpaine gespalten (Matos et al. 2017), sowie phosphoryliert, ubiquitiniert und SUMOyliert (SUMO = *Small ubiquitin-related modifier*) wird (Silva et al. 2017, Carvalho et al. 2018). Diese Modifikationen scheinen auch eine Rolle in der Lokalisation und Funktion von Ataxin-3 in der Zelle zu spielen. Sie könnten außerdem erklären, weshalb nur Nervenzellen von SCA3 betroffen sind, obwohl Ataxin-3 ein ubiquitär exprimiertes Protein ist.

### 1.5.3 Intranukleäre Inklusionen und Transport des Ataxin-3 Proteins

Obwohl das Ataxin-3 vor allem im Zytoplasma wiederzufinden ist, werden Proteinaggregate vor allem im Zellkern beobachtet (Abb. 2). Diese Bildung von intranukleären Inklusionen ist klassisch für SCA3-Patienten, und lässt sich sowohl in betroffenen als auch in nicht betroffenen Gehirnregionen feststellen (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998). Die intranukleären Einschlusskörperchen enthalten normales und mutiertes Ataxin-3, Ubiquitin, einige Klassen der Chaperone wie die Hitzeschockproteine (Hsp) Hsp40 und Hsp70, Transkriptionsfaktoren, Proteasomen und andere Proteine, die polyQ-Krankheiten auslösen (Paulson et al. 1997b, Perez et al. 1998, Chai et al. 1999, Warrick et al. 1999, Uchiyama et al. 2001, Yamada et al. 2001, Hayashi et al. 2003, Kampinga und Bergink 2016).



**Abbildung 2: Gegenüberstellung der Immunhistochemie von Neuronen (hier aus dem Hirnstamm) von nicht an SCA3 erkrankten Probanden (A) vs. von SCA3-Patienten (B).** A) Das Ataxin-3 wird bei nicht an SCA3 erkrankten Probanden vorwiegend im Zytoplasma gefunden. B) In Neuronen von SCA3-Patienten werden

Aggregate aus mutiertem Ataxin-3 (Pfeil) im Zellkern beobachtet. Maßstabsbalken: 20 µm. (Nach Schmidt et al. 1998). (Die Lizenz für die Verwendung dieser Abbildung wurde bei *John Wiley and Sons* beantragt und ist unter folgendem Link einsehbar: <https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=b8727210-a717-4770-897f-c1a25288794b>. Hierbei wurden die originalen Abbildungen 7 und 8 aus der Publikation von Schmidt et al. (1998) (S. 675) dahingehend zu dieser Abbildung abgeändert, indem nur zwei ausgewählte Bilder der Immunhistochemie von Nervenzellen von gesunden und an SCA3 erkrankten Probanden nebeneinander gestellt wurden.)

In den intranukleären Einschlusskörperchen lässt sich vor allem der C-Terminus des Ataxin-3 finden, der den polyQ-Bereich enthält (Schmidt et al. 1998). Daraus kann geschlossen werden, dass das Ataxin-3 vor dem Transport in den Zellkern proteolytisch gespalten wird, sodass nur Proteinfragmente, die den polyQ-Bereich enthalten, in den Zellkern gelangen und dort die intranukleären Einschlusskörperchen bilden. Bei der SCA3 wurden bereits Calpaine und Caspasen als verantwortliche Enzyme identifiziert, wobei spezifische Schnittstellen innerhalb des Ataxin-3 Proteins entdeckt wurden (Hübener et al. 2013, Weber et al. 2017). Das Ataxin-3 enthält zwei Nukleäre Export Signale (NES) und ein Kernimportsignal (NLS), die für die Lokalisation des Proteins in der Zelle relevant sind (Antony et al. 2009, Macedo-Ribeiro et al. 2009). Demnach könnte eine mögliche Erklärung für die Aggregatbildung im Zellkern sein, dass die beiden NES am N-Terminus des Proteins abgespalten werden, die das Ataxin-3 normalerweise im Zytoplasma halten würden. So entsteht ein Proteinfragment ohne NES, mit noch enthaltenem polyQ-Bereich und NLS, das in den Zellkern gelangt und dort aggregiert (Schmidt et al. 2002, Antony et al. 2009). In diesem Zusammenhang wurde auch beobachtet, dass Fragmente mit einer gleich langen polyQ-Anzahl im Vergleich zu nicht fragmentierten Proteinen eine stärkere Neigung haben, größere Einschlüsse zu bilden (Wellington et al. 1998).

Zu der Frage, welche Rolle die intranukleären Inklusionen in der Pathogenese der SCA3 spielen, und ob sie die Ursache oder eine Folge der Neurodegeneration sind, gibt es zwei Hypothesen. Eine geht davon aus, dass die Aggregate einen schädlichen Effekt haben, da diese funktionelle Proteine sequestrieren (Todd et al. 2013). Eine andere Hypothese besagt hingegen, dass die Aggregate protektive Eigenschaften besitzen, indem das pathologisch

expandierte Ataxin-3 in diesen gebündelt wird. Da die intranukleären Einschlusskörperchen mit Antikörpern gegen Ubiquitin anfärbbar sind, kann dies als Zeichen dafür gesehen werden, dass proteolytische Abbauege wie der Ubiquitinierungsmechanismus mitbeteiligt sein müssen (Riess et al. 2001). Somit scheinen die intranukleären Einschlusskörperchen zu einem zellulären Abwehrmechanismus der Zelle zu gehören, der dazu dient, die toxischen Aggregate abzubauen, um sie so unschädlich zu machen. Die Toxizität beruht in diesem Ansatz nicht auf den Aggregaten selbst, sondern z. B. auf löslichen Oligomeren, die im Aggregationsprozess gebildet werden (Takahashi et al. 2010). Auch die „Hypothese der toxischen Fragmente“ kann zu dieser Position dazugezählt werden. Diese besagt, dass durch enzymatische Spaltung des krankheitsursächlichen Proteins Spaltprodukte entstehen, die toxischer als ihre Vorläuferproteine seien und eine erhöhte Aggregationsneigung aufweisen (Haacke et al. 2006). Beide Hypothesen teilen aber die Ansicht, dass es letzten Endes durch eine transkriptionelle, proteolytische und mitochondriale Dysregulation zu einer grundlegenden Störung der Zellhomöostase kommt (Sun et al. 2007). Diese negativen Auswirkungen bewirken letzten Endes eine Neurodegeneration und die Apoptose der Zelle (Paulson et al. 1997b, Schmidt et al. 1998, Weber et al. 2014). Durch das polyQ-expandierte Ataxin-3 kommt es somit zu einem toxischen *gain-of-function* Phänotypen (Harris et al. 2010, Evers et al. 2014).

Da die Aggregate vor allem im Zellkern wiederzufinden sind, führt diese Tatsache zu der Annahme, dass es spezifische Transportproteine geben muss, die das Ataxin-3 binden können. Der Transport von Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Nukleus geschieht über die Kernporen (englisch: *nuclear pore complex* (NPC)) (Fabre und Hurt 1997, Feldherr und Akin 1990). Dabei gelangen kleine Moleküle bis ca. 60 kDa durch nichtselektive Diffusion hindurch, wohingegen größere Moleküle auf aktive Transportmechanismen angewiesen sind (Davis 1995, Panté und Aebi 1996, Schwamborn et al. 1998). Es wird angenommen, dass das normale Ataxin-3, das ein Molekulargewicht von 42 kDa besitzt, durch passive Diffusion in den Zellkern gelangen kann,

während das expandierte Ataxin-3 aktiv transportiert werden muss (Wang et al. 2018b).

Für den aktiven Transport sind sogenannte Karyopherine zuständig, die zum NPC gehören und in Importine und Exportine aufgeteilt werden. Importine binden als Rezeptoren Substrate, die ein Kernimportsignal (*Nuclear localization signal* (NLS)) enthalten, während Exportine durch das Binden von Nukleären Export Signalen (NES) die Fracht aus dem Zellkern ins Zytoplasma befördern können (Görlich und Kutay 1999, Stoffler et al. 1999, Poon und Jans 2005, Kapinos et al. 2017). So scheint das zur Familie der Karyopherin- $\beta$  Proteine zählende Exportin 1, auch CRM1 (*Chromosomal region maintenance 1*) genannt, Auswirkungen auf die Lokalisation von Ataxin-3 zu haben (Fukuda et al. 1997, Bilen und Bonini 2007, Voßfeldt et al. 2012, Sowa et al. 2018). In einem *Drosophila* SCA3-Modell führte die Überexpression von CRM1 zu einer geringeren Toxizität (Sowa et al. 2018). Für den Transport des Ataxin-3 Proteins vom Zytoplasma in den Zellkern hinein scheint das Importin Karyopherin  $\alpha$ -3 (KPNA3) mitverantwortlich zu sein (Sowa et al. 2018).

### **1.6 Das Transportprotein Karyopherin $\alpha$ -3 (KPNA3)**

Das Karyopherin  $\alpha$ -3 (KPNA3), auch Importin *subunit*  $\alpha$ -4 genannt, gehört zu der Importin- $\alpha$ -Familie. Das *KPNA3* Gen liegt auf dem Chromosom 13q14.3 (Takeda et al. 1997; Gen-ID: 3839, NCBI). KPNA3 erkennt das zu importierende Protein an einem NLS, bindet an das Protein und bildet so einen Komplex (Nachury und Weis 1998). Das Protein Karyopherin  $\beta$ -1 (KPNB1), auch als Importin *subunit*  $\beta$ -1 bekannt, kann entweder an diesen Komplex binden, oder es bindet direkt an das NLS des Proteins, indem es mit dem KPNA3 um die Bindestelle konkurriert (Lott und Cingolani 2011, Zhu et al. 2018). Das KPNB1 dockt an die Kernhülle an, woraufhin der Komplex aus KPNB1, KPNA3 und zu importierendem Protein durch die Kernpore hindurch in den Zellkern gelangt. An der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore bindet das im Zellkern in hohen Konzentrationen vorhandene GTP-gebundene Protein Ran („RanGTP“) an das KPNB1, wodurch es zu einer Dissoziation der

Untereinheiten des Komplexes kommt. Das Passagierprotein steht nun im Zellkern zur Verfügung, während das KPNB1 durch die Bindung des RanGTP und das KPNA3 durch die Bindung des RanGTP und des Exportins CAS wieder auf die zytoplasmatische Seite der Kernpore befördert werden. Hier kommt es dann durch GTP-Hydrolyse zur Ablösung des Ran von KPNB1 und KPNA3, wodurch das KPNB1 und das KPNA3 wieder für weitere Kerntransporte zur Verfügung stehen (Pemberton und Paschal 2005). Die Richtung des Proteintransportes wird somit durch das Gleichgewicht von GDP-gebundenem Ran im Zytoplasma und GTP-gebundenem Ran im Zellkern aufrechterhalten (Görllich und Kutay 1999).

Das KPNA3 spielt eine wichtige Rolle in zahlreichen Erkrankungen. So wurden Einzelnukleotidpolymorphismen (SNPs) im *KPNA3* Gen bereits mit psychiatrischen Erkrankungen wie der Schizophrenie, Depression, bipolaren Störung und der Opiat- und Alkoholabhängigkeit in Verbindung gebracht (Camp et al. 2001, Badner und Gershon 2002, Wei und Hemmings 2005, Zhang et al. 2006, Morris et al. 2012). Außerdem wurde bereits eine Herunterregulierung von *KPNA3* in Lymphozyten im Rahmen der B-Zell Chronisch Lymphatischen Leukämie (B-CLL) beschrieben (Mertens et al. 2002). Laut weiteren Studien könnte KPNA3 auch an der Pathogenese der Amyotrophen Lateralsklerose, der SCA6 und des Kolorektalen Karzinoms beteiligt sein (Tsou et al. 2015, Khosravi et al. 2017, Liu et al. 2018).

Auch in der SCA3 scheint das KPNA3 von Bedeutung zu sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Transportkomplex von KPNA3 und KPNB1 unter bestimmten Bedingungen beeinflusst wird. Transportproteine wie das KPNA3 sind besonders anfällig für reaktive Sauerstoffspezies und Radikale, die im Rahmen von Entzündungsreaktionen gebildet werden. Auch bei der SCA3 sind Entzündungsreaktionen zu verzeichnen, die zur Aktivierung von Entzündungsmediatoren führen und so zur Neurodegeneration beitragen (Evert et al. 2001, Evert et al. 2003). Aufgrund der Anfälligkeit der Transportproteine für diese Prozesse wurde bereits beobachtet, dass die KPNA Spiegel bei steigendem oxidativem Stress sinken (Kodiha et al. 2004, Kodiha et al. 2008).

Die Veränderungen im Rahmen einer Neurodegeneration könnten somit auch einen Einfluss auf den Transportkomplex haben.

Zuletzt konnte gezeigt werden, dass das KPNA3 in der Translokation sowohl des ungeschnittenen und expandierten als auch des fragmentierten Ataxin-3 in den Zellkern eine wichtige Rolle spielt (Sowa et al. 2018). Es ist noch nicht bekannt, ob der NLS im Ataxin-3 Protein ausreicht, damit das KPNA3 binden kann, oder ob es noch eine bisher nicht identifizierte Bindungsstelle gibt. Möglicherweise könnte auch der polyQ-Trakt gebunden werden. In *Drosophila*- und Mausmodellen von SCA3, in denen eine Herunterregulierung des *KPNA3* *in vivo* vorgenommen wurde, konnte ein positiver Effekt auf die Krankheitsprogression gezeigt werden. Es wurde beobachtet, dass ein *Knockdown* des *KPNA3* Gens zu einer verminderten Aggregationsbildung des expandierten Ataxin-3 im Zellkern führte, und dass sich das Ataxin-3 wieder primär im Zytoplasma wiederfinden ließ (Sowa et al. 2018). Analoge Beobachtungen wurden auch im Rahmen der SCA6 gemacht, indem die Mutation von *KPNA3* in einem *Drosophila*-Modell zu einer verminderten nukleären Lokalisation und Toxizität von  $\alpha$ 1ACT(Q70) führte, das das für die SCA6 verantwortliche Protein darstellt (Tsou et al. 2015). Darüber hinaus kam es bei dem *Knockdown* des *KPNA3* Gens in einem SCA3-Mausmodell zu einer allgemeinen Reduktion von Ataxin-3, die möglicherweise durch einen erhöhten proteolytischen Abbau des Proteins im Zytoplasma zu erklären ist (Sowa et al. 2018). Außerdem wurden in diesem Modell molekulare Störungen sowie Verhaltensstörungen durch eine Herunterregulierung von *KPNA3* verbessert. So konnten einer Hyperaktivität als Zeichen neuronaler Dysfunktion (Boy et al. 2009), einer erhöhten Ängstlichkeit (Bailey und Crawley 2009, Boy et al. 2010) und Störungen im Gangbild der SCA3-Mäuse entgegengewirkt werden. Hinzu kommt, dass das *Knockout* ohne weitere schwere Konsequenzen möglich war. Somit konnte die Neurodegeneration durch eine Hemmung des *KPNA3* verhindert und der SCA3 Phänotyp abgemildert werden (Sowa et al. 2018). Da die Lokalisierung des Ataxin-3 in der Zelle eine direkte Wirkung auf die Manifestation der Erkrankung hat, benannten Sowa et al. das Transportprotein KPNA3 als vielversprechenden Ansatzpunkt für eine gerichtete Therapie der SCA3.

## **1.7 Therapie der SCA3**

### **1.7.1 Supportive Therapie**

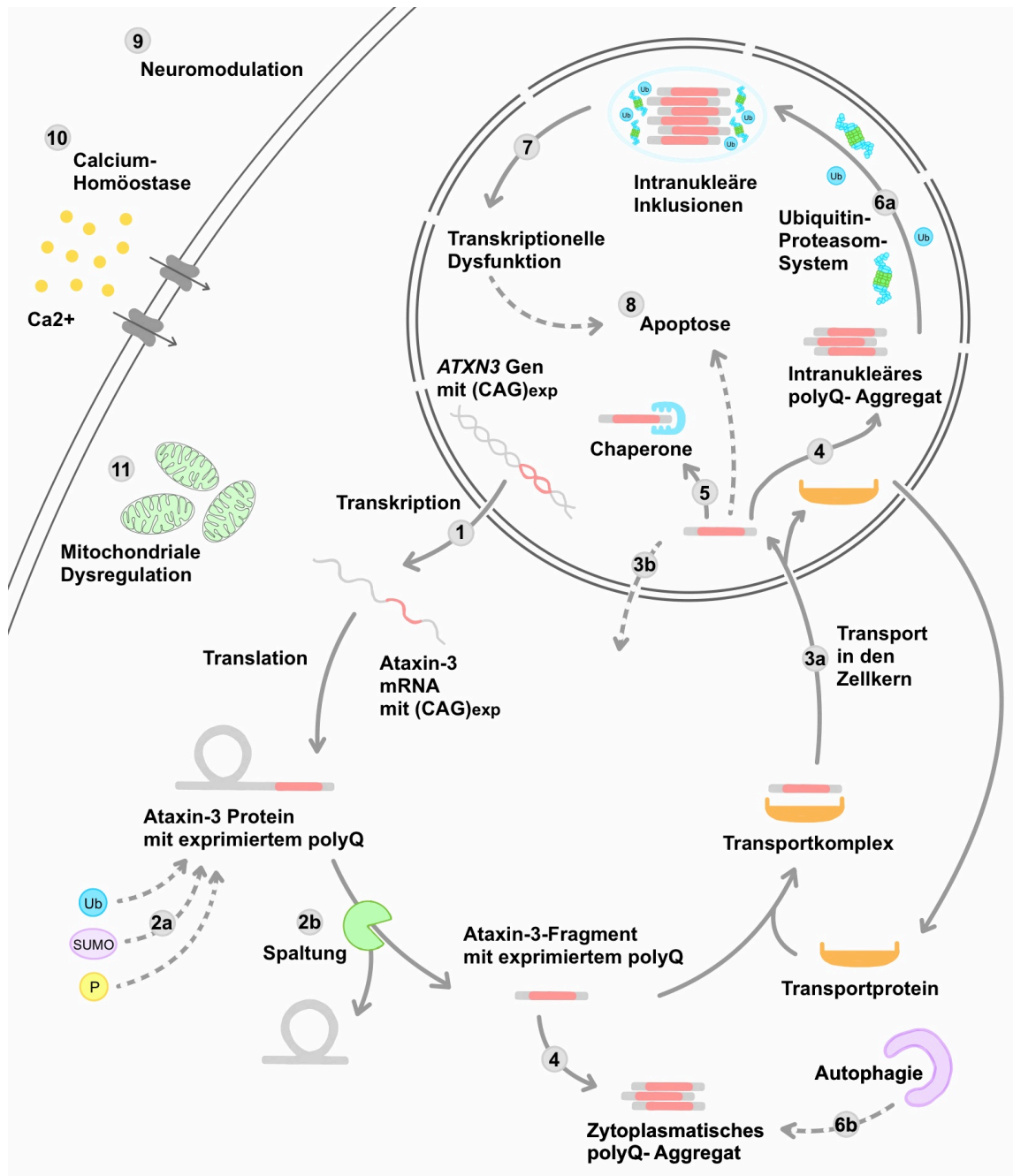
Der klaren monogenetischen Ursache für SCA3, die bereits vor 20 Jahren entdeckt wurde, stehen die komplexen pathogenen molekularen Mechanismen gegenüber, die nach wie vor noch nicht vollständig erforscht sind. Bisher gibt es keine kausale Therapiemöglichkeit für SCA3-Patienten, sodass der Fokus bei der Gabe von Medikamenten auf der symptomatischen Therapie liegt. Hierbei kommen unterschiedliche Substanzen zum Einsatz. So können extrapyramidale Syndrome, die einem Parkinsonismus ähneln, durch einen Eingriff in das Dopamin-System in Form von Levodopa oder Dopaminagonisten verbessert werden (Tuite et al. 1995, Buhmann et al. 2003, Nandagopal und Moorthy 2004). Choreatische Symptome werden hingegen mit Tetrabenazin oder Neuroleptika behandelt, während bei Dystonien Anticholinergika wie Biperiden verabreicht werden (Klockgether et al. 2019). Auch Botulinum-Toxin kann fokal gegen Dystonie und Spastik intramuskulär appliziert werden (Freeman und Wszolek 2005). Ansonsten kommen bei Spastik Muskelrelaxantien wie Baclofen, Eperison oder Tizanidin zum Einsatz (Klockgether et al. 2019). Außerdem sollte die Behandlung von komorbiden Depressionen mit Selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRIs) nicht außer Acht gelassen werden (Klockgether et al. 2019). Nicht nur eine medikamentöse Therapie verbessert die Symptomatik von Patienten. Körperliche Aktivität, Physiotherapie und ein intensives Koordinationstraining stellen wichtige therapeutische Mittel dar, die unbedingt in die Behandlung von SCA3-Patienten integriert werden sollten (Schöls et al. 2004, Riess et al. 2008, D'Abreu et al. 2010, Klockgether et al. 2019). Im Falle von Dysarthrie und Dysphagie ist eine logopädische Behandlung sehr zu empfehlen, da so zum einen die Kommunikationsfähigkeit verbessert wird, zum anderen aber auch die Gefahr von Pneumonien durch Aspiration herabgesetzt werden kann (Schöls et al. 2004, Riess et al. 2008).

### 1.7.2 Therapeutische Ansätze

Um zielgerichtete, kausale Therapieoptionen in Zukunft anbieten zu können, wird im Rahmen von Forschungsprojekten der molekulare Pathomechanismus, der der SCA3 zu Grunde liegt, immer weiter entschlüsselt. Unterschiedliche neuroprotektive Strategien wurden entwickelt, die sich von Gen-Therapien über Zell-Therapien bis hin zu pharmakologischen Ansätzen erstrecken.

So wird beispielsweise versucht eine Transkriptionshemmung des *ATXN3* Gens mit dem expandierten *CAG-Repeat* durch *Silencing* der mutierten Ataxin-3 RNA zu erreichen (Maciel et al. 2001, Alves et al. 2008, Torashima et al. 2008, Nobrega et al. 2013a, Nobrega et al. 2014, Conceicao et al. 2016, Carmona et al. 2017, Moore et al. 2017) (Abb. 3; 1). Des Weiteren wird in posttranslationale Modifikationen von expandiertem Ataxin-3 eingegriffen, wie der posttranslationalen Ubiquitinierung, SUMOylierung und Phosphorylierung (Matsumoto et al. 2004, Jana et al. 2005, Tao et al. 2008, Mueller et al. 2009) (Abb. 3; 2a) oder der posttranslationalen Spaltung von expandiertem Ataxin-3 (Haacke et al. 2007, Simoes et al. 2012, Simoes et al. 2014, Watchon et al. 2017) (Abb. 3; 2b). Auch der Transport des expandierten Ataxin-3 in den Zellkern stellt eine mögliche Therapieoption dar, indem der Transport entweder verhindert wird (Wang et al. 2018b, Wang et al. 2019) (Abb. 3; 3a), oder das sich im Zellkern befindende expandierte Ataxin-3 wieder ausgeschleust wird (Riess et al. 2001) (Abb. 3; 3b). Weitere Eingriffe sind die Verhinderung der Aggregationsbildung des expandierten Ataxin-3 Proteins (Furusho et al. 2005, Bonanomi et al. 2014, Chen CM et al. 2014) (Abb. 3; 4) und die Beeinflussung von Chaperonen, die eine zentrale Rolle in der neuronalen Homöostase spielen, indem sie die Faltung und Konformation anderer Proteine unterstützen und aufrechterhalten (Cummings et al. 1998, Chai et al. 1999, Zijlstra et al. 2010, Kakkar et al. 2016) (Abb. 3; 5). Eine Steigerung der Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Matsumoto et al. 2004, Jana et al. 2005, Wang et al. 2007, Williams et al. 2009, Wang et al. 2013, Sutton et al. 2017) (Abb. 3; 6a) wird ebenfalls versucht wie die Stimulation der Autophagie (Menzies et al. 2010, Nascimento-Ferreira et al. 2011, Nascimento-Ferreira et al. 2013, Nobrega et al. 2013b) (Abb. 3; 6b).

Auch die beobachtete transkriptionelle Dysregulation wird angegangen (Li et al. 2007, Chou et al. 2011, Yi et al. 2013, Chou et al. 2014, Lin XP et al. 2014, Cunha-Santos et al. 2016, Lei et al. 2016) (Abb. 3; 7). Eine weitere Therapieoption könnte die Hemmung des apoptotischen Zelltods sein, der den Endpunkt der zellulären Dysregulationen darstellt (Riess et al. 2001) (Abb. 3; 8).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der therapeutischen Ansätze bei der Behandlung der SCA3. 1) Transkriptionshemmung des ATXN3 Gens mit dem expandierten CAG-Repeat ((CAG)<sub>exp</sub>) durch Silencing der mutierten Ataxin-3 RNA. 2a)**

Eingriff in die posttranslationale Ubiquitinierung, SUMOylierung und Phosphorylierung des Ataxin-3 Proteins mit exprimiertem Polyglutamin (polyQ)- Bereich. **2b)** Eingriff in die posttranslationale Spaltung von expandiertem Ataxin-3. **3a)** Verhinderung des Transports des expandierten Ataxin-3 in den Zellkern. **3b)** Ausschleusung des sich im Zellkern befindenden expandierten Ataxin-3. **4)** Verhinderung der Aggregationsbildung. **5)** Beeinflussung von Chaperonen. **6a)** Eingriff in das Ubiquitin-Proteasom-System. **6b)** Stimulation der Autophagie. **7)** Verhinderung der transkriptionellen Dysregulation. **8)** Hemmung der Apoptose. **9)** Neuromodulation. **10)** Verbesserung der Calcium-homöostase. **11)** Verhinderung der mitochondrialen Dysregulation. (Basierend auf Riess et al. 2001 und Wang 2018a).

Ebenfalls die Neuromodulation wurde bereits näher angeschaut (Duarte-Neves et al. 2015, Duarte-Neves et al. 2016) (Abb. 3; 9), da bereits entdeckt wurde, dass das serotonerge System (Takei et al. 2002, Takei et al. 2004, Takei et al. 2010, Teixeira-Castro et al. 2015, Do Carmo Costa et al. 2016) und das adenosinerge System mit der SCA3 Pathologie assoziiert zu sein scheinen (Goncalves et al. 2013, Chou et al. 2015, Goncalves et al 2017). Interessant ist auch der Ansatz einer zellulären Therapie, bei dem neuronale Stammzellen transplantiert werden (Taupin 2006, Mendonca et al. 2015). Ein weiterer Therapieansatz beschäftigt sich mit einer Verbesserung der Calcium-homöostase (Chen et al. 2008, Shakkottai et al. 2011, Egorova et al. 2015) (Abb. 3; 10). Hierunter fällt auch der medikamentöse Behandlungsversuch von SCA3-Patienten mit dem Wirkstoff Riluzol, der die präsynaptische Glutamat-Ausschüttung inhibiert und Calcium-abhängige Kalium Kanäle aktiviert (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH). Allerdings zeigte Riluzol in diversen Studien widersprüchliche Ergebnisse (Romano et al. 2015, Schmidt et al. 2016), sodass darauf verwiesen wurde, Riluzol bei SCA3-Patienten nur mit Bedacht einzusetzen (Schmidt et al. 2016). Laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie sei der Einsatz von Riluzol in einer Dosierung von 2 mal 50 mg pro Tag „vertretbar“ (Klockgether et al. 2018). Darüber hinaus wird für die Behandlung der SCA3 auch versucht, die mitochondriale Dysregulation zu verhindern (Weber et al. 2014, Duarte-Silva et al. 2018) (Abb. 3; 11).

Der therapeutische Ansatz, der die Grundidee dieser Arbeit bildet, ist die Unterbindung des Imports von expandiertem Ataxin-3 in den Zellkern (Abb. 3;

3a). In zahlreichen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass der Phänotyp von transgenen SCA3 Mäusen deutlich stärker ausgeprägt ist, wenn sich das expandierte Ataxin-3 im Nukleus befindet (Bichelmeier et al. 2007). Hierbei wurde als Transportprotein von expandiertem Ataxin-3 in den Zellkern das bereits vorgestellte Importin KPNA3 identifiziert (Sowa et al. 2018, s. 1.6). Bisher sind in der Literatur allerdings noch kaum Wirkstoffe bekannt, die in diesen Mechanismus eingreifen können. Zuletzt konnte die Behandlung mit dem Histon-Deacetylase Inhibitor (HDACi) Divalproex Natrium eine Wirkung auf die Ataxin-3 Translokation in *in vitro* SCA3-Zellmodellen erzielen (Wang et al. 2018b, Wang et al. 2019). Aufgrund dieser Zusammenhänge gelangte die genauere Betrachtung der Aktivität des *KPNA3* Promotors sowie seine pharmakologische Beeinflussung in den Fokus dieser Arbeit.

### **1.8. Fragestellung dieser Arbeit**

Die Spinocerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3) ist die häufigste autosomal-dominant vererbte Ataxie weltweit. Der Erkrankung liegt eine monogenetische Krankheitsursache zugrunde, indem es in der kodierenden Region des *ATXN3* Gens zu einer Expansion eines CAG-Tripletts kommt. Dies führt wiederum im Ataxin-3 Protein zu einem verlängerten polyQ-Bereich, der die Aggregationsbildung von mutiertem Ataxin-3 fördert (Takiyama et al. 1993, Kawaguchi et al. 1994). Aggregate aus polyQ-expandiertem Ataxin-3 bilden ein zentrales Merkmal in der Pathogenese der SCA3, wobei die pathologischen Ataxin-3 Aggregate in Form von intranukleären Inklusionen vor allem im Nukleus nachgewiesen werden, und dort toxischer wirken als im Zytoplasma (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998, Bichelmeier et al. 2007). Hierbei wurde in einer vorherigen Studie das Importin KPNA3 als Transportprotein von Ataxin-3 identifiziert, das an der nukleären Translokation von Ataxin-3 beteiligt sein soll (Sowa et al. 2018).

Aufgrund dieser neuen Beobachtung ist die Betrachtung des *KPNA3* Promotors als wichtiger Bestandteil für die Expression des *KPNA3* Gens sowohl von Interesse als auch von Relevanz. Ein Promotor ist ein Bereich auf der DNA, an dem die RNA-Polymerase mithilfe zahlreicher Transkriptionsfaktoren bindet, um

die Transkription des nachgeschalteten Gens einzuleiten (Schaaf und Zschocke 2013). Durch die molekulare Analyse eines Promotors kann man damit Aussagen über die Aktivität und Transkription des zugehörigen Gens treffen.

In diesem Zusammenhang soll im Rahmen dieser Arbeit ein Luciferase Assay als Reportergen Assay etabliert werden, mit dessen Hilfe man die *KPNA3* Promotoraktivität zuverlässig messen und quantifizieren kann. Hierfür wird ein Konstrukt mit einem Bereich der Promotorregion des *KPNA3* Gens eingesetzt, das in vorherigen Arbeiten bereits kloniert wurde (Wanner 2021). Vorstudien konnten außerdem zeigen, dass ein Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) innerhalb des *KPNA3* Promotors mit der Identifikationsnummer SNP rs11618521 (Sherry et al. 2001: dbSNP Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; Stand: 22.04.2020) einen signifikanten Zusammenhang mit dem Erkrankungsalter (AAO) aufweist (Dieterle 2019), und dass dieser SNP einen Einfluss auf die *KPNA3* Promotoraktivität ausübt (Wanner 2021). Diese Beobachtung soll im Rahmen dieser Arbeit nochmals verifiziert werden.

Auch aus therapeutischer Sicht ist das *KPNA3* interessant, da es bisher keine kausale Therapie für die SCA3 gibt, und die Beeinflussung der Ataxin-3 Translokation einen möglichen Angriffspunkt in die zellulären, pathogenen Mechanismen der SCA3 darstellt (s. 1.7.2). So könnte eine mögliche Herunterregulierung des *KPNA3* Gens zu verminderten *KPNA3* Proteinspiegeln führen, wodurch wiederum die Bildung von intranukleären Einschlusskörperchen durch die verminderte Translokation von Ataxin-3 reduziert werden könnte. Durch das vermehrt zytoplasmatisch vorliegende Ataxin-3 könnten somit möglicherweise sowohl ein späterer AAO als auch eine Linderung der Symptome der SCA3-Patienten erreicht werden. Durch die Etablierung und Validierung eines Luciferase Assays, das die *KPNA3* Promotoraktivität zuverlässig misst, soll somit im Rahmen dieser Arbeit auch ein molekularbiologisches *in vitro* Screening-System zur Verfügung stehen, um ein Medikamenten-Screening durchführen zu können. Hierbei soll die Wirkung elf unterschiedlicher, vielversprechender Wirkstoffe auf den *KPNA3* Promotor beurteilt werden, die in vorherigen Analysen von Dr. Zijian Wang eine Auswirkung auf die Translokation von Ataxin-3 zeigten (Wang 2015). Um möglichst viele Proben parallel messen

zu können, soll im Rahmen der Etablierung des Luciferase Assays die Versuchsdurchführung von einer 96-Well-Platte in eine 384-Well-Platte überführt werden. Durch die so ermöglichte Messung einer großen Bandbreite an Konzentrationen sollen Dosis-Wirkungs-Kurven generiert werden, mit deren Hilfe die therapeutische Beeinflussung der *KPNA3* Promotoraktivität beurteilt werden soll.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Materialien**

Bei den in dieser Arbeit aufgelisteten Eigennamen wurde auf eine gesonderte Kennzeichnung von registrierten Markennamen verzichtet.

#### **2.1.1 Kits und Reagentien**

**Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Kits und Reagentien.** Angegeben sind die Verwendung, die Marke und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Kits bzw. Reagentien.

<b>Kit oder Reagenz</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Marke</b>	<b>Kat. Nr.</b>
<b>Molekularbiologie</b>			
<i>Genome Lab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit</i>	Sequenzierung	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)	608120
<i>QIAquick Spin Miniprep Kit</i>	Plasmid-DNA Isolation	QIAGEN GmbH (Hilden, D)	27106
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	Extraktion von DNA	QIAGEN GmbH (Hilden, D)	28706
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	Aufreinigung von DNA	QIAGEN GmbH (Hilden, D)	28106
<b>Zellkultur</b>			
<i>Attractene Transfection Reagent</i>	Zelltransfektion	QIAGEN GmbH (Hilden, D)	301005
<b>Luciferase Assay</b>			
<i>Dual-Glo Luciferase Assay System</i>	Luciferase Assay	Promega GmbH (Walldorf, D)	E2920
<b>Proteinbiochemie</b>			
<i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free</i>	Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics D GmbH (Mannheim, D)	1187358001
<i>Bio-Rad Protein Assay Kit II</i>	Bradford-Assay	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, D)	5000002

## 2.1.2 Puffer

**Tabelle 4: Verwendete Puffer unter Angabe ihrer Zusammensetzung und ihrer Einsatzbereiche.** v/v: *volume per volume*/ Volumen pro Volumen. w/v: *weight per volume*/ Gewicht pro Volumen.

Puffer	Zusammensetzung	Verwendung
3,5X Bis-Tris Puffer	1,25 M Bis-Tris, pH 6,8	SDS-Page
EB ( <i>Elution Buffer</i> )	10 mM Tris-HCl, pH 8	Elution von Plasmid-DNA
20X MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	1 M MOPS, 1 M Tris-HCl, 2 % (w/v) SDS, 20 mM EDTA, pH 7,7	SDS-Page, Herstellung chemisch kompetenter Zellen
RIPA- Puffer ( <i>Radioimmuno-precipitation assay</i> )	50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X-100 0,1 % (w/v) Natriumdodecylsulfat, 0,5 % (w/v) Natriumdeoxycholat  + <i>cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free</i> (Roche Diagnostics D GmbH)	Zellyse
<i>Stripping</i> Puffer	0,2 % (w/v) Glycin (25 mM), 1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) Tween 20, pH 2	Western-Blot
50X TAE (Tris-Acetat-EDTA)	2 M Tris, 0,05 M EDTA, 1 M Essigsäure, pH 8,3	Präparative Gele für Agarosegelelektrophorese
10X TBE (Tris-Borat-EDTA)	0,89 M Tris, 0,02 M EDTA, 0,89 M Borsäure, pH 8,3	Analytische Gele für Agarosegelelektrophorese
10X TBS ( <i>Tris-buffered Saline</i> )	0,2 M Tris, 1,5 M NaCl, pH 7,6	Western-Blot
TBST ( <i>Tris-buffered</i> )	1X TBS, 0,1 % (v/v) Tween 20,	Western-Blot

Saline-Tween 20)	pH 7,5		
TE (Tris EDTA)	10 mM 1mM pH 8	Tris-HCl, EDTA,	Elution von Plasmid-DNA, Western-Blot
20X Transferpuffer	0,5 M 0,5 M 0,02 M 15 % pH 7,2	Bicin, Bis-Tris, EDTA, Methanol,	Western-Blot
Tfb1 (Transformation buffer 1)	100 mM 50 mM 30 mM 10 mM 12 % (v/v) pH 5,8	RbCl, MnCl <sub>2</sub> , Kaliumacetat, CaCl <sub>2</sub> , Glycerin,	Herstellung chemisch kompetenter Zellen
Tfb2 (Transformation buffer 2)	10 mM 10 mM 75 mM 12 % (v/v) pH 6,8	MOPS, RbCl, CaCl <sub>2</sub> , Glycerin,	Herstellung chemisch kompetenter Zellen

### 2.1.3 Molekularbiologische Materialien

#### 2.1.3.1 Plasmide

**Tabelle 5: Verwendete Plasmide.** Angegeben sind die in den Konstrukten enthaltenen Promotoren (*Cytomegalievirus (CMV)*, *Karyopherin- $\alpha$ -3 (KPNA3)*, *Ataxin-3 (ATXN3)*) und Reportergene (*Renilla-Luciferase (R-Luc)* oder *Firefly-Luciferase (F-Luc)*). Alle verwendeten Plasmide sind resistent gegenüber Ampicillin (Amp). Außerdem finden sich Angaben zur Länge der Plasmide in Basenpaaren (bp) sowie der jeweilige Anbieter mit Katalognummer (Kat. Nr.) bzw. die Person, die die jeweiligen Konstrukte kloniert hat.

Plasmid	Promotor	Reporter-gen	Resistenz	Länge in bp	Anbieter (Kat. Nr.)
<b>Kontrollvektor</b>					
pRL-CMV	CMV	R-Luc	Amp	4079	Promega GmbH (Walldorf, D) (E2261)
<b>Leervektor</b>					
pGL3-Basic	-	F-Luc	Amp	4818	Promega GmbH

					(Walldorf, D) (E1751)
<b>Konstrukte mit einem Fragment des <i>KPNA3</i> Promotors</b>					
pGL3- KPNA3-A	<i>KPNA3</i>	<i>F-Luc</i>	Amp	7209	Manuel Wanner
pGL3- KPNA3-G	<i>KPNA3</i>	<i>F-Luc</i>	Amp	7209	Manuel Wanner
pGL3- KPNA3-G- PEST	<i>KPNA3</i>	<i>F-Luc</i>	Amp	7339	Carolina Schröder
<b>Konstrukte mit einem Fragment des <i>ATXN3</i> Promotors</b>					
pLUC- ATXN3/Ca	<i>ATXN3</i>	<i>F-Luc</i>	Amp	5792	Laura Dengler
pLUC- ATXN3/Ca- PEST	<i>ATXN3</i>	<i>F-Luc</i>	Amp	5889	Carolina Schröder

### 2.1.3.2 Chemikalien in der Molekularbiologie

**Tabelle 6: Verwendete Chemikalien in der Molekularbiologie.** Angegeben sind die Verwendung, die Marke und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Chemikalien.

<b>Chemikalie</b>	<b>Verwendung</b>	<b>Marke</b>	<b>Kat. Nr.</b>
<i>Calf-Intestinal-Phosphatase</i> (CIP, 1000 U/ml)	Dephosphorylierung von Vektoren	<i>New England BioLabs</i> GmbH (Frankfurt am Main, D)	M0290S
dNTP (PCR <i>Nucleotide Mix</i> , dATP, dCTP, dTTP, dGTP, je 10 mM)	PCR	Roche Diagnostics D GmbH (Mannheim, D)	11581295 001
peqGOLD <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PCR	PEQLAB Biotechnologie GmbH (VWR GmbH; Darmstadt, D)	01-5010

## 2.1.4 Mikrobiologische Materialien

### 2.1.4.1 Chemisch kompetente Zellen

Tabelle 7: Verwendete chemisch kompetente Zellen.

Name	Stamm (mit Genotyp)
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> )	DH5 $\alpha$ (F <sup>-</sup> $\phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> )U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ) <i>phoA supE44 <math>\lambda</math><sup>-</sup>thi-1 gyrA96 relA1</i> )

### 2.1.4.2 Chemikalien in der Mikrobiologie

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien in der Mikrobiologie. Angegeben sind die Verwendung, die Marke bzw. Zusammensetzung und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Chemikalien.

Chemikalie	Verwendung	Marke bzw. Zusammensetzung	Kat. Nr.
Ampicillin	Selektion ampicillinresistenter Bakterien	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	A9518
Bacto Agar	Herstellung von Agarplatten	BD Difco; Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	214030
LB-Medium ( <i>Lysogeny Broth</i> )	Nährmedium für Bakterienwachstum im Rahmen der Plasmid-DNA Amplifikation, Herstellung von Agarplatten	Miller, BD Difco, Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	257269
SOB-Medium ( <i>Super optimised broth</i> )	Transformation	2 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 8,56 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM MgSO <sub>4</sub> , pH 7	

## 2.1.5 Zellbiologische Materialien

### 2.1.5.1 Zellen in der Zellkultur

**Tabelle 9: Verwendete Zelllinie.** HEK-293T: *Human Embryonic Kidney 293T*. Angegeben ist die Anzahl an Subkultivierungen (Passage), in der sich die eingesetzten Zellen befanden.

Name der Zelllinie	Beschreibung	Passage
HEK-293T (ATCC CRL-3216)	Wildtyp	80-220

### 2.1.5.2 Chemikalien in der Zellbiologie

**Tabelle 10: Verwendete Chemikalien in der Molekularbiologie.** Angegeben sind die Verwendung, die Marke und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Chemikalien.

Chemikalie	Verwendung	Marke	Kat. Nr.
A/A ( <i>Antibiotic-Antimycotic</i> )	Zugabe zu DMEM, enthält Penicillin/ Streptomycin/ Amphotericin B	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	15240-062
1X DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ) + 4,5 g/L D-Glucose, L-Glutamine	Nährstoff-Medium für die Zellen	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	41965-039
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Herstellung eines Zellstocks, Medikamenten-Verdünnung	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	D2438
DPBS ( <i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> )	Waschen der Zellen	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	14190-144
FBS ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )	Zugabe zu DMEM	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	16000-036
1X Opti-MEM I ( <i>Reduced Serum Medium</i> )	Transfektionsansatz	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	31985-047
Trypsin-EDTA (0,25%)	Protease: Ablösung der Zellen	gibco (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)	25200-056

### 2.1.6 FDA-Medikamentenbibliothek

**Tabelle 11: Wirkstoffe, die im Rahmen des Medikamenten-Screenings getestet wurden.** Alle Wirkstoffe wurden bereits von der *Food and Drug Administration* (FDA; Silver Spring, Maryland, USA) zugelassen. Angegeben sind die molare Masse in g/mol, die Marke und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Wirkstoffe.

Wirkstoff	Molare Masse in g/ mol	Marke	Kat. Nr.
Divalproex Natrium	310,4	Selleck Chemical (München, D)	S1703
Natriumbutyrat	110,1	Selleck Chemical (München, D)	S1999
Sorafenib Tosylate	464,8	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)	475207-59-1
Benserazid Hydrochlorid (HCl)	293,7	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)	14919-77-8
Artemether	298,4	TCI (Eschborn, D)	A2190
Clotrimazol	344,8	Selleck Chemical (München, D)	S1606
Bleomycinsulfat	1512,6	Selleck Chemical (München, D)	S1214
Furosemid	330,7	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	F4381
Zolmitriptan	287,4	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	SML0248
Rizatriptan-benzoat	391,5	Selleck Chemical (München, D)	S1607
Disulfiram	296,5	Selleck Chemical (München, D)	S1680

### 2.1.7 Proteinbiochemische Materialien

#### 2.1.7.1 Antikörper

**Tabelle 12: Primäre Antikörper (AK).** Angegeben sind die Spezifität der AK und das jeweilige Molekulargewicht des Zielproteins, die Ursprungsquelle, die Verdünnung des AKs bei Verwendung im Rahmen eines Western-Blots, das Unternehmen und die Katalognummer (Kat. Nr.) des jeweiligen AKs.

Primärer AK	Spezifität (Molekulargewicht)	Quelle	Verdünnung	Unternehmen	Kat. Nr.
Anti-Luciferase	Firefly-Luciferase ( <i>Photinus pyralis</i> ) (61 kDa)	Kaninchen	1:2000	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	L0159

GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (~ 37 kDa)	Maus	1:2500	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)	sc-47724
$\alpha$ -Tubulin	$\alpha$ -Tubulin (~ 50-55 kDa)	Maus	1:5000	Calbiochem (Merck; Darmstadt, D)	CP06
$\beta$ -Aktin	$\beta$ -Aktin (~ 42 kDa)	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich (Darmstadt, D)	A5441

**Tabelle 13: Sekundäre Antikörper (AK).** Angegeben sind die Konjugation, die Ursprungsquelle, die Verdünnung des AK bei Verwendung im Rahmen eines Western-Blots, das Unternehmen und die Katalognummer (Kat. Nr.) des jeweiligen AKs.

Sekundärer AK	Konjugation	Quelle	Verdünnung	Unternehmen	Kat. Nr.
Anti-Kaninchen IgG	IRDye 800CW	Ziege	1:10000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad, Homburg, D)	926-32211
Anti-Maus IgG	IRDye 680LT	Ziege	1:10000	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad, Homburg, D)	926-68020

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 14: Verwendete Verbrauchsmaterialien; gegliedert nach ihren Einsatzschwerpunkten.** Angegeben sind die Verwendung, die Marke und die Katalognummer (Kat. Nr.) der einzelnen Verbrauchsmaterialien.

Material	Verwendung	Marke	Kat. Nr.
<b>Allgemeine Utensilien</b>			
Ampuwa: steriles H <sub>2</sub> O (dH <sub>2</sub> O)	Zahlreiche Anwendungen	Fresenius Kabi D GmbH (Bad Homburg, D)	06178414
PARAFILM M	Luftdichte Abdichtung von Gefäßen	Bemis Company (Neenah, Wisconsin, USA)	PM999
<b>Molekularbiologie</b>			

Petrischale, 94/16 mm, mit Nocken, schwere Ausführung	Petrischalen für Agarplatten	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)	633161
Glasperlen 2,85-3,3 mm	Ausplattierung des Transformationsansatzes	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)	A557.1
<b>Zellkultur</b>			
Descosept AF	Alkoholisches Schnelldesinfektionsmittel	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, D)	00-311-010
CELLSTAR Filter Top Zellkultur Flasche	Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)	658175
<i>Falcon 6-well Clear Flat Bottom TC-treated Multiwell Cell Culture Plate</i>	Kulturplatte, 6 Wells; Zellkultur für Western-Blot	Corning B.V. Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)	353046
Nunc F96 MicroWell Polystyrolplatte, weiß	Assayplatte, 96 Wells; Zellkultur für Luciferase Assay	Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	136101
<i>Corning 384-well Low Flange White Flat Bottom Polystyrene TC-treated Microplates</i>	Assayplatte, 384 Wells; Zellkultur für Luciferase Assay	Corning B.V. Life Sciences (Amsterdam, Niederlande)	3570
CRYO.S, Einfrierröhrchen	2 ml-Reaktionsgefäß zum Einfrieren von Zellen	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)	126263
CoolCell LX	Sukzessive, gleichmäßige Temperaturabnahme beim Einfrieren von Zellen	BioCision (Brooks Life Sciences; Griesheim, D)	BCS-405
<b>Proteinbiochemie</b>			
96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, transparent, CELLSTAR	Bradford-Assay	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen, D)	655162
Amersham Protran	Western-Blot	Cytiva Europe	10600014

Nitrocellulose (NC) Membran: Premium 0,2 µM		GmbH (Freiburg, D)	
Whatman Filterpapier (0,8 mm stark)	Western-Blot	Cytiva Europe GmbH (Freiburg, D)	10426892

### 2.1.9 Geräte

**Tabelle 15: Auflistung der eingesetzten Geräte; gegliedert nach ihren Einsatzschwerpunkten.** Angegeben sind die Verwendung und die Marke der einzelnen Geräte.

Gerät	Verwendung	Marke
<b>Allgemein</b>		
Minizentrifuge SU1550 (Rotor: D-8554 )	Zentrifuge für 0,2 ml PCR-Röhrchen	sunlab (neoLab Migge GmbH; Heidelberg, D)
Zentrifuge 5415 R (Rotor: FA-45-24-11)	Kühlende Zentrifuge für 1,5 - 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Zentrifuge 5810 R (Rotor: A-4-62)	Kühlende Zentrifuge für 15 - 50 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Rollenmischer RM5	Gleichmäßiges Mischen von Proberöhrchen	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH (Hecht-Assistent; Sondheim vor der Rhön, D)
Thermomixer compact	Schüttelinkubator	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Vortex Mixer	Mixer	NeoLab Migge GmbH (Heidelberg, D)
<b>Molekularbiologie</b>		
Zentrifuge 5417 C (Rotor: FA-45-24-11)	Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
BioPhotometer mit µKüvette G1.0	Bestimmung der DNA-Konzentration	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Elektrophoresekammer 40-0708 (12 x 9,5 x 16 cm)	Gelelektrophorese	PEQLAB Biotechnologie GmbH (VWR GmbH; Darmstadt, D)
UV-Transilluminator und Geldokumentations-system	Detektion der DNA im Agarosegel	Biostep GmbH (Burkhardtsdorf, D)

UV-Tisch	Detektion der DNA im Agarosegel	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell, D)
<i>G-Storm GS1 thermal cycler</i>	Thermocycler für PCR	AlphaMetrix Biotech GmbH (Rödermark, D)
<i>GeneAmp PCR System 2700</i>	Thermocycler für PCR	Applied Biosystems (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D)
<i>Concentrator 5301</i>	Vakuumtrockner	Eppendorf AG (Hamburg, D)
<i>CEQ 8000 Genetic Analysis System</i>	Sequenzierer	Beckman Coulter GmbH (Krefeld, D)
<b>Mikrobiologie</b>		
Multitron II	Schüttelinkubator	Infors HT (Einsbach, D)
<b>Zellkultur</b>		
Zentrifuge 5418 (Rotor: FA-45-18-11)	Zentrifuge für 1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Zentrifuge 5810 (Rotor: A-4-62)	Zentrifuge für 15 - 50 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Nikon Eclipse TS100	Mikroskop	Nikon
<b>Luciferase Assay</b>		
Zentrifuge 5804 (Rotor: A-2-DWP)	Zentrifugation von Assayplatten	Eppendorf AG (Hamburg, D)
Polymax 1040	Schüttelgerät für Inkubation	Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, D)
MicroLumat <i>Plus</i> LB 96V	Luminometer	Berthold Technologies GmbH (Bad Wildbad, D)
<b>Proteinbiochemie</b>		
<i>SONOPULS Ultrasonic Homogenizer HD 2200</i>	Sonikation	Bandelin electronic GmbH (Berlin, D)
<i>Synergy HT</i>	Bradford-Assay	BioTek Instruments Inc. (Bad Friedrichshall, D)
Mini-PROTEAN II	SDS-Page	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, D)

TE22 <i>Mighty Small Transphor Unit</i>	Western-Blot	Hoefer Inc. (Holliston, Massachusetts, USA)
LI-COR <i>Odyssey Fc Imaging System</i>	Western-Blot Analyse	LI-COR Biotechnology GmbH (Bad Homburg, D)

### 2.1.10 Software

**Tabelle 16: Verwendete Software-Programme für gesammelte Informationen über den SNP sowie für die Auswertung von Klonierungen, Luciferase Assays und Western-Blots, und für das Kreieren von Graphen sowie die statistische Auswertung.**

Software	Version	Nähere Informationen
<b>SNP</b>		
NCBI SNP Database	-	Sherry et al. 2001, <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/</a> (Stand: 22.04.2020)
<b>Klonierung</b>		
X-ImageJ	Version 1.46 [rev6]	National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA
<b>Luciferase Assay</b>		
Berthold WinGlow	Version 1.26	Windows Software für MicroLumat Plus LB 96 V d_e, Berthold Technologies, Bad Wildbad, D
<b>Western-Blot</b>		
Image Studio Lite	Version 2.1.10	LI-COR Biotechnology, Lincoln, Nebraska, USA
<b>Abbildungen, Graphen und Statistik</b>		
Coreldraw X5	Version 15.2.0.686	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canada
GoodNotes 5	Version 5.6.2	Time Base Technology Limited 2020
Graphpad Prism 9	Version 9.0.0 (86)	GraphPad Prism Software Software Inc., San Diego, California, USA
Microsoft Excel für Mac 2011	Version 14.6.9	Microsoft Corporation, Seattle, Washington, USA
Microsoft PowerPoint für Mac 2011	Version 14.6.9	Microsoft Corporation, Seattle, Washington, USA

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.1 Allgemeine molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Plasmid-DNA Amplifikation**

Zu 7,5 ml flüssigem LB-Medium (25 g LB Broth, Miller (BD Difco; Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D) gelöst in 1 l dH<sub>2</sub>O, autoklaviert) wurden für eine 1:1000- Verdünnung 7,5 µl Ampicillin (1 g Feststoff Ampicillin (Sigma-Aldrich; Darmstadt, D) gelöst in 100 ml ddH<sub>2</sub>O, steril filtriert, Stockkonzentration: 100 mg/ml, gelagert bei -20°C) gegeben. Ampicillinresistente Bakterienkolonien (als Glycerol-Stocks bei -80 °C gelagert), die das zu amplifizierende Plasmid enthielten, wurden zum LB-Medium mit Ampicillin hinzugegeben. Die Suspension wurde für ca. 16 bis 17 h bei 37 °C in einem Schüttelinkubator (Infors HT; Einsbach, D) bei 220 rpm inkubiert.

#### **2.2.1.2 Plasmid-DNA Isolierung**

Nach der Inkubation wurde die Bakteriensuspension für 5 min bei 4 °C bei 3220 x g (4000 rpm in Zentrifuge 5810 R (Rotor: A-4-62); Eppendorf AG; Hamburg, D) zentrifugiert. Daraufhin wurden die Plasmide nach Herstellerangaben isoliert (Qiaprep Miniprep Kits (QIAGEN GmbH; Hilden, D)). Hierbei wurde die Bakterienzelle durch Zugabe unterschiedlicher Puffer und zahlreiche Zentrifugationsschritte zunächst lysiert, und daraufhin die Plasmid-DNA sukzessive aufgereinigt. Bei allen Zentrifugationsschritten wurde eine Zentrifugation von 17800 x g durchgeführt. Außerdem wurde abweichend von den Herstellerangaben bei Schritt 6 und Schritt 8 des Protokolls 60s lang zentrifugiert, und bei Schritt 10 wurden 35 µl Puffer EB (*Elution Buffer*) (10 mM Tris Cl, pH 8,5) hinzugegeben (Qiaprep Miniprep Handbook (4. Edition), Stand: 06/2015, S.20 f.).

#### **2.2.1.3 Bestimmung der Plasmid-DNA-Menge**

Die DNA-Konzentration der isolierten Plasmide wurde mittels UV-Spektrometrie mit dem BioPhotometer (Eppendorf AG; Hamburg, D) und unter Einsatz einer µKüvette G1.0 (Eppendorf AG; Hamburg, D) bestimmt. Hierzu wurde die Einstellung dsDNA, Absorption: 260 eingestellt. Zunächst wurde das Gerät über

die „Blank“-Einstellung mit 2 µl Puffer EB (*Elution Buffer*) (10 mM Tris Cl, pH 8,5) kalibriert. Durch die „Sample“-Einstellung konnte daraufhin durch Zugabe von 2 µl der Plasmide in EB-Puffer die Plasmid-Konzentration bestimmt werden. Dabei liegt das Absorptionsmaximum der DNA durch die aromatischen Ringe der Basen bei einer Optischen Dichte (OD) von 260 nm, das von Proteinen und Aminosäuren bei 280 nm, und das von Salzen bei 230 nm. Eine reine DNA sollte für das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{280}$  Werte zwischen 1,8 bis 2,0 aufweisen, während das Verhältnis  $OD_{260}/OD_{230}$  über 2,0 liegen sollte (Armbrecht 2013).

### 2.2.1.4 Ansetzen von Glycerolstocks von Bakterien

Zur Herstellung von Glycerolstocks von Bakterien zur Lagerung über längere Zeiträume wurden nach der Inkubation und vor der Plasmid-DNA-Isolierung 600 µl der Bakteriensuspension mit 300 µl 86%-igem Glycerol gemischt, und bei -80 °C gelagert.

## 2.2.2 Methoden im Rahmen der Klonierung

### 2.2.2.1 Polymerase-Kettenreaktion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Konstrukte kloniert, sogenannte PEST-Konstrukte, die eine PEST-Sequenz enthalten. Hierbei handelt es sich um eine Polypeptid-Sequenz, die mit Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) angereichert ist, und die zu einem schnelleren Abbau des zugehörigen Proteins führt (Rechsteiner und Rogers 1996). Bei *Integrated DNA Technologies* (IDT; Löwen, Belgien) wurde zunächst ein *gBlock* Gen-Fragment (im Folgenden nur *gBlock* genannt) bestellt, das die gewünschte PEST-Sequenz enthielt (s. 3.3.1). Zur Amplifikation des *gBlocks* wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mithilfe der *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase mit *proofreading* Aktivität (PEQLAB Biotechnologie GmbH (VWR GmbH); Darmstadt, D) durchgeführt (Tab. 17). Der mit der Polymerase mitgeführte Reaktionspuffer „komplett“ stellte während der PCR ein optimales Arbeitsmilieu für die Polymerase her (Mullis et al. 1986).

**Tabelle 17: Schrittweise Zusammensetzung des PCR-Ansatzes.** Auf Eis gelagert.

1. dH <sub>2</sub> O		12,8 µl
2. 10X Reaktionspuffer „komplett“ (mit 20 mM MgSO <sub>4</sub> )	Soll: 1X	→ 2,0 µl
3. 2 mM dNTPs	Soll: 200 µM	→ 2,0 µl
4. <i>Forward</i> Primer (10 pmol/µl)	Soll: 300 nM	→ 0,6 µl
5. <i>Reverse</i> Primer (10 pmol/µl)	Soll: 300 nM	→ 0,6 µl
Mixen		
6. <i>pwo</i> -DNA-Polymerase (1 U/µl)	Soll: 0,03-0,06 U/ µl	→ 1,0 µl
Mixen		
7. <i>gBlock</i> -DNA	Soll: 10 ng	→ 1,0 µl
Mixen		
<b>Summe</b>		20,0 µl

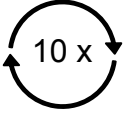
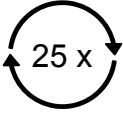
Als Template fungierte der *gBlock*, aus dem durch einen *Forward* und *Reverse* Primer (Tab. 18) ein Produkt in der Länge von 550 bp amplifiziert wurde, indem die verwendeten Primer den Startpunkt der Elongation der DNA durch die DNA-Polymerase markierten. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs; PCR *Nucleotide* Mix, dATP, dCTP, dTTP, dGTP; je 10 mM; Roche Diagnostics D GmbH; Mannheim, D) wurden nach der Denaturierung der Doppelstrang-DNA mithilfe der Polymerase an das jeweilige freie 3'- Ende des *Forward*- und *Reverse*- Strangs eingebaut (Mullis et al. 1986).

**Tabelle 18: Verwendete Primer unter Angabe ihrer Sequenz.**

	<b>Primer</b>	<b>Sequenz 5' → 3'</b>
<i>Forward</i> Primer	M13For	GTAAAACGACGGCCAGTG
<i>Reverse</i> Primer	M13rev	GGAAACAGCTATGACCATGA

Die PCR wurde in einem Thermocycler (*G-Storm GS1 thermal cycler*; AlphaMetrix Biotech GmbH; Rödermark, D) als *Touchdown*-PCR durchgeführt, die eine spezifische und vielfältige Amplifikation der gewünschten DNA-Sequenz erlaubt, während die Amplifikation unspezifischer DNA-Sequenzen zum großen Teil vermieden wird (Don et al. 1991) (Tab. 19).

**Tabelle 19: Touchdown-PCR-Programm mit Pwo-Polymerase.** Angegeben sind die Anzahl der Zyklen, die jeweilige Dauer und Temperatur sowie eine kurze Beschreibung des jeweiligen Vorgangs. Als eigentlicher *Touchdown* wurde das sukzessive Abkühlen pro Zyklus von 65 °C in 1 °C-Schritten auf 55 °C verstanden. Dabei liegen bei 65 °C die maximale Annealing-Temperatur und bei 56 °C die minimale Annealing-Temperatur vor, bei denen die Primer jeweils am *Forward*- bzw. *Reverse*-Strang binden konnten.

Zyklen	Dauer	Temperatur	Vorgang
1 x	2 min	94 °C	Denaturierung
	15 s	94 °C	Denaturierung
	30 s	65 °C - 1°C	Annealing, <i>Touchdown</i>
	1 min	68 °C	Elongation
	15 s	94 °C	Denaturierung
	30 s	55 °C	Annealing
	1 min	68 °C	Elongation
1 x	7 min	68 °C	Verlängerte Elongation
1 x	∞	4 °C	Lagerung

### 2.2.2.2 Agarosegelelektrophorese und Aufreinigung von PCR-Produkten

Um das Resultat der PCR beurteilen zu können, wurden 1/10 des Gesamtvolumens des PCR-Produktes (2 µl) in 13 µl TE-Puffer verdünnt und mit 2,5 µl 6X Orange LD versehen. Daraufhin wurden die Proben, wie unter 2.2.2.6 beschrieben, auf ein 2 %-iges Agarose-Testgel aufgetragen, um im Rahmen einer Gelelektrophorese die Größe des amplifizierten *gBlocks* beurteilen zu können. PCR-Produkte wurden anhand des *QIAquick PCR Purification Kits* (QIAGEN GmbH; Hilden, D) aufgereinigt. Hierbei wurden für die Aufreinigung der DNA und Entfernung von Kontaminanten, wie im Protokoll beschrieben, unterschiedliche Puffer verwendet und mehrere Zentrifugationsschritte durchgeführt. Letztere wurden alle bei 17800 x g für 1 min durchgeführt (Qiaquick Spin Handbook, Stand: 03/2008, S. 19 f.). 1/10 des Gesamtvolumens des aufgereinigten PCR-Produktes (3 µl) wurden auf ein 2 %-iges Agarose-Testgel aufgetragen.

### 2.2.2.3 Restriktionsverdau von Plasmiden

Die Plasmide wurden mithilfe von Restriktionsendonukleasen (Tab. 20) geschnitten.

**Tabelle 20: Verwendete Restriktionsendonukleasen für den Restriktionsverdau.** Angegeben sind die Konzentration des Restriktionsenzym sowie der Puffer, in dem optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

<b>Restriktions-enzyme</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Puffer</b>	<b>Marke</b>	<b>Kat. Nr.</b>
XbaI	20000 U/ ml	<i>CutSmart</i> oder <i>NEBuffer 2.1</i>	<i>New England BioLabs</i> GmbH (Frankfurt am Main, D)	R0145S
SgrAI	10000 U/ ml	<i>CutSmart</i> oder <i>NEBuffer 2.1</i>	<i>New England BioLabs</i> GmbH (Frankfurt am Main, D)	R0603S
PfIMI	10000 U/ ml	<i>NEBuffer 3.1</i> oder <i>NEBuffer 2.1</i>	<i>New England BioLabs</i> GmbH (Frankfurt am Main, D)	R0509S
HindIII	20000 U/ ml	<i>NEBuffer 2.1</i>	<i>New England BioLabs</i> GmbH (Frankfurt am Main, D)	R0104S

Im Laufe der Klonierung wurden viele Variationen beim Restriktionsverdau vorgenommen. Nach der Optimierung wurden in einem Gesamtvolumen von 30 µl 2 µg des jeweiligen Vektors unter Einsatz von 1X *NEBuffer 2.1* (*New England BioLabs* GmbH; Frankfurt am Main, D; Kat. Nr.: B7202S) mit 3 U, 5 U bzw. 10 U der passenden Restriktionsendonukleasen geschnitten (s. 3.3.2.3 und 3.3.3.2). Dabei wurde beim Pipettieren des Ansatzes zunächst dH<sub>2</sub>O mit dem Puffer gemischt, um dann die DNA und zuletzt die Restriktionsenzyme hinzuzugeben. Wenn die Volumina Werte erreichten, die schwer zu pipettieren waren, wurde ein Master-Mix hergestellt. Die Proben wurden für 3 h bei 37 °C inkubiert und daraufhin für 20 min bei 65 °C hitzedenaturiert, um die Restriktionsendonukleasen zu hemmen. Bis zu ihrer Vorbereitung für die Agarosegelelektrophorese wurden die geschnittenen Plasmide bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.2.4 Dephosphorylierung von Vektoren**

Die zuvor mit Restriktionsendonukleasen geschnittenen Vektoren, in die man durch Klonierung neue Inserts einfügen wollte, wurden in einem nächsten Schritt dephosphoryliert. Dies war notwendig, um die Religation des Vektors durch die T4-DNA-Ligase zu verhindern, die nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann (Mülhardt 2013). Hierfür wurden 1 U der alkalischen

Phosphatase *Calf-Intestinal-Phosphatase* (CIP; 1000 U/ml; *New England BioLabs GmbH*; Frankfurt am Main, D; Kat. Nr.: M0290S) hinzugegeben, die Probe für 1 h bei 37 °C inkubiert und das Enzym für 20 min bei 65 °C hitzedenaturiert. Die Probe wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4 °C gelagert.

### 2.2.2.5 Ausgießen von Agarosegelen

Für ein 1 %-iges Gel wurden 0,5 g Agarose (SeaKem LE Agarose; Lonza Group AG; Basel, Schweiz) in 50 ml 1X TBE- oder TAE- Puffer (100 ml 10X Puffer in 900 ml dH<sub>2</sub>O) gelöst (Tab. 21). Das Gemisch wurde bei 800 W in einer Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose komplett gelöst hatte. 2 µl Ethidiumbromid wurden hinzugegeben, um die Nukleinsäuren später im UV-Licht sichtbar machen zu können. Die Suspension wurde in einen Gelschlitten mit eingesetzten Kämmen für die späteren Geltaschen gegossen. Nach einer Abkühlung bei Raumtemperatur von ca. 20 min konnte das Gel mit den jeweiligen Proben beladen werden.

**Tabelle 21: Zusammenfassung einiger Besonderheiten beim Ausgießen von Agarosegelen.**

Material	Verwendung
1 %-iges Gel	Auftrennung großer DNA-Fragmente (5 - 10 kb)
1,5 %-iges Gel	Auftrennung DNA-Fragmente mittlerer Größe
2 %-iges Gel	Auftrennung kleiner DNA-Fragmente (0,2 - 1kb)
TBE- Puffer	analytische Gele, Testgele
TAE- Puffer	präparative Gele

### 2.2.2.6 Agarosegelelektrophorese

Für ein präparatives Gel wurde der komplette Ansatz eines Restriktionsverdaus verwendet, für ein analytisches Gel wurde nur 1/10 des Gesamtvolumens des Restriktionsverdaus eingesetzt. Zu den inkubierten Proben wurden als Ladepuffer entweder der *6X DNA Gel Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: R0611) oder der *6X Orange DNA Loading Dye* (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: R0631) gegeben, die jeweils so verdünnt wurden, dass sie in einer 1-fachen Endkonzentration vorlagen. Das durch 1 bis 2 mm Puffer bedeckte Gel in einer Elektrophorese-

kammer wurde mit den Proben und 0,5 µg eines Molekülmassenstandards (Tab. 22) beladen. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung von 90 V wanderten die DNA-Fragmente von der Kathode (Minuspol) zur Anode (Pluspol) durch das elektrische Feld. Nach dem Durchlaufen der Proben wurde ein Bild im Transilluminator gemacht.

**Tabelle 22: Verwendete Molekülmassenstandards für die Agarosegelelektrophorese.** Molekülmassenstandards helfen dabei, die Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente abschätzen zu können. Angegeben sind die Länge der aufgetrennten DNA sowie die Konzentration des jeweiligen Molekülmassenstandards.

Molekülmassenstandard	Länge der aufgetrennten DNA	Konzentration	Marke	Kat. Nr.
λ DNA/ HindIII Marker, 2	2000-20000 bp	0,1 µg/ µl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	SM0101
pUC19 DNA/ MspI (HpaII) Marker, 23	100-500 bp	0,1 µg/ µl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	SM0221
O'GeneRuler DNA Leiter-Mix	500-10000 bp	0,1 µg/ µl	Thermo Fisher Scientific Inc. (Dreieich, D)	SM1173

### 2.2.2.7 Extraktion der DNA aus einem Agarosegel

Das Gel wurde auf einen UV-Tisch (Vilber Lourmat Deutschland GmbH; Eberhardzell, D) gelegt, auf dem anhand des Ethidiumbromids die Banden sichtbar gemacht werden konnten. Mit einem sauberen Skalpell wurde die gewünschte Bande ausgeschnitten und das Stück Gel in ein Reaktionsgefäß überführt. Mithilfe des *QIAquick Gel Extraction Kits* (QIAGEN GmbH; Hilden, D) wurde die DNA aus dem Gel extrahiert. Hierbei wurde wie im *Quick-Start* Protokoll (Stand: 07/15) beschrieben vorgegangen, wobei zunächst das Gel unter Zugabe eines Puffers bei 50 °C aufgelöst wurde, um dann die Plasmid-DNA weiter aufzureinigen zu können. Die nötigen Zentrifugationsschritte wurden bei 17800 x g ausgeführt. Bei Schritt 9 des Protokolls wurden nur 30 µl Puffer EB (*Elution Buffer*) (10 mM Tris Cl, pH 8,5) zum Eluieren hinzugegeben, um

höhere DNA-Konzentrationen zu erhalten. Nach der Extraktion wurde ein Agarose-TBE-Testgel als Kontrolle gemacht (s. 2.2.2.6).

### 2.2.2.8 Ligation

Da sowohl die verwendeten Vektoren als auch die Inserts überhängende Enden nach dem Schnitt mit den Restriktionsenzymen aufzeigten, erfolgte eine „*Sticky-end*“ Ligation. Die Intensitäten des Vektors und des Inserts wurden mithilfe eines 1,5 %-igem TBE-Gels abgeschätzt. Zur Messung der Stärke des Signals wurde das Programm ImageJ (*National Institutes of Health*; Bethesda, Maryland, USA) verwendet. Das einzusetzende Verhältnis von Vektor zu Insert für die Ligation wurde mithilfe einer Gleichung bestimmt (Abb. 4). Dabei wurde das Insert in einem 3:1 molaren Überschuss über den Vektor eingesetzt.

$$f = \frac{\text{Größe}_{\text{Vektor}}}{\text{Größe}_{\text{Insert}}} \cdot \frac{\text{Intensität}_{\text{Insert}}}{\text{Intensität}_{\text{Vektor}}} \cdot \frac{\text{Volumen}_{\text{Vektor}}}{\text{Volumen}_{\text{Insert}}} \cdot \frac{1}{\text{Überschuss}}$$

$$\mu\text{l}_{\text{Vektor}} = \mu\text{l}_{\text{Insert}} \cdot f$$

$$\mu\text{l}_{\text{Insert}} = \frac{\mu\text{l}_{\text{Vektor}}}{f}$$

**Abbildung 4: Gleichung zur Bestimmung des einzusetzenden Verhältnisses von Vektor zu Insert für die Ligation.**

Die Rechnung zur Bestimmung der Molarität der Enden stellte eine weitere Möglichkeit dar, um das Verhältnis zwischen Vektor und Insert abzuschätzen (Abb. 5).

$$\text{Molarität} = [(\mu\text{g}/\mu\text{l}) \div (\text{bp} \cdot 650 \text{ Da})] \cdot 2 \text{ Enden}$$

**Abbildung 5: Gleichung zur Bestimmung der Molarität der Enden, um das Verhältnis von Vektor zu Insert für die Ligation abzuschätzen.**

Die für die Rechnung benötigte Plasmid-DNA-Konzentrationsbestimmung des Vektors und Inserts wurde in einem BioPhotometer bestimmt (s. 2.2.1.3). Pro Ligationsansatz wurden das errechnete Verhältnis der DNA, 1  $\mu\text{l}$  T4-DNA-Ligase (400000 U/ ml; *New England BioLabs GmbH*; Frankfurt am Main, D; Kat. Nr.: M0202S) und 1X T4-DNA-Ligase Reaktionspuffer (*New England BioLabs*

GmbH; Frankfurt am Main, D; Kat. Nr.: B0202S) in einem durch Zugabe von dH<sub>2</sub>O erreichten Gesamtvolumen von 10 µl oder 20 µl eingesetzt. Dabei wurden zunächst das dH<sub>2</sub>O und der Puffer gemischt, um dann die Vektor- und Insert-DNA und zuletzt die Ligase hinzuzugeben. Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz, in dem nur der dephosphorylierte Vektor ohne Insert hinzugegeben wurde. Der Ligationsansatz wurde für 16 h bei 16 °C inkubiert und für 15 min bei 65 °C hitzeinaktiviert. Nach der erfolgten Ligation wurde die Transformation in DH5α-Zellen durchgeführt und der Transformationsansatz auf Agarplatten ausplattiert (s. 2.3.3). Einzelne Kolonien wurden nach dem Wachstum auf den Agarplatten gepickt und die Abschnitte der Plasmid-DNA sequenziert, um sicherzustellen, dass die gewonnene DNA der gewünschten klonierten Sequenz entsprach (s. 2.2.2.9).

### 2.2.2.9 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mithilfe des *Genome Lab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kits* (Beckman Coulter GmbH; Krefeld, D; Stand: 09/04), wobei das Protokoll an mehreren Stellen abgewandelt wurde. Zunächst wurde die DNA-Menge abgeschätzt. Da es sich immer um Doppelstrang-DNA (dsDNA) handelte, die zwischen 4,5 und 6 kbp lang war, wurden zwischen 300 und 400 ng für 100 fmol angenommen. Danach folgte das *Pre-Heat Treatment* nach Protokoll. Der DNA-Sequenzierungs-Mix wurde wie folgt zusammengestellt: In so viel dH<sub>2</sub>O, dass am Ende ein Gesamtvolumen von 10 µl erreicht wurde, wurden je nach zu sequenzierender Plasmid-DNA 300 bis 400 ng der Plasmide gelöst, bei 96 °C für 1 min in einem Thermocycler erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt.

**Tabelle 23: Verwendeter Primer für die Sequenzierung unter Angabe der Konzentration und der Sequenz.**

Primer	Konzentration	Sequenz (5' → 3')	Marke
T820_Luc-SgrAI-F	100 pmol/ µl	CAACACCCCAACATCTTCGAC	metabion international AG (Planegg/Steinkirchen, D)

Es folgte die Zugabe von 2 µl des zuvor in ddH<sub>2</sub>O auf 10 pmol/µl verdünnten Primers T820\_Luc-SgrAI-F (Tab. 23) und von 4 µl des DTCS Quick Start Master Mix.

Das *Thermal cycling* Programm wurde wie im Protokoll beschrieben durchgeführt. Für die darauf folgende Ethanol-Präzipitation wurden einige Punkte des Protokolls abgeändert. So wurden anstelle von 0,5 ml Reaktionsgefäßen solche mit einem Fassungsvermögen von 1,5 ml verwendet. Vom Stop Solution/ Glykogen- Gemisch wurden 5 µl zu den 10 µl des DNA-Sequenzierung-Mix gegeben. Daraufhin wurden pro Reaktion noch 10 µl dH<sub>2</sub>O zu den Proben hinzugegeben, um auf das ursprüngliche Volumen der DNA-Sequenzierungs-Reaktion von 20 µl zu kommen. Außerdem wurden die Proben nach der Zugabe von gekühltem 95 % (v/v) Ethanol/ dH<sub>2</sub>O bei 4 °C und 16200 x g (13200 rpm in Zentrifuge 5415 R (Rotor: FA-45-24-11); Eppendorf AG, Hamburg, D) für 30 min zentrifugiert. Nach der Zugabe von 70 % (v/v) Ethanol/ dH<sub>2</sub>O wurden die Proben jeweils bei 4 °C und 16200 x g für 15 min zentrifugiert. Zuletzt wurden die Vakuum-getrockneten Proben in je 40 µl der *Sample Loading Solution* (SLS) resuspendiert und für mind. 30 min bei 4 °C gelagert.

Bevor die Proben in den Sequenzierer gegeben werden konnten, wurden die Proben in eine trübe Platte pipettiert und nach Protokoll mit einem Tropfen Mineralöl versehen, der der Verdunstung der Proben entgegenwirken sollte. Eine weitere transparente „Pufferplatte“ wurde mit 250 bis 300 µl *Genome Lab Separation Buffer* (Beckman Coulter GmbH; Krefeld, D; Kat. Nr.: 608012) befüllt. Die DNA wurde nach der Sanger-Methode im *CEQ 8000 Genetic Analysis System* (Beckman Coulter GmbH; Krefeld, D) unter Einsatz des *GenomeLab Separation Gels- LPA I* (Beckman Coulter GmbH; Krefeld, D; Kat. Nr.: 608010) sequenziert und analysiert.

### **2.3 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.3.1 Herstellung von Agarplatten**

Ein Medium Mix aus 25 g/ l Difco LB Broth (Miller; BD Difco; Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: 257269) und 15 g/ l Bacto Agar (BD Difco;

Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: 214030) (beides gelöst in dH<sub>2</sub>O) wurde autoklaviert, in der Abkühlungsphase bei 60 °C aus dem Autoklaviergerät genommen, und mit Ampicillin (1:100 verdünnt) versehen. Je 10 ml des Gemisches wurden mit einer Stabpipette in Petrischalen ausplattiert, die ein paar Mal geschwenkt wurden bis die gesamte Oberfläche mit Agar-Agar benetzt war. Nach dem Abkühlen der Platten wurden diese mit dem Agar-Agar nach oben bei 4 °C gelagert.

### 2.3.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Zunächst wurden DH5α Zellen (*E.coli*) zur Amplifikation in 7,5 ml LB-Medium befördert (zu dem kein Antibiotikum gegeben wurde) und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am Tag der Herstellung wurden 2 ml der über Nacht angezüchteten Zellen zu 200 ml vorgewärmten LB-Medium in einen autoklavierten 500 oder 1000 ml Kolben gegeben und solange im Schüttelinkubator gelassen, bis die optische Dichte OD 595 den Wert 0,45 erreichte. Die Zellen in LB-Medium wurden in 50 ml Reaktionsgefäße (zuvor bei 4 °C gelagert) aufgeteilt, für 5 min auf Eis stehen gelassen und dann bei 1500 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml des zuvor auf Eis vorgekühlten *Transformation buffer* (Tfb) 1 resuspendiert. Nachdem die Proben auf Eis für 5 min stehen gelassen wurden, wurde das vorherige Vorgehen der Zentrifugation und des Wegkippens des Überstands wiederholt, wobei das Pellet in diesem Schritt in 4 ml des vorgekühlten *Transformation buffer* (Tfb) 2 resuspendiert wurde. Nachdem die Proben für 15 min auf Eis stehen gelassen wurden, wurden in bereits vorgekühlten Reaktionsgefäßen 500 µl große Aliquots hergestellt. Die Zellen wurden in einem Gemisch aus 100 %-igem Isopropanol und Trockeneis eingefroren und dann bei -80 °C gelagert.

### 2.3.3 Transformation und Ausplattierung auf Agarplatten

Die chemisch kompetenten Zellen DH5α wurden schonend auf Eis aufgetaut. Daraufhin wurden je 100 µl der Zellen zu den zuvor hitzeinaktivierten Ligationsansätzen (s. 2.2.2.8) gegeben, und für 30 min auf Eis inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Ligationsansatz, der nur den dephosphorylierten

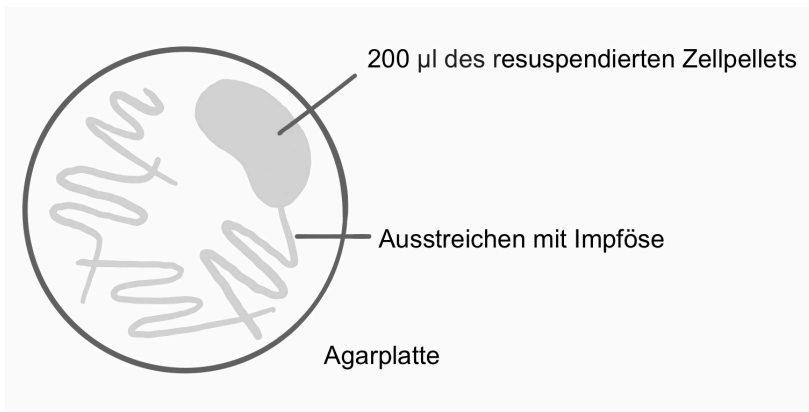
Vektor und kein Insert enthielt, in die Zellen transformiert. Positivkontrollen dienten dazu, die Transformationseffizienz bestimmen zu können. Hierzu wurden 10 ng der DNA vom pLUC-ATXN3/Ca Vektor mit dem Puffer EB (*Elution Buffer*) (10 mM Tris Cl, pH 8,5) verdünnt.

Die Proben wurden nach der 30-minütigen Inkubation auf Eis einem Hitzeschock bei 42 °C für 30 bis 45 s unterzogen, um die Zellmembran der kompetenten Zellen für die Plasmide durchgängig zu machen. Nun wurden die Proben für weitere 5 min auf Eis stehen gelassen. Je 1000 µl des frisch angesetzten und bei 37 °C vorgewärmten SOC-Mediums (SOB (*Super optimised broth*)- Medium bei Raumtemperatur + 20 mM Glucose (Stock: 2 M, 1:100- Verdünnung)) wurden zu den Proben gegeben. Die Proben wurden für 1 h bei 37 °C in den Schüttelinkubator (Infors HT; Einsbach, D) bei 220 rpm gestellt. Nach der Inkubation wurden die Reaktionsgefäße bei 600 x g für 5 min zentrifugiert. 900 µl des Überstands wurden abgenommen, sodass noch 200 µl des Überstands verblieben, in denen das Zellpellet resuspendiert wurde. Die Resuspension wurde mithilfe von Glasperlen gleichmäßig auf im Inkubator vorgetrockneten Agarplatten ausplattiert. Diese wurden mit dem Agar nach oben über Nacht im Inkubator bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien gewonnen und in LB-Medium mit 1:1000- verdünntem Ampicillin (Stockkonzentration: 100 mg/ml) über Nacht in den Schüttelinkubator (Infors HT; Einsbach, D) bei 37 °C und 220 rpm gestellt (s. 2.2.1.1). Am nächsten Tag wurde die Plasmid-DNA isoliert und ihre Menge bestimmt (s. 2.2.1.2 und 2.2.1.3). Vor der Plasmid-DNA Isolation wurden 500 µl der Über-Nacht-Kulturen bei 4 °C gelagert, um aus diesen Kulturen später Glycerolstocks der Bakterien herstellen zu können (s. 2.2.1.4), falls die Plasmid-DNA nach der Sequenzierung die richtige Sequenz aufwies. Mit 2 µg der isolierten Plasmid-DNA wurde ein Testrestriktionsverdau durchgeführt (s. 2.2.2.3) und eine Agarose-Gelelektrophorese gemacht (s. 2.2.2.6). Wenn die Plasmide auf dem Gel die gewünschte Größe und Ausschnitte zeigten, wurde die DNA sequenziert (s. 2.2.2.9).

### 2.3.4 Retransformation

Eine Retransformation der Konstrukte wurde durchgeführt, wenn diese nach einiger Zeit bei der Plasmid-DNA Isolation nur noch niedrige Konzentrationen aufwiesen. Hierzu wurde die DNA mit dem Puffer EB (*Elution Buffer*) (10 mM Tris Cl, pH 8,5) so verdünnt, dass sich in 10 µl 1 ng bzw. 10 ng DNA befanden. Daraufhin wurden je 100 µl der chemisch kompetenten Zellen zu den Ansätzen hinzugegeben, um dann die Transformation durchzuführen (s. 2.3.3). Beim letzten Protokollschrift vor der Ausplattierung (s. 2.3.3) wurde das Pellet in 200 µl des Überstands resuspendiert und auf die Agarplatte als Verdünnungsausstrich ausplattiert (Abb. 6).



**Abbildung 6: Ausplattierung eines Retransformationsansatzes auf eine Agarplatte.** Das resuspendierte Zellpellett wurde nach Durchführung einer Retransformation auf die Agarplatte gegeben und mithilfe einer Impföse so ausgestrichen, dass eine sukzessive Verdünnung gewährleistet wurde. So wurde es möglich, einzelne Kolonien nach der Inkubation über Nacht zu picken.

Nach der Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde eine einzelne Kolonie gepickt und weiter vorgegangen wie in 2.3.3 erläutert. Wenn die Plasmidkonzentrationen immer noch gering waren, wurden Über-Tag-Kulturen angesetzt, indem die Plasmid-DNA analog zu 2.2.1.1 amplifiziert wurde und für über 6 h inkubiert wurde. Parallel dazu wurden in einen 100 ml autoklavierten Kolben 50 ml LB-Medium, 50 µl Ampicillin und 100 µl der Über-Tag-Kultur für eine Über-Nacht-Kultur gegeben. Bei einer Inkubation bei 37 °C und 220 rpm in einem Schüttelinkubator (Infors HT; Einsbach, D) wurde die DNA amplifiziert, aus der man dann am nächsten Tag sowohl einen neuen Glycerolstock herstellen

(2.2.1.4) als auch neue Plasmid-DNA isolieren konnte (2.2.1.2), die durch die durchgeführten Maßnahmen wieder höhere Konzentrationen erreicht haben sollte.

### **2.4 Zellbiologische Methoden**

#### **2.4.1 Allgemeine Zellkultur-Methoden**

##### **2.4.1.1 Zellkultur**

HEK-293T Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter sterilen Bedingungen im Kulturmedium *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) mit Zugabe von 10 % FBS (*Fetal Bovine Serum*) und 1 % A/A (*Antibiotic-Antimycotic*) kultiviert.

##### **2.4.1.2 Zellen aus Zellstock in Kulturflasche bringen**

Der Zellstock wurde im Wasserbad zügig bei 37 °C aufgetaut. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das entstandene Pellet in 1 ml neuem DMEM-Medium gelöst. Die gelösten Zellen wurden in DMEM in eine Kulturflasche überführt, die mit 9 ml frischem DMEM auf 10 ml aufgefüllt wurde. Die Kulturflasche wurde bei 37 °C in den Inkubator gestellt.

##### **2.4.1.3 Zellstock herstellen**

Die Zellen in DMEM wurden bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 900 µl DMEM resuspendiert und in ein CRYO.S-Einfrierröhrchen (Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D) überführt. Daraufhin wurden 100 µl DMSO hinzugefügt. Die Zellen wurden in einer Box von CoolCell (BioCision; Brooks Life Sciences; Griesheim, D) langsam auf -80 °C heruntergekühlt und gelagert.

##### **2.4.1.4 Subkultivierung der Zellen**

Bei einer Konfluenz von 70 bis 80 % wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurden die Zellen mit 5 ml vorgewärmten DPBS gewaschen. Daraufhin wurde das DPBS abgesaugt und 1 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA (0,25 %) hinzugegeben, mit dem die Zellen für 2 min bei 37 °C inkubiert wurden. Das Trypsin als

Protease spaltet Proteine, die die Zellen am Boden der Kulturflasche halten, und das EDTA bindet Magnesium- und Calcium-Ionen, die auch wichtig für die Anheftung der Zellen sind (Schmitz 2011). 9 ml vorgewärmtes DMEM wurden zu den Zellen hinzugegeben, die das Trypsin neutralisierten und die Zellen vom Boden der Flasche spülten. Das Medium wurde mehrere Male auf- und wieder abgesaugt, damit sich alle Zellen vom Boden der Flasche lösen konnten. Je nach Stärke der Verdünnung wurden 9,5 ml für eine 1:20- Verdünnung, 9 ml für eine 1:10- Verdünnung oder 5 ml für eine 1:2- Verdünnung herausgenommen. Das gewonnene Medium wurde entweder in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen für weitere Schritte, wie z. B. dem Zellenaussäen, überführt oder verworfen. Es wurde neues DMEM hinzugegeben, sodass das Endvolumen in der Flasche wieder 10 ml betrug. Nach vorsichtigem Schwenken der Kulturflasche in Achtertouren für eine homogene Verteilung wurde die Kulturflasche wieder in den Inkubator bei 37 °C gestellt.

### **2.4.2 Zellkultur im Rahmen des Western-Blots**

#### **2.4.2.1 Zellen aussäen und Transfektion**

Die Zellen wurden nach dem traditionellen Protokoll des *Attractene Transfection Reagent Handbooks* (QIAGEN GmbH; Hilden, D) transfiziert. Am Tag vor der Transfektion wurden in eine 6-Well-Platte  $4 \times 10^5$  Zellen in 2 ml DMEM pro Well ausgesät und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Transfektion wurde nach dem Herstellerprotokoll mit den Angaben für eine 6-Well-Platte durchgeführt. Am Tag der Transfektion wurden 1,2 µg der zu transfizierenden Plasmide mit Opti-MEM auf ein Endvolumen von 100 µl verdünnt. Nachdem 4,5 µl Attractene Reagenz hinzugefügt wurden, wurde der Transfektionsansatz für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt und 2000 µl frisches DMEM auf die Zellen gegeben. Der Transfektionsansatz wurde zu den Zellen gegeben und die Well-Platte in Achtertouren geschwenkt. Die Zellen wurden daraufhin mit dem Transfektionsansatz bei 37 °C für 48 h inkubiert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet. Hierzu wurde zunächst das Medium aus den Wells aspiriert und die

adhärenten Zellen mit je 1 ml kalten DPBS vom Boden der Platte gelöst, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und die Pellets bei -80 °C gelagert, oder auf Eis gestellt, wenn die Lysate gleich im Anschluss hergestellt wurden.

### **2.4.2.2 Zellen lysieren**

Alle Protokollschritte wurden auf Eis ausgeführt. Die Pellets wurden in 30 bis 60 µl RIPA (*Radioimmunoprecipitation Assay*)- Puffer plus *cOmplete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free* (Roche Diagnostics D GmbH; Mannheim, D) (je nach Größe des Pellets) resuspendiert. Mithilfe des *SONOPULS Ultrasonic Homogenizers HD 2200* (Bandelin electronic GmbH; Berlin, D) wurde eine Ultraschallhomogenisation der Proben in 5 Zyklen für je 3 s bei 10 % durchgeführt. Daraufhin wurden die Proben für 25 min auf Eis inkubiert, wobei sie alle 5 min mithilfe eines Vortexers kräftig durchgemischt wurden. Nach der Inkubation wurden die Proben für 15 min bei 16100 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde gewonnen und in ein neues, vorgekühltes Reaktionsgefäß gegeben. Es wurde 86 %-iges Glycerol in einer finalen Konzentration von 10 % (v/v) als Gefrierschutz hinzugegeben. Die fertig hergestellten Lysate wurden bei -80 °C gelagert und standen dann der weiteren Verarbeitung für die Proteinkonzentrationsbestimmung im Bradford-Assay (s. 2.7.1) zur Verfügung.

### **2.4.3 Zellkultur im Rahmen des Luciferase Assays**

#### **2.4.3.1 Zellen zählen und aussäen**

Nach der Subkultivierung von HEK-293T Zellen wurden 20 µl der gewonnenen Zellen in DMEM in 60 µl (unsterilem) DPBS 1:4 verdünnt. Die Zellen wurden mithilfe der Neubauer-Zählkammer gezählt, indem in beide Zählkammern je 20 µl der Zellsuspension appliziert wurden. Es wurden alle Zellen in den vier Quadranten der jeweiligen Zählkammer gezählt und die ungefähre Gesamtanzahl der Zellen berechnet (Abb. 7).

$$[\text{Gesamtanzahl Zellen}] = [\text{Anzahl der gezählten Zellen}] \cdot 10^4 \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

**Abbildung 7: Berechnung der ungefähren Gesamtzahl der Zellen in einer Suspension mithilfe der Neubauer-Zählkammer nach Auszählung der vier Quadranten.**

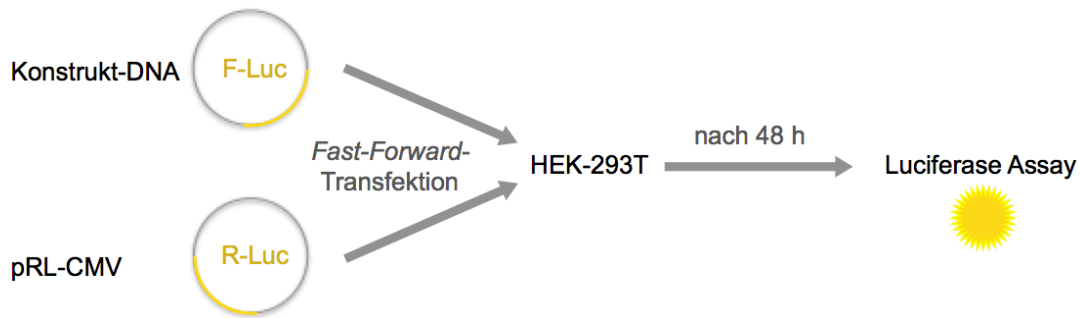
Daraufhin wurde der Mittelwert aus den Ergebnissen der beiden Zählkammern gewonnen und unter Berücksichtigung der Verdünnung in DPBS der Zellgehalt der bisherigen Suspension berechnet. Nun wurde mit frischem DMEM eine Zellsuspension hergestellt, die die gewünschte Zellzahl enthielt. Im Rahmen der Etablierung des Luciferase Assays wurden abhängig von der verwendeten Kulturplatte pro *Well* unterschiedliche Zellzahlen in bestimmten Volumina ermittelt (Tab. 24).

**Tabelle 24: Verwendete Zellzahl in bestimmtem Volumen pro *Well* abhängig von der Kulturplatte.**

Plattenformat	Zellzahl pro <i>Well</i>	Volumen der Zellsuspension pro <i>Well</i>
96- <i>Well</i> -Platte	40000	100 $\mu\text{l}$
384- <i>Well</i> -Platte	10000	30 $\mu\text{l}$

#### 2.4.3.2 Transfektion

Die Konstrukt-DNA und der pRL-CMV Vektor wurden anhand der Lipotransfektion der *Fast-Forward* Transfektion (*Attractene Transfection Reagent*, QIAGEN GmbH; Hilden, D) in HEK-293T Zellen kotransfiziert. Hierbei enthält die Konstrukt-DNA ein Gen, das eine Firefly-Luciferase (F-Luc) kodiert, während der pRL-CMV Vektor als interne Kontrolle ein Gen besitzt, das eine Renilla-Luciferase (R-Luc) kodiert (s. 2.5.1). Nach der Kotransfektion wurden die Proben für insgesamt 48 h bei 37 °C inkubiert. Daraufhin konnte das Luciferase Assay durchgeführt werden (Abb. 8).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der zeitlichen Abfolge der Transfektion vor der Durchführung des Luciferase Assays.** Die Konstrukt-DNA enthält ein Gen, das eine Firefly-Luciferase (F-Luc) kodiert, während der pRL-CMV Vektor ein Gen besitzt, das eine Renilla-Luciferase (R-Luc) kodiert. Der pRL-CMV Vektor wird als interne Kontrolle benutzt. Die Konstrukt-DNA und der pRL-CMV Vektor wurden via *Fast-Forward* Transfektion in HEK-293T Zellen kotransfiziert. Nach einer Inkubation von 48 h wurde das Luciferase Assay durchgeführt.

#### Transfektion in einer 96-Well-Platte

Es wurden Transfektionsansätze hergestellt, die stets die Volumina für alle Test-*Wells* plus einem zusätzlichen *Well* enthielten. Die folgenden Angaben beziehen sich auf die Mengen in einem *Well* (Tab. 25). Pro *Well* wurden in einem Verhältnis von 40:1 200 ng Konstrukt-DNA und 5 ng pRL-CMV DNA mit Opti-MEM auf ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l aufgefüllt und mit 0,75  $\mu$ l Attractene Reagenz pro *Well* versehen. Die Transfektionsansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden pro *Well* je 40000 Zellen in 100  $\mu$ l der zuvor gewonnenen Zellsuspension (s. 2.4.3.1) in die 96-*Well*-Platte (Nunc F96 MicroWell Polystyrolplatte, weiß; Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D) ausplattiert. Nach der Inkubation wurden je 50  $\mu$ l der Transfektionsansätze tröpfchenweise in die entsprechenden *Wells* auf die vorgelegte Zellsuspension pipettiert. Somit betrug das Gesamtvolumen in einem *Well* 150  $\mu$ l. Es wurden stets mehrere technische Replikate (3-6) angesetzt. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Positionen der einzelnen Proben auf einer Platte von Experiment zu Experiment variiert wurden, um möglichen Effekten vorzubeugen, die nur durch eine bestimmte Lokalisation der Probe auf der Platte zustande kamen. Dabei wurden Grenz*wells* einer Platte

nie mit Proben versehen. Unbeladene, an Testwells grenzende Wells wurden mit 200 µl (96-Well-Platte) DPBS als Verdunstungsschutz befüllt. Die Platte wurde in Achtertouren geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten, und daraufhin für 48 h bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Nach 48 h konnte das Luciferase Assay durchgeführt werden.

**Tabelle 25: Transfektion von HEK-293T Zellen in einer 96-Well-Platte mit Berücksichtigung der Angaben im Fast-Forward Protokoll (Attractene Transfection Reagent, QIAGEN GmbH).** Die Angaben beziehen sich auf die Mengen in einem Well. Angegeben sind das Verhältnis von Firefly-Luciferase (F-Luc) zu Renilla-Luciferase (R-Luc), die Menge an Konstrukt-DNA und pRL-CMV DNA, das Volumen des Transfektionsansatzes und des eingesetzten Attractene Reagenz, das Volumen der Zellsuspension (mit enthaltener Zellzahl) und das Gesamtvolumen pro Well.

<b>Transfektion in einer 96-Well-Platte (Angaben pro Well)</b>	
<b>Verhältnis F-Luc : R-Luc</b>	40:1
<b>Konstrukt-DNA Menge</b>	200 ng
<b>pRL-CMV DNA Menge</b>	5 ng
<b>Volumen des Transfektionsansatzes</b>	50 µl
<b>Attractene Reagenz</b>	0,75 µl
<b>Volumen der Zellsuspension (mit enthaltener Zellzahl)</b>	100 µl (mit 40000 Zellen)
<b>Gesamtvolumen</b>	150 µl

#### Transfektion in einer 384-Well-Platte

Da es im Handbuch des *Attractene Transfection Reagents* keine Angaben für das Kulturformat einer 384-Well-Platte gab, war eine Etablierung der Transfektionsmethode unabdingbar (Tab. 26). Auch hier beziehen sich die folgenden Angaben auf die Mengen in einem Well.

Die eingesetzte DNA-Menge bei der Kotransfektion der Konstrukte variierte je nachdem, welche Konstrukt-DNA verwendet wurde. Hierbei unterschieden sich Nicht-PEST-Konstrukte von PEST-Konstrukten, die im Rahmen dieser Arbeit durch Einklonierung einer PEST-Sequenz für den schnelleren Abbau der Firefly-Luciferase hergestellt wurden. Auf die Klonierung der Konstrukte und die Bedeutung der PEST-Sequenz wird an anderer Stelle ausführlich eingegangen (s. 3.3). Für eine Transfektion der Konstrukte ohne PEST-Sequenz wurden pro Well 40 ng der Konstrukt-DNA und 1 ng der pRL-CMV DNA (Verhältnis 40:1)

eingesetzt, während bei Verwendung der PEST-Konstrukte ein Verhältnis von 8:1 durch Einsatz von 1000 ng Konstrukt-DNA und 125 ng pRL-CMV DNA pro *Well* gewährleistet wurde. Die DNA wurde mit Opti-MEM auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt und mit 0,15 µl Attractene Reagenz pro *Well* versehen. Die Transfektionsansätze wurden für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Etablierung des Luciferase Assays wurde die Zellsuspension bei Verwendung von 384-*Well*-Platten nicht vor dem Transfektionsansatz in die Zellplatte ausplattiert, sondern die Zellsuspension und der Transfektionsansatz wurden bereits vor der Zugabe in die Platte gemeinsam gemischt. Pro *Well* wurden deshalb 10000 Zellen in einer Zellsuspension von 30 µl (s. 2.4.3.1) mit 10 µl des Transfektionsansatzes gemischt, um dann in nur einem Schritt das Gesamtvolumen pro *Well* von 40 µl mithilfe einer Repetierpipette in die 384-*Well*-Platte (*Corning 384-well Low Flange White Flat Bottom Polystyrene TC-treated Microplates*; Corning B.V. Life Sciences; Amsterdam, Niederlande) pipettieren zu können. Auch hier wurden stets mehrere technische Replikate (3-6) angesetzt und unbeladene, an Testwells grenzende Wells mit 50 µl DPBS als Verdunstungsschutz befüllt. Nachdem die Platte in Achtertouren geschwenkt wurde, wurde sie für 48 h bei 37 °C in den Inkubator gestellt. Danach konnte ein Luciferase Assay durchgeführt werden.

**Tabelle 26: Transfektion von HEK-293T Zellen in einer 384-Well-Platte.** Die Angaben beziehen sich auf die Mengen in einem *Well*. Das eingesetzte Verhältnis von Firefly-Luciferase (F-Luc) zu Renilla-Luciferase (R-Luc) sowie die Menge an Konstrukt-DNA und pRL-CMV DNA variierten je nach eingesetzter Konstrukt-DNA. Zum Einsatz kamen hierbei entweder PEST-Konstrukte, die durch Einklonierung einer PEST-Sequenz für den schnelleren Abbau der Firefly-Luciferase hergestellt wurden, oder Nicht-PEST-Konstrukte, die diese PEST-Sequenz nicht enthielten. Des Weiteren sind das Volumen des Transfektionsansatzes und des eingesetzten Attractene Reagenz, das Volumen der Zellsuspension (mit enthaltener Zellzahl) und das Gesamtvolumen pro *Well* angegeben.

<b>Transfektion in einer 384-Well-Platte (Angaben pro Well)</b>		
	<b>Nicht-PEST-Konstrukte</b>	<b>PEST-Konstrukte</b>
<b>Verhältnis F-Luc : R-Luc</b>	40:1	8:1
<b>Konstrukt-DNA Menge</b>	40 ng	1000 ng
<b>pRL-CMV DNA Menge</b>	1 ng	125 ng
<b>Volumen des Transfektionsansatzes</b>	10 µl	10 µl

<b>Attractene Reagenz</b>	0,15 µl	0,15 µl
<b>Volumen der Zellsuspension (mit enthaltener Zellzahl)</b>	30 µl (mit 10000 Zellen)	30 µl (mit 10000 Zellen)
<b>Gesamtvolumen</b>	40 µl	40 µl

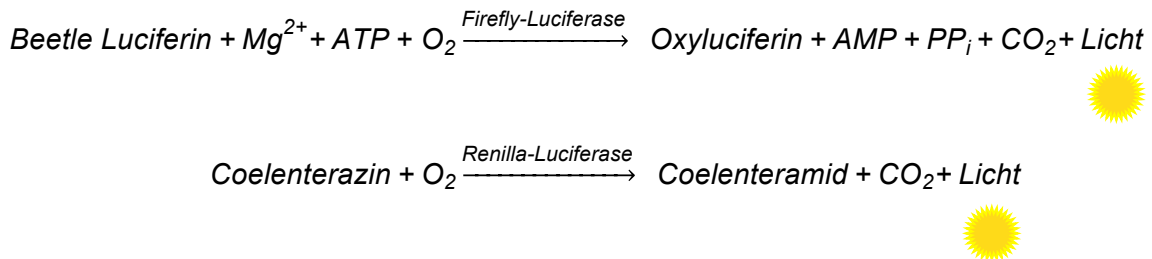
## **2.5 Luciferase Assay**

### **2.5.1 Allgemeines Prinzip des Luciferase Assays**

Bei dem *Dual-Glo Luciferase Assay System* von Promega (Promega GmbH; Walldorf, D) handelt es sich um ein Reporter-gen Assay, um die Aktivität eines Promotors beurteilen zu können (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Hierbei wurden die zu untersuchenden Promotorbereiche des *KPNA3* und *ATXN3* Promotors *upstream* der kodierenden Sequenz eines Reportergens kloniert, das die Firefly-Luciferase (F-Luc) des Glühwürmchens *Photinus pyralis* exprimiert. Die Reporter-genaktivität ist hierbei direkt proportional zur Transkriptionsaktivität. Somit konnte durch die im Luciferase Assay gemessene Luciferase-Aktivität auf die Aktivität des Promotors und so auf die Aktivität der Transkription des Gens geschlossen werden. Als interne Kontrolle wurde eine Plasmid-DNA mit dem Cytomegalie-Virus-(CMV) Promotor verwendet, die eine andere Luciferase konstitutiv exprimiert, nämlich die Renilla-Luciferase (R-Luc) der Seefeder *Renilla reniformis*. Diese interne Kontrolle dient dem teilweisen Ausgleich von Schwankungen in der Zellzahl, der Zellvitalität, der Transfektionseffizienz oder der Probenaufbereitung.

Sowohl die F-Luc mit einer absoluten Molekülmasse von 61 kDa als auch die 36 kDa große R-Luc sind monomere Proteine, die keine posttranslationalen Modifikationen für ihre Aktivität benötigen, sodass sie direkt nach der Translation als Reporter eingesetzt werden können (de Wet et al. 1985, Matthews et al. 1977, Wood et al. 1984). Die beiden Luciferasen haben sehr unterschiedliche Enzymstrukturen und Substrate. Die F-Luc katalysiert die Oxidation ihres Substrates Beetle Luciferin in Oxyluciferin in der Anwesenheit von  $Mg^{2+}$ , ATP und  $O_2$  (Abb. 9). Das emittierte Licht hat eine Wellenlänge von

560 nm. Die R-Luc ihrerseits führt zur Oxidation von Coelenterazin in Coelenteramid, wodurch Licht der Wellenlänge 482 nm emittiert wird (Abb. 9). Sowohl die F-Luc als auch die R-Luc sind in diesem System relativ stabil, da sie beide eine HWZ von ca. 2 h aufweisen (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15).



**Abbildung 9: Katalysierte biolumineszente Reaktionen der Firefly- und Renilla-Luciferase.** (Nach dem Technischen Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15).

### 2.5.2 Durchführung des Luciferase Assays

Das Luciferase Assay wurde mithilfe des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems* (Promega GmbH; Walldorf, D) durchgeführt (Abb. 10).

Zugabe von Dual-Glo Luciferase Reagenz

↓ Inkubation für 10 min bei RT.

1. Messung:  
Messung der Firefly-Lumineszenz



↓ Zugabe von Dual-Glo Stop&Glo Reagenz

↓ Inkubation für 10 min bei RT.

2. Messung:  
Messung der Renilla-Lumineszenz



**Abbildung 10: Zusammenfassung der wichtigsten Schritte bei der Durchführung des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems* von Promega.** RT: Raumtemperatur. (Nach dem Technischen Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15).

Das Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) wurde beim Öffnen des Kits nach Herstellerprotokoll angesetzt. Dabei wurde der Dual-Glo Luciferase Puffer zum Dual-Glo Luciferase Substrat gegeben. Daraufhin wurde das DLR aliquotiert (je 500 µl) und die Aliquots wurden bei -80 °C gelagert. Kurz vor Durchführung eines Luciferase Assays wurde das DLR im Wasserbad auf Raumtemperatur gebracht. Das DLR durfte unter keinen Umständen über die Raumtemperatur erhitzt werden. Vor der Verwendung war ein gründliches Mischen unabdingbar.

Das gesamte Assay wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, da die Firefly- und Renilla-Luciferase bei Temperaturen zwischen 20 und 25 °C ihre optimale Aktivität aufweisen (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Zunächst wurde die Zellkultur-Platte aus dem Inkubator genommen und die Zellen in Medium wurden auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wurde so viel Medium abpipettiert, dass in den *Wells* nur noch 50 µl (in 96-*Well*-Platte) bzw. 10 µl (in 384-*Well*-Platte) enthalten waren.

Als nächstes wurden im Verhältnis 1:1 pro *Well* 50 µl (in 96-*Well*-Platte) bzw. 10 µl (in 384-*Well*-Platte) des aufgetauten DLRs hinzugegeben, und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das DLR führte zu einer Zellyse und enthielt das Substrat für die Firefly-Luciferase (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Die Platte wurde bei 200 x g kurz anzentrifugiert, um Blasen zu entfernen. Daraufhin wurde die abgedeckte Platte 10 min lang bei Raumtemperatur auf einem Schüttelgerät (Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH; Schwabach, D) inkubiert, damit es zu einer kompletten Zellyse und Enzymäquibrierung kommen konnte. Nach der Inkubation wurde die Firefly-Lumineszenz im Luminometer Multilumatplus bestimmt. Dabei wurde die Software „WinGlow“ verwendet. Pro *Well* erfolgte eine Messung von 1 s.

Während der ersten Messung wurde das Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) angesetzt, indem das Dual-Glo Stop&Glo Substrat (gelagert bei -20 °C) im Verhältnis 1:100 im Dual-Glo Stop&Glo Puffer (gelagert bei Raumtemperatur) gelöst wurde. Nach der ersten Messung wurden in jedes *Well* 50 µl (in 96-*Well*-

Platte) bzw. 10 µl (in 384-Well-Platte) des DSRs zur Platte hinzugegeben, sodass das Volumen im Well insgesamt 150 µl (in 96-Well-Platte) bzw. 30 µl (in 384-Well-Platte) betrug. Das DSR setzte die Lumineszenz der Firefly-Reaktion um ein mindestens 10.000- Vielfaches herab und stellte das Substrat für die Renilla-Luciferase bereit (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Die Platte wurde wieder anzentrifugiert, und nach einer Inkubation von 10 min konnte die Renilla-Lumineszenz analog zur Firefly-Lumineszenz gemessen werden.

### 2.5.3 Auswertung des Luciferase Assays

Die Lichtemission der Firefly- bzw. Renilla-Lumineszenz wurde mithilfe des Luminometers in Relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen.

Pro Well wurde der Quotient aus Firefly- und Renilla-Luciferase-Aktivität berechnet, wodurch die Werte zur inneren Kontrolle normalisiert wurden. Es wurden mehrere technische Replikate (3-6) pro Konstrukt herangezogen und der Mittelwert aus den Quotienten gebildet. Diese Mittelwerte waren innerhalb eines Assays vergleichbar, und wurden als Relative Luciferase-Aktivität bezeichnet. Um mehrere Assays miteinander vergleichen zu können, wurde die sogenannte *Relative Response Ratio* (RRR) berechnet (Abb. 11).

$$\text{RRR} = \frac{(\text{jeweiliges Konstrukt} - \text{negative Kontrolle})}{(\text{positive Kontrolle} - \text{negative Kontrolle})}$$

**Abbildung 11: Berechnung der *Relative Response Ratio* (RRR), um mehrere Luciferase Assays miteinander vergleichen zu können.**

Da immer dasselbe Konstrukt als positive bzw. negative Kontrolle verwendet wurde, waren die Ergebnisse zwischen den Assays vergleichbar. Als Negativkontrolle wurde der Leervektor pGL3-Basic, als Positivkontrolle das pGL3-KPNA3-A Konstrukt verwendet.

Im Rahmen des Medikamenten-Screenings wurde eine andere Art der Normalisierung gewählt. Hier wurden die Ergebnisse der mit Wirkstoffen inkubierten Proben auf Kontrollwells normalisiert, die nur mit dem Lösungsmittel

DMSO (oder H<sub>2</sub>O) inkubiert worden waren (s. 2.6.3 für das genaue Vorgehen der Auswertung).

## 2.6 Medikamenten-Screening

### 2.6.1 Getestete Wirkstoffe und Konzentrationsbereiche

Insgesamt wurden elf unterschiedliche, bereits von der *Food and Drug Administration* (FDA; Silver Spring, Maryland, USA) zugelassene Wirkstoffe daraufhin getestet, ob diese eine Wirkung auf die *KPNA3* Promotoraktivität zeigten (Tab. 27).

**Tabelle 27: Auflistung der getesteten Wirkstoffe unter Angabe der molaren Masse, der Molarität der verwendeten Stammlösungen und der Lösungsmittel, in denen die Wirkstoffe gelöst wurden.** Angegeben sind auch die von Dr. Zijian Wang als optimal eingestufte Konzentrationen in einer CHO (*Chinese Hamster Ovary*)-Zellkultur (Wang 2015).

Wirkstoff	Molare Masse in g/ mol	Stamm-lösung	Verdünnung in	Optimale Konzentration in CHO-Zellkultur (Dr. Zijian Wang)
Divalproex Natrium	310,4	100 mM	DMSO	300 µM
Natriumbutyrat	110,1	52 mM	ddH <sub>2</sub> O	100 µM
Sorafenib Tosylate	464,8	40 mM	DMSO	100 µM
Benserazid HCl	293,7	10 mM	DMSO	10-100 µM
Artemether	298,4	20 mM	DMSO	1-100 µM
Clotrimazol	344,8	20 mM	DMSO	31 µM
Bleomycinsulfat	1512,6	10 mM	DMSO	10 µM
Furosemid	330,7	5 mM und 20 mM	DMSO	10 µM
Zolmitriptan	287,4	50 µM	DMSO	0,1 µM
Rizatriptan-benzoat	391,5	10 mM	DMSO	1-10 µM
Disulfiram	296,5	20 mM	DMSO	100 µM

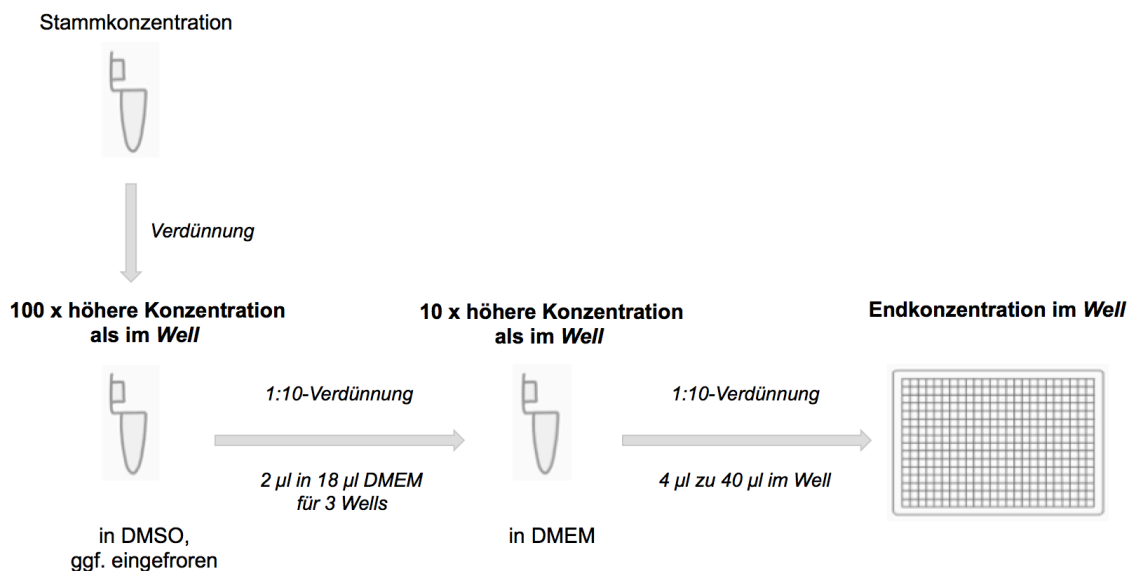
Die meisten Wirkstoffe befanden sich in Pulverform und wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht in DMSO oder ddH<sub>2</sub>O gelöst, wobei auch immer auf die Löslichkeitsgrenze der Wirkstoffe geachtet wurde. Die Wirkstoffe wurden in

DMSO oder ddH<sub>2</sub>O gelöst bei -20 °C gelagert. Zum Teil wurden auch bereits gelöste Wirkstoffe verwendet, die von Dr. Zijian Wang hergestellt wurden und bei -80 °C gelagert wurden.

Zunächst wurden Konzentrationsbereiche angeschaut, die in der Nähe der Konzentrationen lagen, die von Dr. Zijian Wang als optimale Konzentrationen in *Chinese Hamster Ovary*- Zellen benannt wurden (Tab. 27 und Wang 2015). Danach wurden auch größere Konzentrationsbereiche untersucht, um Dosis-Wirkungs-Kurven zu generieren. Hierbei wurde auf Konzentrationsangaben der Wirkstoffe zurückgegriffen, die zum Teil bereits in der Zellkultur anderer Studien eingesetzt worden waren, um möglichst wirksame Konzentrationen zu testen.

### 2.6.2 Verdünnung der Wirkstoffe

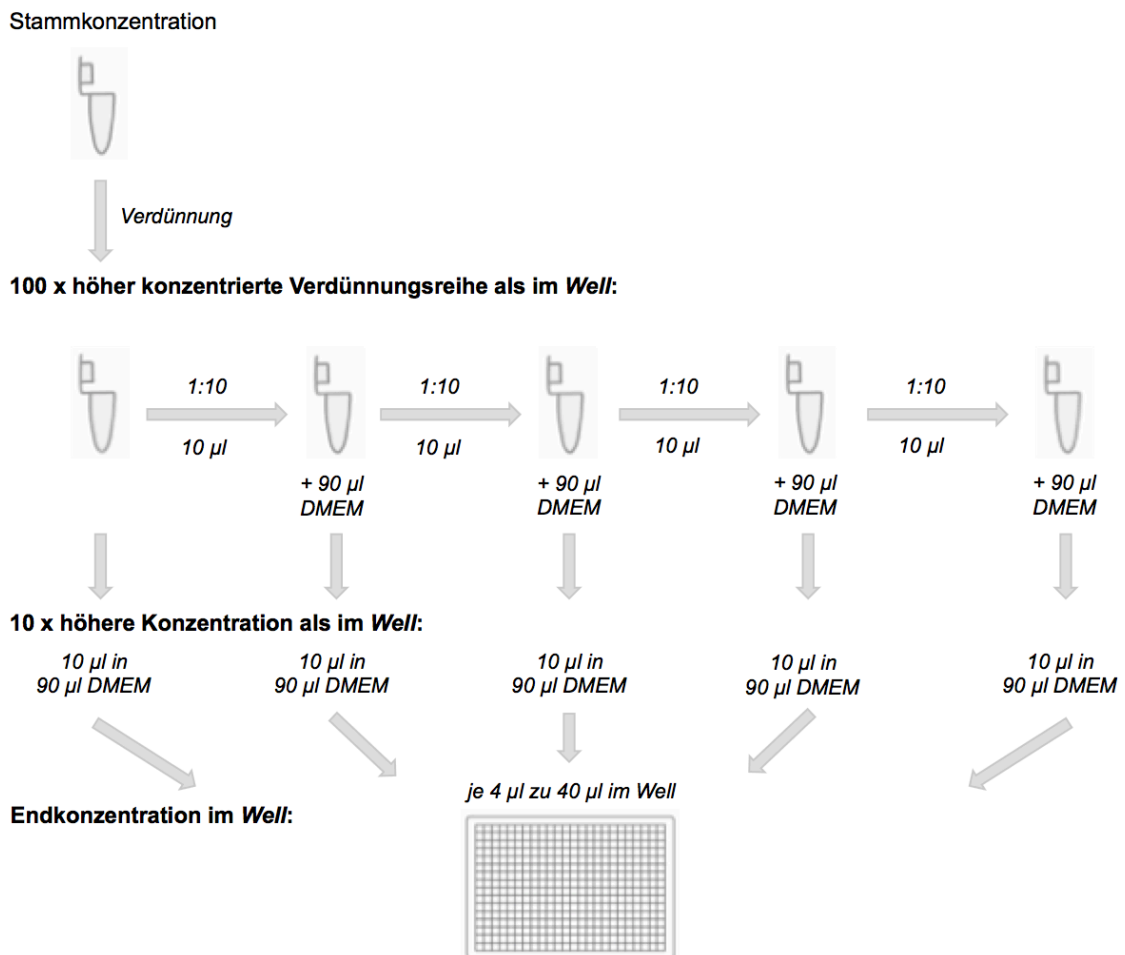
Im Rahmen der Etablierung des Medikamenten-Screenings wurden unterschiedliche Verdünnungen verwendet. Bei der ersten Verdünnungsmethode wurden zunächst aus Stammlösungen Verdünnungen hergestellt, die 100-fach so hoch konzentriert waren wie die Endkonzentration im *Well* sein sollte (Abb. 12).



**Abbildung 12: Erste Verdünnungsmethode der Wirkstoffe.** Schrittweise Verdünnung der Stammlösung eines Wirkstoffes auf die gewünschte Endkonzentration im *Well* der Kulturplatte.

Diese Stammlösungen wurden dann in DMSO verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Kurz vor dem Medikamenten-Screening wurden sie aufgetaut und in DMEM so verdünnt, dass eine 10-fach höher konzentrierte Verdünnung als die Endkonzentration entstand. Durch Zugabe von 4 µl Wirkstoff zu den 40 µl transfizierten Zellen im *Well* einer 384-*Well*-Platte, wurde eine beinahe 1:10-Verdünnung erreicht. Der Vorteil dieser Verdünnungsmethode war, dass die DMSO-Konzentration in jedem *Well* bei 0,4 µl lag und somit überall der Gehalt von DMSO 1 % betrug.

Um größere Konzentrationsbereiche zu testen, wurden Verdünnungsreihen für die schrittweise Verdünnung der Konzentrationen verwendet (Abb. 13).



**Abbildung 13: Zweite Verdünnungsmethode der Wirkstoffe.** Exemplarisches Beispiel des Prinzips einer angewendeten Verdünnungsreihe, um durch schrittweise Verdünnung der Stammlösung eines Wirkstoffes unterschiedliche Endkonzentrationen in den *Wells* der Kulturplatte zu erreichen.

Es wurde eine 100-fach höher konzentrierte Verdünnungsreihe als die Endkonzentrationen in den *Wells* durch sukzessive Verdünnung hergestellt. Diese Verdünnungen wurden dann noch weiter 1:10 verdünnt, um 10-fach höher konzentrierte Konzentrationen als in den *Wells* zu erreichen. Durch die Zugabe von 4 µl der Wirkstoffe zu den 40 µl Gesamtvolumen in den *Wells* wurde auch hier eine nahezu 1:10- Verdünnung vorgenommen, um die gewünschte Endkonzentration im *Well* zu erreichen. Bei dieser Verdünnungsmethode war somit die DMSO-Konzentration in jedem *Well* unterschiedlich. Die Erfahrung zeigte jedoch, dass leicht unterschiedliche Konzentrationen von DMSO in diesen Bereichen keine nennenswerten Abweichungen aufwiesen.

Bei der Zugabe von Wirkstoffen zu den transfizierten Zellen wurde darauf geachtet, dass die Pipettenspitze nie den Boden des *Wells* berührte, an dem die Zellen angeheftet waren. Das Medikament wurde bei der Zugabe zu den Zellen ein Mal sachte auf- und abpipettiert, um eine gute Durchmischung zu gewährleisten. Durch inverses Pipettieren bei der Zugabe des Wirkstoffes zu den Zellen konnten außerdem Ungenauigkeiten im Pipettieren etwas ausgeglichen werden.

Als Kontrolle wurden stets transfizierte Zellen nur mit dem Lösungsmittel der Wirkstoffe (DMSO oder ddH<sub>2</sub>O) inkubiert. Diese Kontrollen wurden zunächst auf die gleiche Art und Weise verdünnt wie die Wirkstoffe. Laut technischem Manual von Promega sollte DMSO allgemein nur geringe Auswirkungen auf das Gelingen des Assays haben. Da auch in unserer Arbeit mit der Zeit kein Unterschied bei den geringfügig unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen festgestellt werden konnte, wurde daraufhin nur noch eine DMSO-Kontrolle mit dem höchsten DMSO-Gehalt verwendet. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass der DMSO-Gehalt im Endvolumen nicht 1 % überstieg, da sich höhere Konzentrationen für Zellen bekanntlich als toxisch erweisen (Timm et al. 2013).

Die transfizierten Zellen wurden für 60 bzw. 90 min mit den Wirkstoffen inkubiert (s. 3.4.2). Nach der Inkubation konnte das Luciferase Assay durchgeführt werden (s. 2.5).

### **2.6.3 Auswertung des Medikamenten-Screenings**

Bei allen Rohdaten wurden die Quotienten aus der Firefly-Lumineszenz und der Renilla-Lumineszenz ermittelt, um eine Normalisierung gegen die interne Kontrolle der Renilla-Lumineszenz zu erhalten (s. 2.5.3).

Im Rahmen des Medikamenten-Screenings wurden diese Quotienten in einem nächsten Schritt durch den Mittelwert der Kontrollwells geteilt, die nur mit dem Lösungsmittel DMSO bzw. ddH<sub>2</sub>O inkubiert worden waren. Somit ergab sich eine Normalisierung auf DMSO bzw. ddH<sub>2</sub>O. Die Mittelwerte der DMSO- bzw. ddH<sub>2</sub>O- Proben wurden hierbei durch das Teilen durch sich selbst auf 1 gesetzt. Durch diese Normalisierung konnten nun die Mittelwerte aus den normalisierten Werten der technischen Replikate innerhalb verschiedener Assays verglichen werden.

Bei den Dosis-Wirkungs-Kurven wurde den Konzentrationen des Wirkstoffes die Relative Luciferase-Aktivität (RLA) gegenübergestellt, und die Werte mithilfe einer Kurve miteinander verbunden. Für die Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurde generell eine dekadische, logarithmische Skalierung gewählt.

## **2.7 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.7.1 Bradford-Assay**

#### **2.7.1.1 Durchführung**

Die Protein Konzentration wurde mithilfe der Bradford Methode (*Bio-Rad Protein Assay Kit II*; Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen, D) bestimmt. Hierbei wurde zunächst eine Eichgerade erstellt mit dem Standard *Bovines Serum Albumin* (BSA, Konz.: 1 µg/ µl) mit Konzentrationen von 0, 1, 2, 5, 10, 15 und 20 µg/ ml. Von den zu testenden Proben wurden jeweils 2 µl der Lysate (s. 2.4.2.2) verwendet (Tab. 28).

Je 100 µl der Ansätze wurden in Triplikaten in eine 96-Well-Platte (96 Well Polystyrol Zellkultur Microplatte, CELLSTAR, Greiner Bio-One GmbH; Frickenhausen, D) pipettiert, woraufhin die Extinktionen der Proben mit dem *Synergy HT* (BioTek Instruments Inc.; Bad Friedrichshall, D) gemessen wurden.

**Tabelle 28: Pipettierschema für den Bradford-Assay.** BSA: *Bovines Serum Albumin*. Das BSA wurde immer auf Eis gehalten, während das Bradford-Reagenz bei Raumtemperatur stehen gelassen werden konnte.

Konzentration BSA ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	dH <sub>2</sub> O in $\mu\text{l}$	BSA (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ )	Bradford-Reagenz in $\mu\text{l}$
0 (=leer)	800	-	200
1	799	1	200
2	798	2	200
5	795	5	200
10	790	10	200
15	785	15	200
20	780	20	200
<b>Proben</b>		<b>Lysat</b>	
alle	798	2	200

Durch die Ermittlung einer Standardkurve durch die bekannten BSA-Konzentrationen konnten den gemessenen Extinktionen Proteinkonzentrationen zugeordnet werden. Hierbei wurde zusätzlich der Hintergrund als Mittelwert der Leerwerte von allen gemessenen Extinktionen abgezogen und ein Verdünnungsfaktor von 0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  für die Bestimmung der Proteinkonzentrationen in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mitberücksichtigt.

### 2.7.1.2 Vorbereitung der Proben für die SDS-Page

Um die Proben für die SDS-Page vorzubereiten, wurde zunächst berechnet, wie viel  $\mu\text{l}$  der Lysate 17  $\mu\text{g}$  bzw. 20  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Probe enthielten. In dH<sub>2</sub>O gelöst sollte ein Volumen von 15  $\mu\text{l}$  (Lysat plus dH<sub>2</sub>O) erreicht werden.

Nach diesen Berechnungen wurde in frische Reaktionsgefäße die Menge an dH<sub>2</sub>O vorgelegt, die für einen 1,5- bzw. 2,5- fachen Ansatz benötigt wurde. 4X Bolt Lithiumdodecylsulfat (LDS) Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: B0007) wurde hinzugegeben, indem dieses in Bezug auf das Gesamtvolumen der Probe nur noch 1- fach vorlag (Verhältnis LDS zu Lysat entsprach 1:2,6). Durch die Anlagerung des LDS an das Protein, korreliert die Ladung mit der Proteingröße (Rehm und Letzel 2016). Daraufhin wurde 1M DTT (Dithiothreitol; Merck; Darmstadt, D; Kat. Nr.: 111474) zum Aufbrechen der Disulfidbrücken hinzupipettiert, sodass die Menge an DTT 10 % des Gesamtvolumens entsprach (Verhältnis DTT zu Lysat entsprach 1:6,5).

Erst zum Schluss wurden die anfangs errechneten Volumina der Lysate für einen 1,5- bzw. 2,5- fachen Ansatz hinzugegeben. Insgesamt ergaben sich so für das Beladen der SDS-Page pro Ansatz Proben mit einem Gesamtvolumen von 23 µl.

Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C und 700 rpm in einem Thermomixer compact (Eppendorf AG; Hamburg, D) hitzedenaturiert, um die Struktur der Proteine zu linearisieren. Die Proben wurden für 2 min auf Eis gestellt, dann für 10 s bei 25000 x g abzentrifugiert und bei -80 °C eingefroren.

### 2.7.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) wurden ein 6 %- iges Sammelgel und ein 8 %- iges Trenngel hergestellt (Tab. 29).

**Tabelle 29: Zusammensetzung des Sammelgels und Trenngels für die SDS-Page.** Es wurden ein 6 %-iges Sammelgel und ein 8 %-iges Trenngel hergestellt.

	<b>Sammelgel 6 %</b>	<b>Trenngel 8 %</b>
3,5X Bis-Tris Puffer	1,42 ml	1,42 ml
H <sub>2</sub> O	2,58 ml	2,24 ml
30 % Acrylamid	1 ml	1,34 ml
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	4 µl	4 µl
10 % APS (Ammoniumpersulfat)	30 µl	30 µl

Zunächst wurde das 8 %- ige Trenngel zusammenpipettiert und die Polymerisation mit TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumpersulfat) gestartet. Die Gellösung wurde in den Gelträger pipettiert, wobei die Oberfläche mit 100 %- igem Isopropanol geglättet wurde. Nachdem das Trenngel nach ca. 10 min auspolymerisiert war, wurde das Sammelgel zusammenpipettiert und ebenfalls in den Gelträger gegeben. Die Kammern wurden jeweils mit 700 ml eines 1X MOPS-Puffers befüllt, der mithilfe von dH<sub>2</sub>O aus einem 20X MOPS-Puffer hergestellt wurde.

Je 23 µl der Proben mit 17 bzw. 20 µg Gesamtprotein wurden auf das Gel aufgetragen. Als Standard wurden am linken Rand des Gels 3 µl und am

rechten Rand 1,5 µl des *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (Bio-Rad Laboratories GmbH; Feldkirchen, D; Kat. Nr.: 1610374S) aufgetragen, um später beide Seiten voneinander unterscheiden zu können. Die Proteine wurden auf dem 8 %- igem Bis-Tris Gel bei 80 V für ca. 1,5 bis 2 h aufgetrennt, wobei die LDS-Protein-Komplexe in Richtung Anode (Plus-Pol) wanderten.

### 2.7.3 Western-Blot

#### 2.7.3.1 Transfer

Nachdem die Proteine durch die SDS-Page aufgetrennt worden waren, wurde ein Transfer, auch Blotting genannt, von dem Gel auf eine Membran durchgeführt (Abb. 14). Hierzu wurde eine Nitrocellulose (NC) Membran (Premium 0,2 µM Porengröße, Amersham Protran, 8,5 cm x 7,5 cm; Cytiva Europe GmbH; Freiburg, D) verwendet. Das Filterpapier (Whatman, 0,8 mm stark; Cytiva Europe GmbH; Freiburg, D) wurde auf eine Größe von 10 cm x 10 cm zugeschnitten.



**Abbildung 14: Aufbau des Transfers im Rahmen des Western-Blots.** Der Pluspol stellt die Anode dar, der Minuspol die Kathode. Der türkisene Pfeil zeigt die Richtung des Transfers der Proteine vom Gel auf die Membran.

Zum Befüllen einer Kammer wurde so viel dH<sub>2</sub>O zum 20X Transferpuffer gegeben, dass dieser nur noch einfach vorlag. Der Transfer wurde bei 4 °C für 90 min bei 80 V durchgeführt.

### 2.7.3.2 Färbung der Membran

Vor der Membrandetektion wurden mithilfe der Ponceau S- Färbung (*Ponceau S- staining solution* (Merck; Darmstadt, D), 5 % Essigsäure, 0,1 % Ponceau S) oder der SYPRO Ruby- Färbung (*SYPRO Ruby Protein Blot Stain*; Molecular Probes; Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D; Kat. Nr.: S-11791) der Lauf der Proben auf dem Gel und der Transfer vom Gel auf die Membran beurteilt.

Für die Ponceau-Färbung wurde die Membran zunächst in Ponceau angefärbt, und danach in dH<sub>2</sub>O hin- und hergeschwenkt. Mit Ponceau werden die Proteinbanden angefärbt, wobei die Detektionsgrenze bei 50 ng/ Bande liegt (Rehm und Letzel 2016). Nach der Beurteilung wurde die Membran mit TBS abgewaschen.

Im Gegensatz zu der Ponceau S- Färbung kann die SYPRO Ruby- Färbung quantifiziert werden. Die Färbung wurde anhand des Herstellerprotokolls (Stand: 05/02) durchgeführt. Bei Schritt 1.3 des Protokolls wurden 4 ml *SYPRO Ruby Protein Blot Stain* verwendet. Ab hier wurde das Zentrifugenröhrchen mit einem Lichtschutz versehen. Bei Schritt 1.4 wurde die Membran 5 Mal für je 2 min mit dH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Membran wurde daraufhin im *LI-COR Odyssey Fc Imaging System* (LI-COR Biotechnology GmbH; Bad Homburg, D) für 2 min bei 600 nm und für je 30 s bei 700 und 800 nm detektiert. Das *SYPRO Ruby Protein Blot Stain* hatte ein Emissionsmaximum bei 680 nm (Herstellerprotokoll).

### 2.7.3.3 Blockieren der Membran, Antikörperzugabe und Detektion

Die Membran wurde für 1 h in 5 % BSA-Lösung (0,5 g BSA in 10 ml TBS-Puffer) bei Raumtemperatur geblockt. Daraufhin wurde das BSA entfernt, und die Membran 2 Mal für je 5 min mit 1X TBST gewaschen.

Zunächst wurde als primärer Antikörper (AK) ein Anti-Luciferase-AK (Sigma-Aldrich; Darmstadt, D) auf die Membran gegeben, der gegen die Firefly-Luciferase gerichtet ist. Hierbei wurde der Antikörper 1:2000 verdünnt (2,5 µl in 5 ml TBST). Außerdem wurde das bakterizide Natriumazid (NaN<sub>3</sub>) in einer Endkonzentration von 0,02 % hinzugegeben. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C mit dem AK inkubiert. Der AK wurde nach der Inkubation entfernt und es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit je 5 ml 1X TBST für je 5

min. Daraufhin wurde der sekundäre AK Anti-Kaninchen-IgG, konjugiert an IRDye 800CW (1:10000 in TBST; LI-COR Biotechnology GmbH; Bad, Homburg, D), auf die Membran gegeben, und für 1 bis 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem gleichen, vorherigen, dreimaligen Waschvorgang wurde die Membran im *LI-COR Odyssey Fc Imaging System* analysiert (30 s bei 600 nm, 30 s bei 700 nm und 2 min bei 800 nm; LI-COR Biotechnology GmbH; Bad, Homburg, D). Nach der Analyse folgten 2 Waschschritte mit TBST.

Als Ladekontrollen wurden GAPDH (1:2500 in TBST; Santa Cruz Biotechnology; Heidelberg, D),  $\alpha$ -Tubulin (1:5000 in TBST; Calbiochem; Merck; Darmstadt, D) oder  $\beta$ -Aktin (1:5000 in TBST; Sigma-Aldrich; Darmstadt, D) verwendet. Vorgegangen wurde wie oben beschrieben, wobei als primärer AK die jeweilige Ladekontrolle und als sekundärer AK ein Anti-Maus-IgG AK, konjugiert an IRDye 680LT (1:10000 in TBST; LI-COR Biotechnology GmbH; Bad, Homburg, D), verwendet wurden. Vor der Anwendung einer neuen Ladekontrolle wurde die Membran mit 10 ml *Stripping* Puffer für 10 min gestrippt und nach 2 Waschgängen mit TBST à 5 min, für 5 min mit TBS gewaschen. Danach wurde die Membran erneut mit BSA blockiert.

Nach den Detektionen wurden die Membranen noch 2 Mal für je 5 min mit TBST gewaschen und daraufhin in einem Zentrifugenröhrchen ohne Puffer bei 4 °C gelagert.

### **2.8 Statistik**

Die Werte aus mehreren Experimenten wurden stets als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde mithilfe von Graphpad Prism (GraphPad Prism Software Software Inc.; San Diego, California, USA) und Microsoft Excel (Microsoft Corporation; Seattle, Washington, USA) bestimmt.

Beim Vergleich zweier Stichproben miteinander wurden bei normalverteilten Werten der Zweistichproben-t-Test bzw. bei nicht-normalverteilten Werten der nicht-parametrische Mann Whitney U-Test verwendet. Mit dem Einstichproben-t-Test konnten Werte mit Bezug auf einen fixen, normierten Wert (hier auf 1

normierte Kontrollen) analysiert werden. Beim Vergleich mehrerer Stichproben untereinander wurde bei normalverteilten Werten eine Einfaktorielle ANOVA gefolgt von einem Tukey's Post-hoc-Test durchgeführt. Als nicht-parametrisches Korrelat der Einfaktoriellen ANOVA wurde ein Kruskal-Wallis-Test mit anschließendem Dunn's Post-hoc-Test eingesetzt.

Das Signifikanzniveau wurde mit  $\alpha = 0,05$  festgesetzt. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde das Ergebnis als statistisch signifikant gewertet. Die Signifikanzen wurden anhand gängiger Standards mithilfe von einem oder mehr Asterisken gekennzeichnet: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ), \*\*\*\* ( $p < 0,0001$ ).

### **3. Ergebnisse**

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 ist eine Polyglutaminerkrankung, bei der eine CAG-Repeat-Expansion im kodierenden Bereich des *ATXN3* Gens zu einer verlängerten polyQ-Region im Ataxin-3 Protein führt. Die Expansion des polyQ-Bereiches fördert die Bildung von Aggregaten, die man bei Erkrankten vor allem im Zellkern beobachtet. Hierbei wurde bereits in vorherigen Studien gezeigt, dass das Transportprotein KPNA3 in der Pathogenese der SCA3 eine zentrale Rolle zu spielen scheint, indem es das pathogene Ataxin-3 aus dem Zytoplasma in den Zellkern befördern kann (Sowa et al. 2018). Sowa et al. konnten zeigen, dass die Herunterregulierung von *KPNA3* in *Drosophila*- und Mausmodellen von SCA3 zu einer verminderten Aggregationsbildung des expandierten Ataxin-3 im Zellkern führte, was wiederum zu einer Abmilderung des SCA3-Phänotyps beitrug (Sowa et al. 2018). Aufgrund dieser Beobachtung benannten Sowa et al. das Transportprotein KPNA3 als vielversprechenden Ansatzpunkt für eine bisher nicht vorhandene, gerichtete Therapie der SCA3. Gegenstand dieser Arbeit war in diesem Zusammenhang die nähere Betrachtung des *KPNA3* Promotors, der einen direkten Einfluss auf die Expression des zugehörigen *KPNA3* Gens hat. Hierzu sollte ein Assay etabliert und validiert werden, mit dessen Hilfe die *KPNA3* Promotoraktivität zuverlässig gemessen werden kann. In einem weiteren Schritt sollten elf vielversprechende Wirkstoffe dahingehend untersucht werden, ob sie Auswirkungen auf die *KPNA3* Promotoraktivität erzielen konnten.

#### **3.1 Durch die Etablierung und Optimierung des Luciferase Assays als Reporter-gen Assay wird die Promotoraktivität von *KPNA3* zuverlässig messbar.**

Um die Aktivität des *KPNA3* Promotors analysieren zu können, wurde ein *in vitro* Reporter-gen Assay in Form des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems* (Promega) verwendet. Hierbei war es notwendig, das Assay schrittweise zu etablieren. Zahlreiche Parameter wurden vor diesem Hintergrund sukzessive angepasst, um optimale Untersuchungsbedingungen herzustellen (Abb. 15).

### Etablierung und Optimierung des Luciferase Assays

#### Optimierung:

Überführung des Assays von einer 96-Well-Platte in eine 384-Well-Platte (s. 3.1.1.5)

Verwendete Zellen (s. 3.1.2.1)  
Variation der Zellzahl (s. 3.1.2.2)  
Verwendung von Zellen in Suspension vs. vorherige Pelletierung der Zellen (s. 3.1.2.3)

Variation des Verhältnisses von F-Luc zu R-Luc (s. 3.1.3.1)  
Untersuchung der Reinheit des pRL-CMV Vektors (s. 3.1.3.2)

Zellen ausplattieren vs. Zellen und Transfektionsansatz mischen (s. 3.1.2.4)

#### Zellkultur:

↓

Zellen ernten

↓

Transfektion: DNA mit Transfektionsreagenz mischen

und

auf Zellen geben

↓

Inkubation

↓

Medikamentenzugabe

#### Luciferase Assay:

2. Messung: Messung der Renilla-Lumineszenz

Zugabe von Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR)

1. Messung: Messung der Firefly-Lumineszenz

Zugabe von Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR)

↑

↑

↑

Variation der Inkubationszeiten mit dem DSR (s. 3.1.3.3)

Reduzierung der Menge des DSR (s. 3.1.4.1)

Reduzierung der Menge des DLR (s. 3.1.4.1)

Variation der Inkubationszeit (s. 3.4.2)

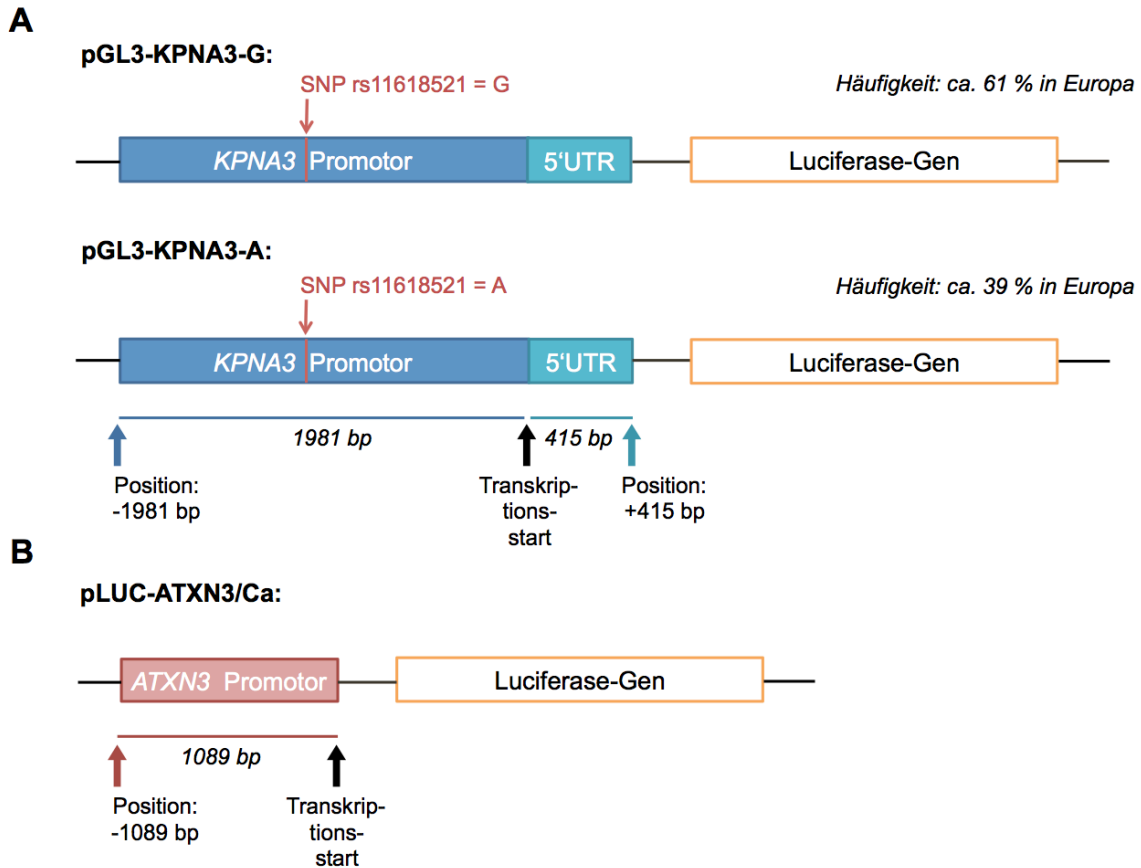
Variation der Verdünnungsmethoden (s. 2.6.2)

**Abbildung 15: Flussschema der einzelnen Methoden bei der Durchführung eines Luciferase Assays mit genauer Angabe der optimierten Parameter (in grün) im Rahmen der Etablierung.** In Klammern sind die Unterkapitel angegeben, in denen die jeweiligen Optimierungen näher erläutert werden. F-Luc: Firefly-Luciferase. R-Luc: Renilla-Luciferase. DLR: Dual-Glo Luciferase Reagenz. DSR: Dual-Glo Stop&Glo Reagenz.

#### 3.1.1 Überblick über die verwendeten Konstrukte

Als Konstrukt-DNA mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors (s. 3.2 für Einzelheiten) wurden die Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A verwendet, die sich nur in einem SNP (SNP rs11618521) unterscheiden (Abb. 16 A). Während das häufigere Konstrukt pGL3-KPNA3-G (ca. 61 % in Europa (Sherry et al. 2001)) ein Guanin (G) an dieser Stelle trägt, weist das pGL3-KPNA3-A ein Adenin (A) auf. Sowohl das pGL3-KPNA3-G als auch das pGL3-KPNA3-A Konstrukt enthalten die letzten 1981 bp am 3' Ende des *KPNA3* Promotors und die ersten 415 bp des Exons 1 des *KPNA3* Gens, die die 5' UTR

bilden (Wanner 2021). Anstelle des *KPNA3* Gens ist in beiden Genen ein Gen eingefügt, das für eine Firefly-Luciferase kodiert.



**Abbildung 16: Vereinfachtes Schema der verwendeten Konstrukte.** Die Angaben der Positionen sind auf den Transkriptionsstart bezogen, der bei +1 bp liegt. **A)** Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors. pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A unterscheiden sich nur in dem SNP rs11618521 (dunkelrot markiert): Das häufigere Konstrukt pGL3-KPNA3-G (ca. 61 % in Europa (Sherry et al. 2001)) hat ein Guanin, das pGL3-KPNA3-A Konstrukt ein Adenin an dieser Stelle. Beide Konstrukte enthalten die letzten 1981 bp am 3' Ende des *KPNA3* Promotors sowie die ersten 415 bp des Exons 1 des *KPNA3* Gens, die die 5' UTR bilden (Wanner 2021). Anstelle des *KPNA3* Gens ist in beiden Konstrukten ein Gen eingefügt, das für eine Luciferase kodiert. **B)** Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors (WT Sequenz). Das *ATXN3* Promotorfragment enthält die ersten 1089 bp des *ATXN3* Promotors *upstream* des Transkriptionsstarts (Schmitt et al. 2003). Auch hier ist das *ATXN3* Gen durch ein Gen ersetzt, das für eine Luciferase kodiert.

Der Leervektor pGL3-Basic (Promega GmbH; Walldorf, D) enthält nur die Firefly-Luciferase, aber keinen Promotor. Mit diesem Vektor konnte die Luciferase-Aktivität ohne Promotor bestimmt werden, da auch ohne Promotor noch minimale Aktivität vorhanden ist.

Um Effekte zu beobachten, die spezifisch für den *KPNA3* Promotor sind und nicht generell auf Promotoren zutreffen, wurde als Kontrolle das Konstrukt pLUC-ATXN3/Ca mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors gewählt (Abb. 16 B). Das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt wurde von L. Dengler kloniert und wurde als Konstrukt mit dem *ATXN3* Promotor deshalb für diese Arbeit gewählt, da es die Wildtyp-Variante darstellt. Das *ATXN3* Promotorfragment enthält hierbei die ersten 1089 bp des *ATXN3* Promotors *upstream* des Transkriptionsstarts (Schmitt et al. 2003). Auch hier ist das *ATXN3* Gen durch ein Gen ersetzt, das für eine Firefly-Luciferase kodiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden außerdem sogenannte PEST-Konstrukte eingesetzt, die durch Einfügen einer PEST-Sequenz in das pGL3-KPNA3-G und pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt kloniert wurden, um die HWZ der Luciferase zu senken. Auf die genaue Klonierung und die Bedeutung der pGL3-KPNA3-G-PEST und pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukte wird an anderer Stelle ausführlich eingegangen (s. 3.3).

#### **3.1.2 Variationen in der Zellkultur**

##### **3.1.2.1 Verwendete Zellen**

Um die Durchführung mehrerer Experimente an aufeinanderfolgenden Tagen gewährleisten zu können, wurden unterschiedliche Kulturflaschen mit HEK-293T Zellen verwendet, die alle unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Zellen ähnlich oft subkultiviert wurden, damit sich die Anzahl der Zellpassagen ähnelten.

Auffällig war, dass die Verwendung von HEK-293 Zellen anstelle der HEK-293T Zellen zu deutlich verminderten absoluten Werten der Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und Renilla-Lumineszenz (R-Lum) führte. Während bei HEK-293T Zellen die Rohwerte für die R-Lum als interne Kontrolle in Kontrollwells meistens um die 15000 bis 20000 RLU betragen, wurden bei der Verwendung von HEK-293 Zellen unter gleichen Versuchsbedingungen nur um die 3000 bis 4000 RLU gemessen (Tab. 30). Bei der F-Lum Messung zeigten sich für beide Zellarten noch größere Unterschiede, sodass der gemessene Mittelwert des Quotienten

aus F-Lum und der internen Kontrolle R-Lum bei Verwendung von HEK-293T Zellen das Vierfache des Verhältnisses von F-Lum zu R-Lum bei Verwendung von HEK-293 Zellen betrug. Aus diesem Grund wurden nur HEK-293T Zellen für die Reproduzierbarkeit der Luciferase Assays in allen hier dargestellten Ergebnissen verwendet.

**Tabelle 30: Gegenüberstellender Vergleich von repräsentativen, gemessenen Rohdaten für die Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und Renilla Lumineszenz (R-Lum) (in Relativer Lichteinheit (RLU)) bei Kotransfektion der Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pRL-CMV in entweder HEK-293T Zellen oder HEK-293 Zellen.** Erhobene Rohdaten sind in technischen Triplikaten angegeben (1, 2, 3). Die hier gezeigten Werte entsprechen den Lumineszenzen von Kontrollwells im Rahmen des Medikamenten-Screenings, bei denen die Zellen für 1 h mit 1 % DMSO inkubiert wurden. Für jedes Triplikat wurde der Quotient F-Lum / R-Lum berechnet, durch den die F-Lum auf die interne Kontrolle der R-Lum normalisiert wurde. Aus den drei Quotienten F-Lum / R-Lum der drei technischen Replikate wurde ein Mittelwert mit Standardfehler (SEM) berechnet. Auffallend ist, dass bei Verwendung von HEK-293T Zellen ein vierfach höheres Verhältnis der F-Lum zur R-Lum gemessen wurde als bei Verwendung von HEK-293 Zellen.

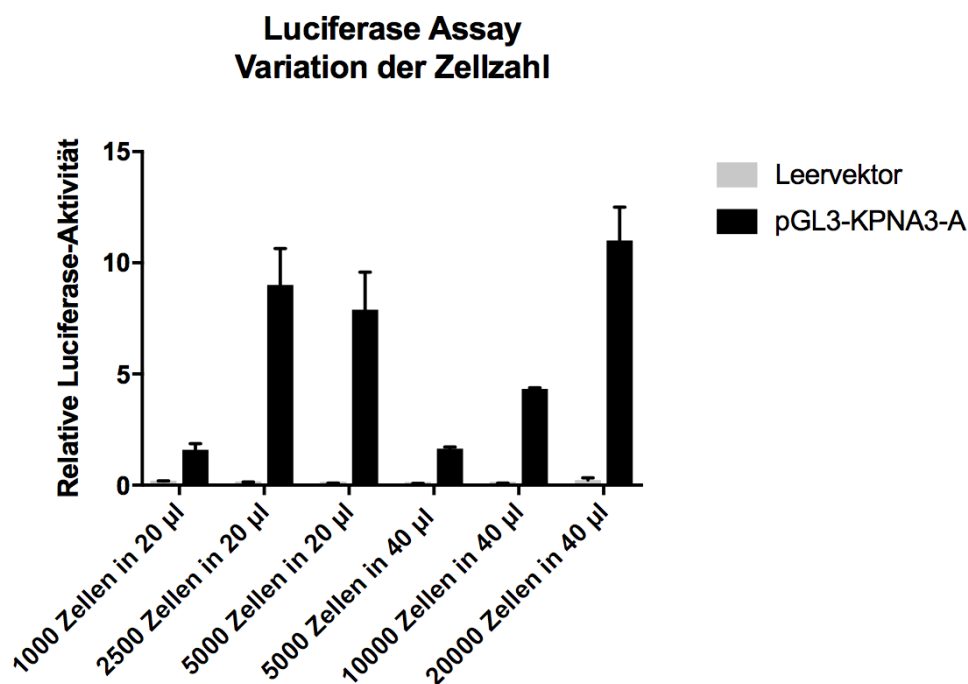
		Rohdaten F-Lum (in RLU)	Rohdaten R-Lum (in RLU)	Quotient F-Lum / R-Lum	Mittelwert mit SEM
<b>Kotransfektion in HEK-293T Zellen</b>	1	15632	16274	0,961	} Mittelwert: 1,01 SEM: 0,049
	2	15881	16421	0,967	
	3	15988	14395	1,111	
<b>Kotransfektion in HEK-293 Zellen</b>	1	1026	3727	0,275	} Mittelwert: 0,25 SEM: 0,013
	2	838	3610	0,232	
	3	902	3699	0,244	

### 3.1.2.2 Variation der Zellzahl in einem Well der Kulturplatte

Um im Rahmen des Medikamenten-Screenings größere Bandbreiten an Konzentrationen und Wirkstoffen schneller testen zu können, wurde das Luciferase Assay von einer 96-Well-Platte in eine 384-Well-Platte überführt. Aufgrund der geringeren Wachstumsfläche für die Zellen in den einzelnen Wells einer 384-Well-Platte musste die eingesetzte Zellzahl angepasst werden. Um zu untersuchen, bei welcher Zellzahl man die zuverlässigsten Ergebnisse erzielen konnte, wurden unterschiedliche Zellzahlen in unterschiedlichen Volumina gegenüberstellend verglichen (Abb. 17). Hierbei wurden in einer 384-Well-Platte Luciferase Assays mit 1000, 2500 und 5000 Zellen in 20 µl Gesamt-

volumen pro *Well* sowie 5000, 10000 und 20000 Zellen in 40  $\mu$ l Gesamtvolumen pro *Well* durchgeführt.

Der pRL-CMV Vektor als interne Kontrolle und entweder der Leervektor pGL3-Basic oder das pGL3-KPNA3-A Konstrukt wurden in HEK-293T Zellen kotransfiziert. Bei der Verwendung von insgesamt 20  $\mu$ l Gesamtvolumen (10  $\mu$ l Zellsuspension und 10  $\mu$ l Transfektionsansatz) waren die gemessenen absoluten Werte zu gering, als dass man sie für ein gut funktionierendes Assay einsetzen könnte. Da die Relative Luciferase-Aktivität bei 5000 Zellen in 40  $\mu$ l nur sehr gering ausfiel und bei 20000 Zellen in 40  $\mu$ l eine sehr hohe Schwankungsbreite beobachtet wurde, erzielte die Verwendung von 10000 Zellen in 40  $\mu$ l Gesamtvolumen die besten und zuverlässigsten Ergebnisse. Somit wurden in allen folgenden Experimenten 10000 Zellen pro *Well* in 30  $\mu$ l Zellsuspension und 10  $\mu$ l Transfektionsansatz eingesetzt.



**Abbildung 17: Luciferase Assay, bei dem eine Variation der Zellzahl im Rahmen der Etablierung vorgenommen wurde.** Von Interesse war die Bestimmung einer Zellzahl, durch die zuverlässige Ergebnisse bei der Durchführung von Luciferase Assays in 384-*Well*-Platten gewährleistet werden konnten. HEK-293T Zellen wurden mit dem Leervektor oder dem pGL3-KPNA3-A Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors und SNP= A) und mit dem pRL-CMV Vektor in einem Verhältnis von 40:1 kotransfiziert. Die Verwendung von insgesamt 20  $\mu$ l Gesamtvolumen (10  $\mu$ l Zellsuspension und 10  $\mu$ l Transfektionsansatz) zeigte in der Messung zu geringe absolute Werte. Bei 5000 Zellen in 40  $\mu$ l fiel die Relative Luciferase-Aktivität nur sehr

gering aus. Bei 20000 Zellen in 40  $\mu$ l zeigten die Werte eine sehr hohe Schwankungsbreite. Die zuverlässigsten Ergebnisse wurden daher durch die Verwendung von 10000 Zellen in 40  $\mu$ l Gesamtvolumen erzielt, sodass diese Angaben für alle folgenden Experimente in 384-Well-Platten übernommen wurden. Technische Replikate = 3.

### 3.1.2.3 Verwendung von Zellen in Suspension vs. vorherige Pelletierung der Zellen

Nachdem die Zellen subkultiviert wurden, wurde im Rahmen der Etablierung des Luciferase Assays untersucht, ob es einen Unterschied machte, wenn die Zellen in der Zellsuspension direkt für die Transfektion verwendet wurden, oder wenn die Zellsuspension zuvor pelletiert wurde. Die Pelletierung soll in der Theorie dahingehend von Vorteil sein, als dass das für die Zellen schädliche Trypsin, das für die Loslösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche eingesetzt wird, im Medium verbleibt, während die Zellen das Pellet bilden (Schmitz 2011).

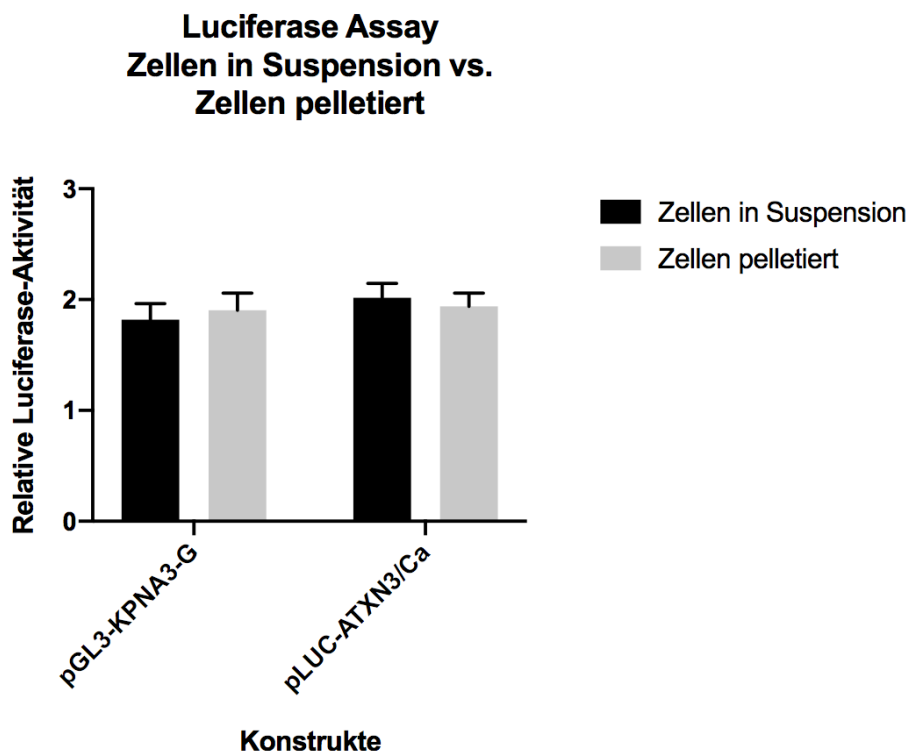


Abbildung 18: Gegenüberstellender Vergleich zweier Versuchsansätze bei der Durchführung von Luciferase Assays, bei denen die Zellen nach Subkultivierung zum einen direkt aus der Zellsuspension für die weitere Versuchsdurchführung eingesetzt wurden („Zellen in Suspension“), und zum anderen zunächst pelletiert wurden („Zellen pelletiert“). HEK-293T Zellen wurden mit dem pGL3-KPNA3-G

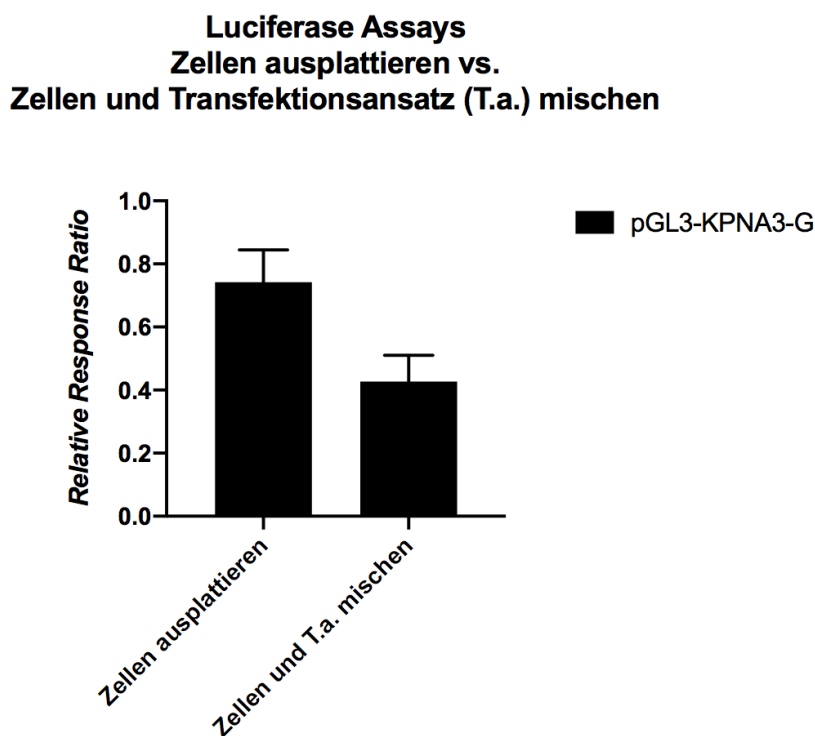
Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors) oder dem pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt (Fragment des *ATXN3* Promotors) und mit dem pRL-CMV Vektor in einem Verhältnis von 40:1 kotransfiziert. Durchführung in 384-Well-Platte. Es wurden keine relevanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den beiden Ansätzen beobachtet, sodass in allen folgenden Luciferase Assays auf eine Pelletierung der Zellsuspension in Hinblick auf eine möglichst schnelle und einfache Versuchsdurchführung verzichtet wurde. Technische Replikate= 6.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob die zwei Ansätze unterschiedliche Auswirkungen auf die Ergebnisse von Luciferase Assays haben, wurden die Zellen zunächst nach der Subkultivierung aus der Kulturflasche gewonnen. Daraufhin wurden 20 µl der Zellsuspension für die Zellzählung in einer Neubauer-Zählkammer entnommen. Im ersten Ansatz wurde die gewonnene Zellsuspension direkt für die Transfektion eingesetzt. Im zweiten Ansatz wurde die Zellsuspension für 10 min bei 250 x g zentrifugiert, der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in frischem DMEM resuspendiert. Es konnten keine relevanten Unterschiede in den Ergebnissen festgestellt werden, wenn die Zellen in der Suspension weiterverwendet oder pelletiert wurden (Abb. 18). Somit wurde in Hinblick auf eine möglichst einfache und schnelle Versuchsdurchführung auf eine Pelletierung der Zellsuspension verzichtet.

#### **3.1.2.4 Zellen ausplattieren vs. Zellen und Transfektionsansatz mischen**

Um die Durchführbarkeit der Transfektion schneller und einfacher zu gestalten, wurden zwei unterschiedliche Ansätze in der Versuchsdurchführung miteinander verglichen. In einem Ansatz wurden die Zellen zunächst ausgesät, zu denen dann in einem nächsten Schritt tröpfchenweise der Transfektionsansatz pipettiert wurde. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellsuspension und der Transfektionsansatz zusammen gemischt, um dann je 40 µl des Gemisches mit einer Repetierpipette in die entsprechenden *Wells* auszuplattieren. Dieser Ansatz hatte den klaren Vorteil, dass durch die Verwendung einer Repetierpipette die notwendigen Pipettierschritte minimiert wurden, und dass einer Blasenbildung entgegengewirkt werden konnte, die bei der tröpfchenweisen Zugabe des Transfektionsansatzes durch normale Pipetten beobachtet wurde. Durch einen gegenüberstellenden Vergleich konnte gezeigt werden, dass die *Relative Response Ratio* durch das gemeinsame Mischen der Zellsuspension

und des Transfektionsansatzes im Vergleich zur vorherigen Ausplattierung der Zellen und dem nachträglichen Zusatz des Transfektionsansatzes sank (Abb. 19). Allerdings waren die Ergebnisse trotz der geringer ausfallenden *Relative Response Ratio* reproduzierbar und bewegten sich in noch gut detektierbaren Bereichen. Der Einfachheit halber wurden die Zellsuspension und der Transfektionsansatz deshalb in allen folgenden Experimenten gemeinsam gemischt, um dann in einem folgenden Schritt mithilfe einer Repetierpipette in die Assayplatte ausplattiert zu werden.

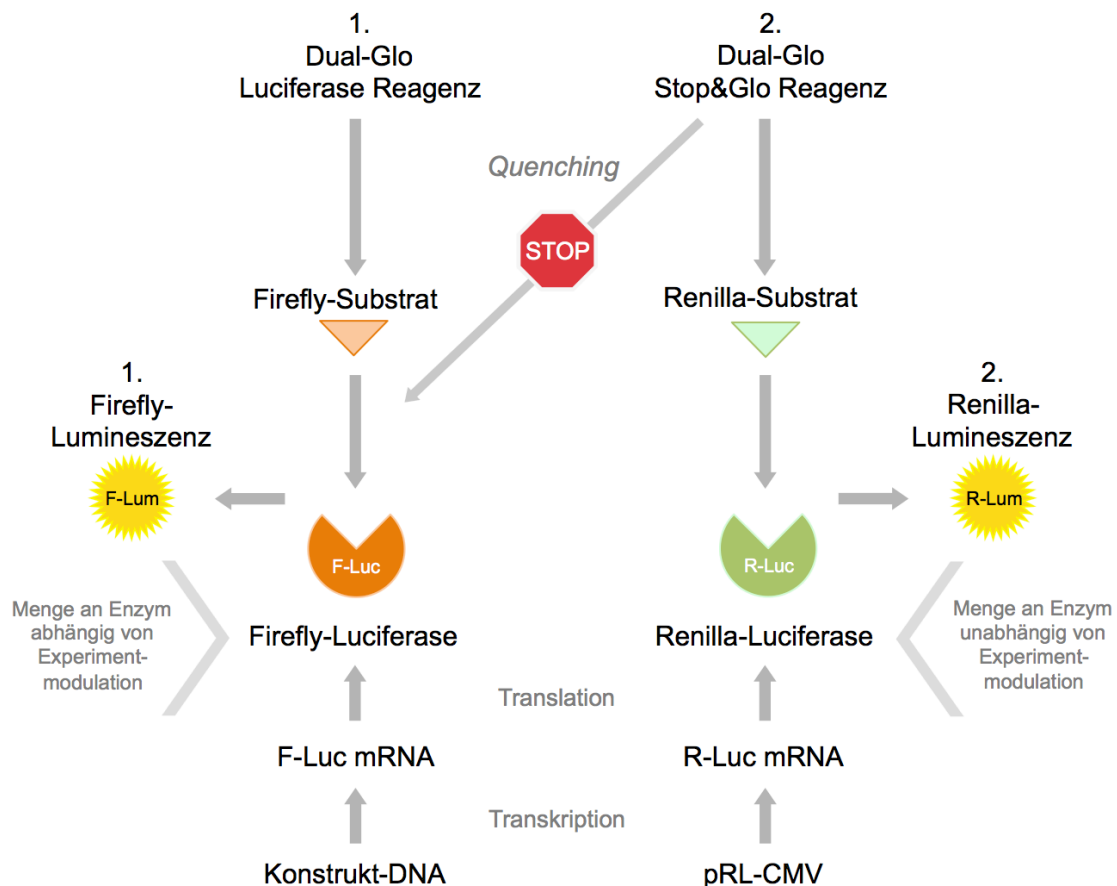


**Abbildung 19: Gegenüberstellender Vergleich zweier Versuchsansätze zur schnelleren und effektiven Durchführbarkeit der Transfektion im Rahmen des Luciferase Assays.** Verglichen wurden der Versuchsansatz, bei dem die Zellsuspension zuvor in eine 384-Well-Platte ausplattiert wurde, bevor ihr der Transfektionsansatz zugegeben wurde („Zellen ausplattieren“), mit dem Versuchsansatz, bei dem die Zellsuspension und der Transfektionsansatz zusammen gemischt und in die 384-Well-Platte pipettiert wurden („Zellen und Transfektionsansatz (T.a.) mischen“). 10000 Zellen in 40 µl Gesamtvolumen. HEK-293T Zellen wurden mit dem Leervektor, dem pGL3-KPNA3-A Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors und SNP= A) oder dem pGL3-KPNA3-G Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors und SNP= G) und mit dem pRL-CMV Vektor in einem Verhältnis von 40:1 kotransfiziert. Um die Ergebnisse mehrerer Versuche miteinander vergleichen zu können, wurde die *Relative Response Ratio* berechnet, bei der die Ergebnisse des Leervektors auf 0 und die des pGL3-KPNA3-A Konstruktes auf 1 normalisiert wurden. Die *Relative Response Ratio* des Ansatzes „Zellen und Transfektionsansatz mischen“ fiel zwar geringer aus als die

*Relative Response Ratio* des Ansatzes „Zellen zuvor ausplattieren“, allerdings handelte es sich noch um gut detektierbare und somit zuverlässig messbare Bereiche. Um die Versuchsdurchführung möglichst geschickt und einfach zu halten, wurden daher in allen folgenden Luciferase Assays die Zellsuspension und der Transfektionsansatz vor der gemeinsamen Ausplattierung in die 384-Well-Platte zusammen gemischt. n=2. Leervektor auf 0 und pGL3-KPNA3-A auf 1 normalisiert.

### 3.1.3 Quenching der Lumineszenz der Firefly-Reaktion

Die Renilla-Lumineszenz musste als interne Kontrolle innerhalb von technischen Replikaten einigermaßen stabil sein. Zwischenzeitlich wurde jedoch beobachtet, dass es eine Korrelation zu geben schien zwischen hohen bzw. niedrigen Firefly-Signalen und hohen bzw. niedrigen Renilla-Signalen, sodass das Renilla-Signal als interne Kontrolle nicht konstant blieb. In diesem Zusammenhang war es zunächst wichtig zu untersuchen, ob das Firefly-Signal und das Renilla-Signal ganz unabhängig voneinander waren.



**Abbildung 20: Schematische Darstellung der Grundidee des Dual-Glo Luciferase Assay Systems von Promega.** Die Konstrukt-DNA, die ein Gen für die Firefly-Luci-

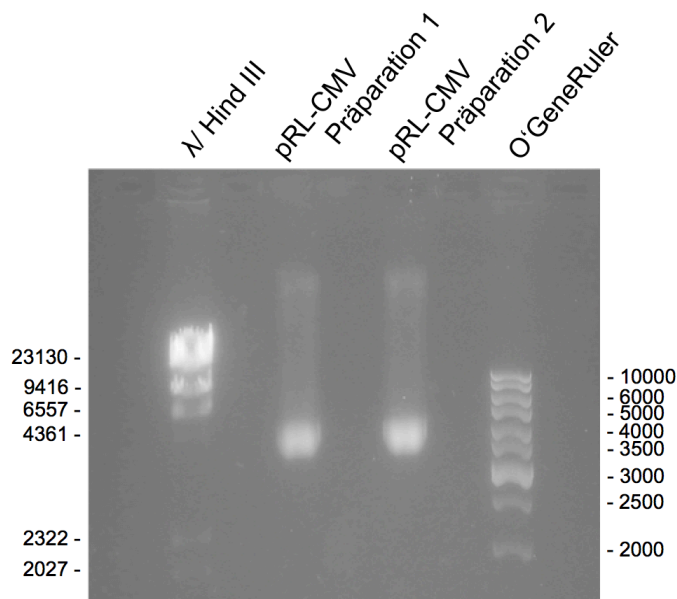
ferase (F-Luc) trägt, sowie die interne Kontroll-DNA pRL-CMV, die ein Gen für die Renilla-Luciferase (R-Luc) enthält, wurden in Zellen (hier HEK-293T) kotransfiziert. Nach der Transkription und Translation exprimierten die Zellen somit die Firefly-Luc bzw. R-Luc. Im Rahmen des Luciferase Assays wurde zunächst das Dual-Glo Luciferase Reagenz zu den Proben gegeben, das zu einer Zelllyse führte und das Substrat für die F-Luc enthielt. Durch den Enzymumsatz bei Bindung des Firefly-Substrates an die F-Luc entstand die Firefly-Lumineszenz (F-Lum), die mit einem Luminometer gemessen wurde. In einem zweiten Schritt wurde den Proben das Dual-Glo Stop&Glo Reagenz zugesetzt, das sowohl das Substrat für die R-Luc enthielt, als auch die Lumineszenz der Firefly-Reaktion um ein mindestens 10.000- Vielfaches heruntersetzte, was als *Quenching* bezeichnet wird (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Nur so konnte die Renilla-Lumineszenz (R-Lum) unabhängig von der Firefly-Lumineszenz gemessen werden und als interne Kontrolle dienen. Während die Menge an F-Luc abhängig von der Experimentmodulation war, sollte die Menge an R-Luc unabhängig von jeglicher vorgenommenen Modulation sein. mRNA: *messenger RNA*.

Für die Funktionalität des Luciferase Assays sollte die Firefly-Reaktion vor der Renilla-Reaktion durch die Zugabe des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz komplett geblockt werden (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Diese Reaktion wird als *Quenching* bezeichnet (Abb. 20). Durch dieses *Quenching* wurde gewährleistet, dass bei der zweiten Messung nur die Lumineszenz gemessen wurde, die aus der Interaktion des Renilla-Substrates mit der R-Luc entstand (R-Lum), und die somit unabhängig von der Firefly-Lumineszenz war. Nur so konnte eine verlässliche interne Kontrolle gewährleistet werden. Da Korrelationen zwischen der F-Lum und der R-Lum beobachtet worden waren, war die Fragestellung von Interesse, ob die Firefly-Reaktion vor der Renilla-Reaktion durch Zugabe des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz komplett geblockt wurde, oder ob etwas von der Lumineszenz der Firefly-Reaktion noch bei der Renilla-Reaktion nachschien.

#### **3.1.3.1 Untersuchung der Reinheit des pRL-CMV Vektors**

Um auszuschließen, dass die beobachteten Korrelationen zwischen hohen bzw. niedrigen Firefly-Signalen und hohen bzw. niedrigen Renilla-Signalen auf einer Kontamination des pRL-CMV Vektors zurückzuführen waren, wurde eine neue Kolonie des pRL-CMV Vektors gepickt. Hierfür wurde eine Impföse, die zuvor über die Oberfläche des Glycerolstocks gestrichen wurde, analog zum Verfahren in 2.3.4 auf eine Agar-Platte gestrichen. Um zu sehen, ob das pRL-

CMV Plasmid rein vorlag, wurde sowohl die bisher verwendete pRL-CMV DNA als auch die neu aufgereinigte pRL-CMV DNA auf einer Agarosegelelektrophorese (1 % TBE-Gel, s. 2.2.2.6) aufgetragen (Abb. 21). Bei beiden Präparationen der pRL-CMV DNA wurde in der Agarosegelelektrophorese eine klare Bande bei einer Länge von ca. 4000 bp sichtbar (das pRL-CMV Plasmid ist 4079 bp lang). Somit konnte eine Kontamination des pRL-CMV Konstruktes ausgeschlossen werden.



**Abbildung 21: Agarosegelelektrophorese zur Untersuchung der Reinheit zweier unterschiedlicher Präparationen des pRL-CMV Vektors.** 1 %-iges TBE-Testgel. Die bisher verwendete pRL-CMV DNA (pRL-CMV Präparation 1) sowie die pRL-CMV DNA einer frisch gepickten Kolonie (pRL-CMV Präparation 2) wurden mit der Restriktionsendonuklease XbaI geschnitten und im Agarosegel aufgetrennt. Man sieht für beide Konstrukte die Bildung einer klaren Bande bei ca. 4000 bp (pRL-CMV Plasmid ist 4079 bp lang), was für die Reinheit der DNA spricht.

### 3.1.3.2 Variation des Verhältnisses von Firefly-Luciferase zu Renilla-Luciferase

Um einem ineffizienten *Quenching* vorzubeugen, wurde das Verhältnis der Konstrukt-DNA (mit einem Gen für die Firefly-Luciferase (F-Luc)) zur Kontroll-DNA pRL-CMV (mit einem Gen für die Renilla-Luciferase (R-Luc)) variiert. Die Nicht-PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G, pGL3-KPNA3-A (mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors) und pLUC-ATXN3-Ca (mit einem Fragment des *ATXN3*

Promotors) wurden in einem Verhältnis von 40:1 zur pRL-CMV DNA als interne Kontrolle eingesetzt. Dieses Verhältnis hatte sich bereits in den Analysen von M. Wanner bewährt (Wanner 2021) und zeigte auch in dieser Arbeit verlässliche Ergebnisse. Hierbei reichten bereits geringe Mengen des pRL-CMV Vektors aus, um eine R-Luc Aktivität zu gewährleisten, die sich deutlich über der Hintergrundaktivität erhob.

Beim Einsatz der neu klonierten PEST-Konstrukte (mit eingefügter PEST-Sequenz zur Reduktion der HWZ der Luciferase) in einem 40:1- Überschuss über dem pRL-CMV Vektor fiel allerdings auf, dass hohe bzw. niedrige Firefly-Signale mit hohen bzw. niedrigen Renilla-Signalen korrelierten. Hier sollte durch die Veränderung des Verhältnisses der Konstrukt-DNA (mit einem Gen für die F-Luc) zum Kontrollvektor pRL-CMV (mit einem Gen für die R-Luc) der prozentuale Anteil der F-Lum an der R-Lum reduziert werden. Um dies zu erreichen, half die Überlegung, dass das R-Lum Signal durch eine Erhöhung der eingesetzten pRL-CMV DNA im Verhältnis von Konstrukt-DNA zu pRL-CMV DNA höher wurde. Durch die Erhöhung des R-Lum Signals sollte der Anteil der F-Lum, der bei der R-Lum noch zu messen war, an der Gesamtlumineszenz der R-Lum geringer ausfallen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Firefly-Lumineszenz (F-Lum) nicht mehr als ein 100-Faches der Renilla-Lumineszenz (R-Lum) betrug. Laut Manual sollte dann die F-Lum nicht mehr als 1 % zur R-Lum beitragen, sodass auch eine Variabilität in den F-Lum Werten keine bemerkbaren Auswirkungen auf das R-Lum Signal haben sollten (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15).

Vor diesem Hintergrund wurden Experimente durchgeführt, bei denen das Konstrukt mit dem F-Luc Gen in einem 40-, 20- bzw. 4-fachen Überschuss zu dem Konstrukt mit dem R-Luc Gen eingesetzt wurde. Durch eine Erhöhung der eingesetzten R-Luc im Verhältnis von F-Luc zu R-Luc wurde eine Erniedrigung des Anteils der F-Lum, der bei der R-Lum noch zu messen war, an der Gesamtlumineszenz der R-Lum erreicht (Tab. 31). Als optimales Verhältnis wurde anhand dieser Ergebnisse ein Verhältnis von F-Luc zur R-Luc zwischen 20:1 und 4:1 eruiert, um den Korrelationen vorzubeugen und um gleichzeitig nicht zu hohe R-Lum Werte zu generieren. Ein so ermitteltes Verhältnis von 8:1

(1000 ng Konstrukt-DNA zu 125 ng pRL-CMV DNA) zeigte gute Ergebnisse und wurde somit für alle weiteren Messungen mit den PEST-Konstrukten übernommen.

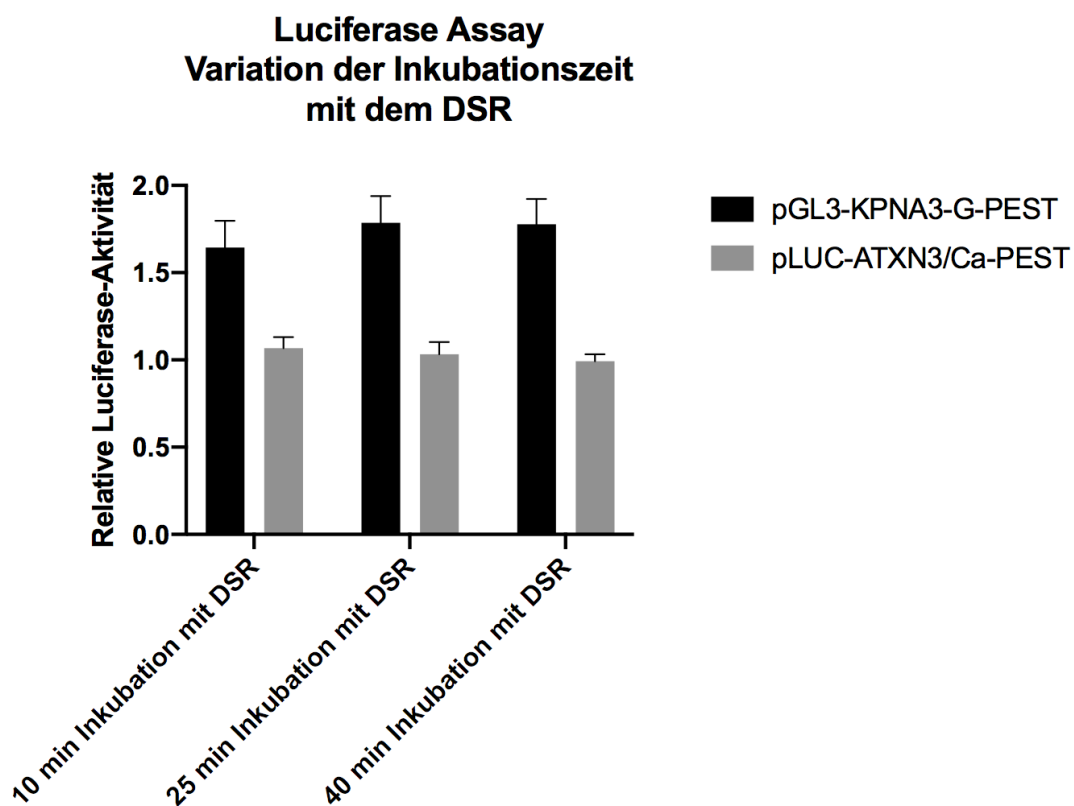
**Tabelle 31: Vergleich der im Rahmen eines Luciferase Assays erhobenen, aufgerundeten absoluten Werte der Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und Renilla-Lumineszenz (R-Lum) bei Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse der Konstrukt-DNA (mit einem Gen für die Firefly-Luciferase (F-Luc)) zur pRL-CMV DNA (mit einem Gen für die Renilla-Luciferase (R-Luc)).** Die absoluten Werte sind in Relativen Lichteinheiten (RLU) angegeben. Es wurden der pGL3-KPNA3-G-PEST Vektor als F-Luc Konstrukt und der pRL-CMV Vektor als R-Luc Konstrukt in HEK-293T Zellen kotransfiziert und für 48 h bei 37 °C inkubiert. Um den prozentualen Anteil der F-Lum zu bestimmen, der noch während der R-Lum gemessen werden konnte, wurde berechnet, um wie viel die R-Lum bei einer Erhöhung der F-Lum um 50 % zunehmen würde. Beispielsweise läge die prozentuale Zunahme der R-Lum bei einer Erhöhung der F-Lum um 50 % und einem 40:1- Verhältnis von F-Luc zu R-Luc bei 67 % (in Bezug auf den Ausgangswert der R-Lum). Durch eine Erhöhung der eingesetzten R-Luc im Verhältnis von F-Luc zu R-Luc konnte eine Erniedrigung des Anteils der F-Lum, der bei der R-Lum noch zu messen war, an der Gesamtlumineszenz der R-Lum erzielt werden. Die gemessene Hintergrundlumineszenz lag bei <100 RLU.

Verhältnis F-Luc : R-Luc	Aufgerundete, absolute Werte F-Lum : R-Lum (in RLU)	+ 50 % F-Lum ↓ F-Lum : R-Lum (in RLU)	Prozentuale Zunahme der R-Lum (in Bezug auf den R- Lum Ausgangswert) bei + 50 % F-Lum
40:1	40.000 : 30.000	+ 20.000 ↓ 60.000 : 50.000	$20.000 / 30.000 = 0,667$ → + 67 % R-Lum
20:1	30.000 : 30.000	+ 15.000 ↓ 45.000 : 45.000	$15.000 / 30.000 = 0,5$ → + 50 % R-Lum
4:1	30.000 : 70.000	+ 15.000 ↓ 45.000 : 85.000	$15.000 / 70.000 = 0,214$ → + 21 % R-Lum

### 3.1.3.3 Variation der Inkubationszeit mit dem Dual-Glo Stop&Glo Reagenz

Die optimale Messzeit für die R-Lum liegt laut Manual bei 10 min bis 2 h nach Zugabe des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR), da die HWZ beider Luciferasen 2 h beträgt (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Aus diesem Grund wurde die R-Lum stets nach 10 min Inkubation der Proben mit dem DSR gemessen.

Um die möglichen Auswirkungen unterschiedlicher Inkubationszeiten auf die beobachteten Korrelationen zwischen F-Lum und R-Lum einschätzen zu können, wurden Messungen nach der Zugabe vom DSR nach 10 min, 25 min oder 40 min verglichen (Abb. 22). Die Ergebnisse der R-Lum unterschieden sich hierbei kaum, wenn man die Proben für längere Zeit mit dem DSR inkubierte. Somit wurde entschieden die Proben wie gehabt für 10 min bei Raumtemperatur mit dem DSR zu inkubieren, um die Zeit für die Durchführung des Luciferase Assays so kurz wie möglich zu halten.



**Abbildung 22: Variation der Inkubationszeit mit dem Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) im Rahmen des Luciferase Assays.** 10000 Zellen in 40 µl Gesamtvolumen pro *Well* (30 µl Zellsuspension und 10 µl Transfektionsansatz) in 384-*Well*-Platte. HEK-293T Zellen wurden mit einem der PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt (mit Fragment des *KPNA3* Promotors) oder pLUC-ATXN3/CA-PEST Konstrukt (mit Fragment des *ATXN3* Promotors) und dem pRL-CMV Vektor in einem Verhältnis von 40:1 kotransfiziert. Die hier gezeigten Werte entsprechen den Relativen Luciferase-Aktivitäten aus Kontrollwells im Rahmen des Medikamenten-Screenings, die mit 1% DMSO für 1,5 h inkubiert wurden. Vor Durchführung des Luciferase Assays wurden von den 40 µl Gesamtvolumen 30 µl Volumen aus den *Wells* pipettiert und jeweils 10 µl des DLRs und des DSRs zu den Proben hinzugefügt. Nach der Zugabe des DSRs wurden die Lumineszenzen der Proben nach 10, 25 und 40 min gemessen. Es wurden

keine Unterschiede beobachtet, wenn die Proben für 10, 25 oder 40 min mit dem DSR inkubiert wurden. Technische Replikate= 4.

Durch die durchgeführten Experimente, die vorgenommenen Änderungen sowie dem Einsatz eines neu geöffneten Dual-Glo Stop&Glo Puffers wurden die zuvor beobachteten Korrelationen zwischen den Firefly- und Renilla-Signalen nicht mehr gemessen. Somit kann im Rahmen dieser Arbeit davon ausgegangen werden, dass das *Quenching* der F-Lum durch Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) regelrecht verlief.

#### **3.1.4 Weitere Variationen in der Durchführung des Luciferase Assays**

##### **3.1.4.1 Reduzierung der Reagenzmengen des Dual-Glo Luciferase Reagenz und des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz**

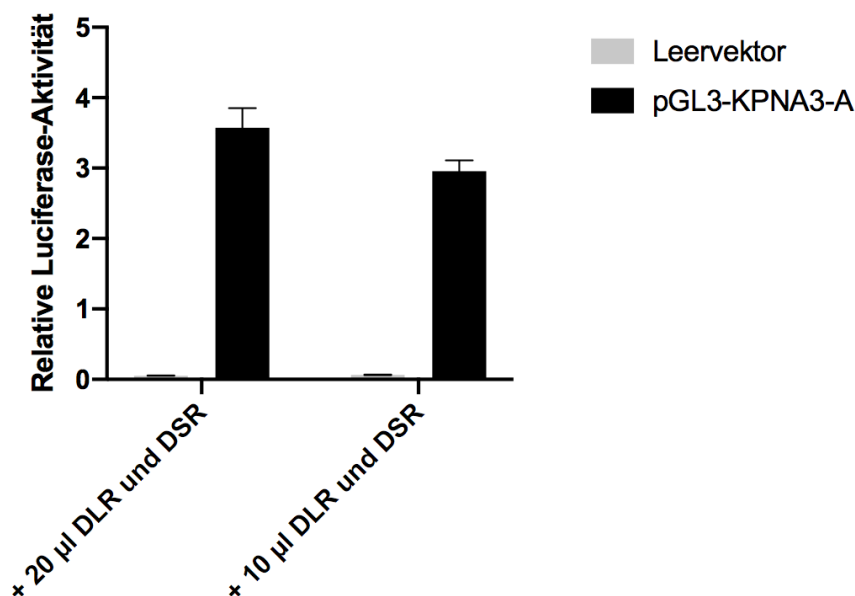
Um die Reagenzmenge im Sinne eines Nutzen- und Kostenfaktors möglichst gering zu halten, wurde getestet, bei welchen Volumina noch zuverlässige Ergebnisse generiert werden konnten. Hierzu wurde das noch verbleibende Volumen der transfizierten Zellen in den *Wells* vor der Durchführung des Luciferase Assays variiert, zu dem man dann die gleiche Menge an Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) gab (Tab. 32).

Es konnte gezeigt werden, dass es für die Durchführung des Luciferase Assays in einer 384-*Well*-Platte keinen großen Unterschied machte, wenn man die verwendeten Volumina auf 10 µl reduzierte (Abb. 23). Zwar sank insgesamt die Relative Luciferase-Aktivität und das Verhältnis zwischen pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G wurde geringer, jedoch konnten nach wie vor Effekte gut beobachtet werden. Auch in einer 96-*Well*-Platte wurden bei einer Reduktion der Volumina analoge Beobachtungen gemacht. Da somit keine Verschlechterungen bei der Verwendung geringerer Volumina beobachtet wurden, wurde vor der Durchführung des Luciferase Assays in 384-*Well*-Platten stets so viel Volumen aus den *Wells* pipettiert, dass nur noch 10 µl transfizierte Zellen übrig blieben, auf die dann in einem ersten Schritt 10 µl DLR und in einem weiteren 10 µl DSR gegeben wurden.

**Tabelle 32: Zusammenfassung der vorgenommenen Veränderungen bei der Reduzierung der Reagenzmengen des Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und des Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) bei der Durchführung des Luciferase Assays.** Aufgezeigt sind das notwendige verbleibende Volumen der transfizierten Zellen vor der Durchführung des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems* und die im Rahmen des Luciferase Assays hinzugefügten Mengen an DLR und DSR.

Verbleibendes Volumen der transfizierten Zellen vor der Durchführung des Luciferase Assays	Zugabe von DLR und DSR bei der Durchführung des Luciferase Assays
<b>96-Well-Platte</b>	
50 µl	+ 50 µl DLR + 50 µl DSR
25 µl	+ 25 µl DLR + 25 µl DSR
<b>384-Well-Platte</b>	
20 µl	+ 20 µl DLR + 20 µl DSR
10 µl	+ 10 µl DLR + 10 µl DSR

**Luciferase Assay**  
Zugabe von 20 µl DLR und DSR vs.  
Zugabe von 10 µl DLR und DSR



**Abbildung 23: Gegenüberstellung zweier Ansätze zur Reduzierung der Reagenzmenge im Rahmen des Luciferase Assays, indem die Zugabe von jeweils 20 bzw. 10 µl des Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und des Dual-Glo Stop&Glo Rea-**

**genz (DSR) miteinander verglichen wurden.** 10000 Zellen in 60 µl Gesamtvolumen pro *Well* (40 µl Zellsuspension und 20 µl Transfektionsansatz) in 384-*Well*-Platte. HEK-293T Zellen wurden mit dem Leervektor oder dem pGL3-KPNA3-A Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors und SNP= A) und mit dem pRL-CMV Vektor in einem Verhältnis von 40:1 kotransfiziert. Vor Durchführung des Luciferase Assays wurden von den 60 µl jeweils 40 µl bzw. 50 µl Volumen aus den *Wells* pipettiert und jeweils 20 µl bzw. 10 µl des DLRs und des DSRs zu den Proben hinzugefügt. Da auch bei der Verwendung geringerer Reagenzmengen die zu messenden Effekte gut zu detektieren waren, wurde in allen folgenden Luciferase Assays die Menge an verwendetem DLR und DSR auf 10 µl reduziert. Technische Replikate = 4.

### 3.1.5 Überführung des Assays von einer 96-*Well*-Platte in eine 384-*Well*-Platte: Endversion nach Etablierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Luciferase Assay durch die Etablierung und Optimierung zahlreicher Parameter erfolgreich von einer 96-*Well*-Platte in eine 384-*Well*-Platte überführt (Tab. 33).

**Tabelle 33: Gegenüberstellender Vergleich wichtiger Parameter für die Transfektion von HEK-293T Zellen und die Durchführung des Luciferase Assays in 96-*Well*-Platten und 384-*Well*-Platten.** Die Angaben stellen die Endversion nach Etablierung dar und beziehen sich auf die Mengen in einem *Well*. Unterschieden wurden Nicht-PEST-Konstrukte von PEST-Konstrukten, die durch Einklonierung einer PEST-Sequenz für den schnelleren Abbau der Firefly-Luciferase hergestellt wurden. Im Rahmen der Transfektion variierten das eingesetzte Verhältnis von Firefly-Luciferase (F-Luc) zu Renilla-Luciferase (R-Luc) sowie die Menge an Konstrukt-DNA und pRL-CMV DNA je nachdem, ob ein Nicht-PEST-Konstrukt oder ein PEST-Konstrukt als Konstrukt-DNA eingesetzt wurde. Angegeben sind für die Transfektion außerdem das Volumen des Transfektionsansatzes und des eingesetzten Attractene Reagenz, das Volumen der Zellsuspension mit enthaltener Zellzahl und das Gesamtvolumen pro *Well*. Für das Luciferase Assay sind das verbleibende Volumen der transfizierten Zellen pro *Well* vor der Durchführung sowie die Mengen an eingesetztem Dual-Glo Luciferase Reagenz (DLR) und Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR), die zu den Proben gegeben wurden, angegeben.

Angaben pro <i>Well</i>	96- <i>Well</i> -Platte		384- <i>Well</i> -Platte	
	Nicht-PEST-Konstrukte	Nicht-PEST-Konstrukte	PEST-Konstrukte	PEST-Konstrukte
<b>Transfektion</b>				
<b>Verhältnis F-Luc : R-Luc</b>	40:1	40:1	8:1	
<b>Konstrukt-DNA Menge</b>	200 ng	40 ng	1000 ng	
<b>pRL-CMV DNA Menge</b>	5 ng	1 ng	125 ng	
<b>Volumen des Transfektionsansatzes</b>	50 µl	10 µl	10 µl	

<b>Attractene Reagenz</b>	0,75 µl	0,15 µl	0,15 µl
<b>Volumen der Zellsuspension</b>	100 µl	30 µl	30 µl
<b>Zellzahl</b>	40000	10000	10000
<b>Gesamtvolumen</b>	150 µl	40 µl	40 µl
<b>Luciferase Assay</b>			
<b>Verbleibendes Volumen der transfizierten Zellen</b>	25 µl	10 µl	10 µl
<b>Zugabe von DLR</b>	+ 25 µl	+ 10 µl	+ 10 µl
<b>Zugabe von DSR</b>	+ 25 µl	+ 10 µl	+ 10 µl

### **3.2 Der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors reguliert die *KPNA3* Promotoraktivität.**

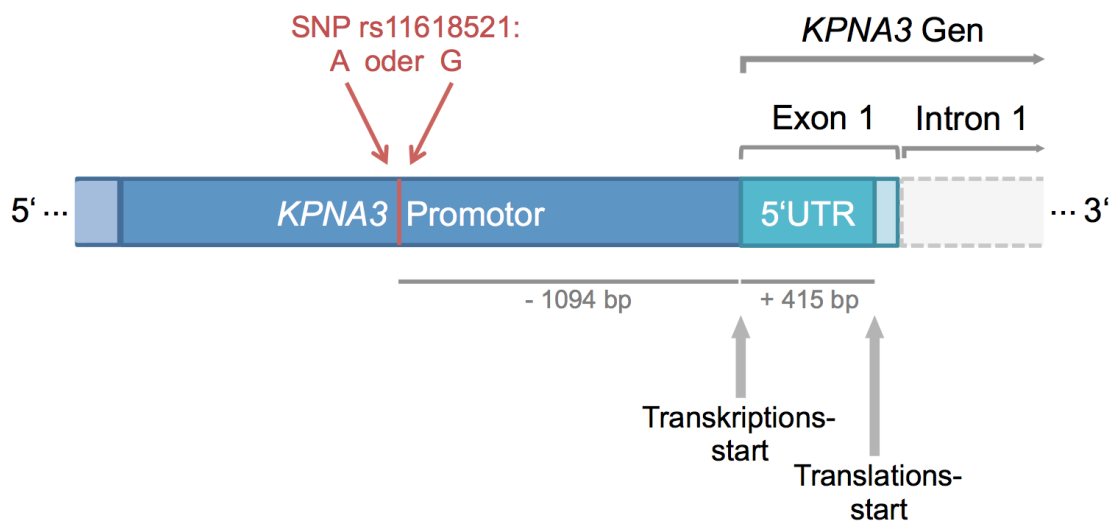
In vorherigen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass ein SNP innerhalb des *KPNA3* Promotors die *KPNA3* Promotoraktivität beeinflussen kann (Wanner 2021). Hierbei handelt es sich um den SNP rs11618521, der innerhalb des *KPNA3* Promotors 1049 bp *upstream* des Transkriptionsstarts des *KPNA3* Gens liegt. Beide Versionen des SNPs kommen in der Bevölkerung häufig vor: In Europa ist die Variante mit Adenin (A) zu etwa 39 % vertreten, während der SNP= Guanin (G) zu ca. 61 % vorkommt (Sherry et al. 2001: dbSNP Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; Stand: 22.04.2020); Tab. 34).

**Tabelle 34: Einzelheiten zum SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors.** Die Leserichtung SNP 5' → 3' ist hierbei in Richtung des *KPNA3* Gens. SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*. (Sherry et al. 2001: dbSNP Datenbank der NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; Stand: 22.04.2020)).

<b>SNP Nummer</b>	<b>Position</b>	<b>SNP 5' → 3</b>	<b>Allelfrequenz</b>
rs11618521	1049 bp <i>upstream</i> vom Transkriptionsstart	A oder G	A: ca. 0,39 G: ca. 0,61

Die eingesetzten pGL3-*KPNA3* Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors enthalten die letzten 1981 bp am 3' Ende des *KPNA3* Promotors (Wanner 2021) (Abb. 24). Außerdem sind auch die ersten 415 bp des Exons 1

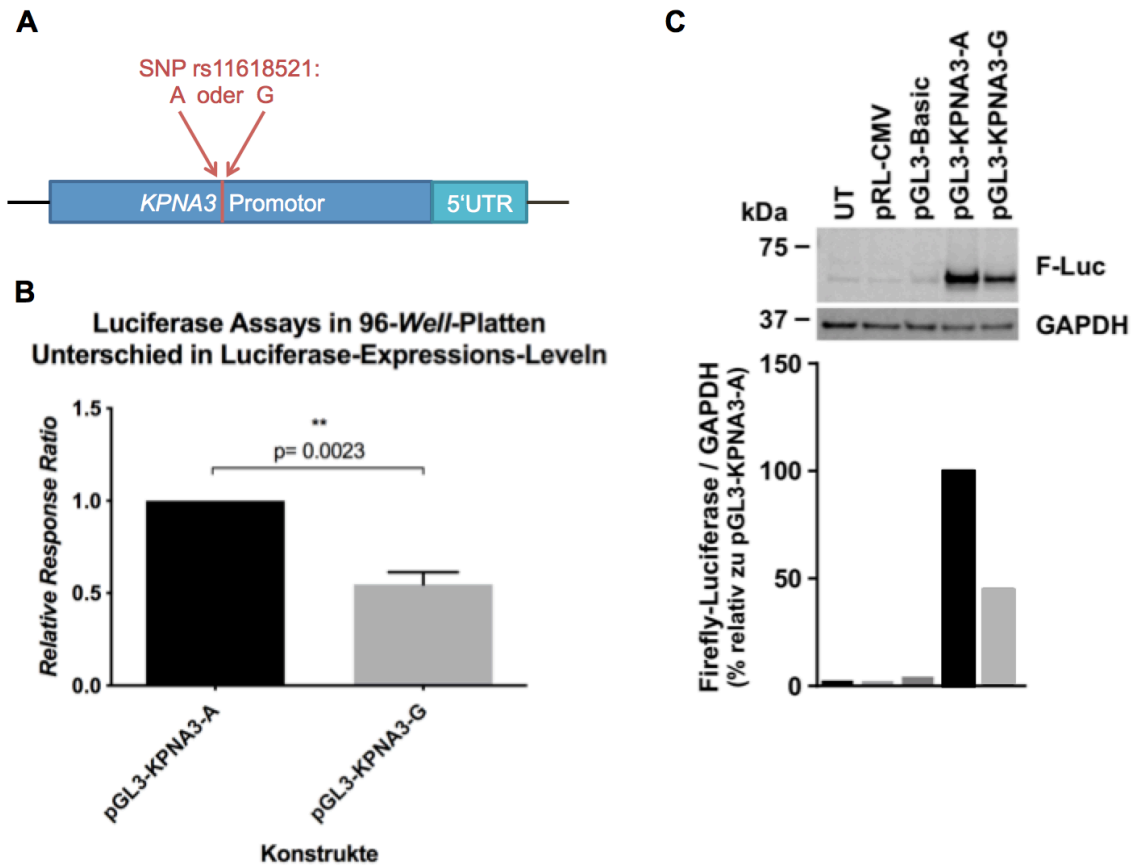
des *KPNA3* Gens enthalten, die die sogenannte 5' UTR bilden (Kent et al. 2002, *UCSC Genome Browser*). Anstelle des kodierenden Bereiches des *KPNA3* Gens tragen die pGL3-*KPNA3* Konstrukte hingegen ein Gen, das eine Luciferase exprimiert (s. 3.1.1). Durch Verwendung dieser Konstrukte in Luciferase Assays konnte die Expression des *KPNA3* Gens in Abhängigkeit von dem jeweiligen SNP ermittelt werden.



**Abbildung 24: Schematische Darstellung des *KPNA3* Promotors und des *KPNA3* Gens.** Der SNP rs11618521 befindet sich 1094 bp *upstream* des Transkriptionsstartes. Es gibt zwei Varianten des SNPs, indem entweder ein Adenin (A) oder ein Guanin (G) an dieser Stelle zu finden ist. Der dunkelblau hervorgehobene Bereich des Promotors ist der Promotorbereich, der für die Klonierung der pGL3-*KPNA3* Konstrukte durch M. Wanner verwendet wurde (Wanner 2021). Das *KPNA3* Gen schließt sich dem *KPNA3* Promotor 3' an, wobei die ersten 415 bp des Exons 1 zu der 5' UTR gezählt werden. 3' von der 5' UTR befindet sich der Start der Translation der mRNA. Die dargestellten Daten wurden Kent et al. 2002 (*UCSC Genome Browser*) und Sherry et al. 2001 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> (Stand: 22.04.2020)) entnommen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors die Expression der Luciferase im Rahmen des Luciferase Assays signifikant verändern konnte. Dies spricht dafür, dass dieser SNP die *KPNA3* Promotoraktivität reguliert. Konstrukte, die an der Stelle des SNPs ein Adenin (A) aufwiesen, zeigten eine höhere Genexpression als Konstrukte mit einem Guanin (G) an dieser Stelle. Dieser Effekt konnte sowohl im Luciferase Assay (Abb. 25 B) als auch im Western-Blot (Abb. 25 C) gezeigt werden. Diese Beobachtungen entsprachen bereits entdeckten Effekten durch

M. Wanner, wobei die 5'UTR eine wichtige Rolle in der Expressionsregulation zu haben schien (Wanner 2021).



**Abbildung 25: Der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors reguliert die *KPNA3* Promotoraktivität.** **A)** Die Abbildung zeigt schematisch die Lokalisation des SNPs innerhalb des *KPNA3* Promotors und die beiden Varianten, die entweder ein Adenin (A) oder ein Guanin (G) an dieser Stelle aufweisen. **B)** Zusammenfassung von Luciferase Assays in 96-Well-Platten (nach 48 h Inkubation der transfizierten HEK-293T Zellen), die zeigen, dass die Konstrukte mit SNP= A eine höhere Expression aufweisen als diejenigen mit SNP= G. Für den Vergleich mehrerer Luciferase Assays miteinander wurde die *Relative Response Ratio* berechnet, bei der die Ergebnisse des Leervektors auf 0 und die des pGL3-KPNA3-A Konstruktes auf 1 normalisiert wurden. n= 5. Statistik: Einstichproben-t-Test. **C)** Auch im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass das pGL3-KPNA3-A Konstrukt mit dem SNP= A ein höheres Expressionssignal aufweist als das pGL3-KPNA3-G Konstrukt mit SNP= G. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. UT: Untransfizierte Zellen. pRL-CMV: Vektor mit Renilla-Luciferase. pGL3-Basic: Leervektor. Primärer AK: Anti-Luciferase (gegen Firefly-Luciferase (F-Luc), 1:2000 verdünnt; Sigma-Aldrich, Darmstadt, D). Ladekontrolle: GAPDH (1:2500 verdünnt; LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, D). Die quantifizierte Expression des pGL3-KPNA3-A Konstruktes im Western-Blot wurde auf 1 normalisiert.

### **3.3 Die erfolgreiche Klonierung einer PEST-Sequenz in die verwendeten Konstrukte senkt signifikant die Halbwertszeit der Luciferase.**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Wirkstoffe daraufhin getestet, ob sie eine Wirkung auf die *KPNA3* Promotoraktivität erzielen konnten. Bei einer HWZ der Firefly-Luciferase (F-Luc) von 2 h (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15) wurden allerdings Abnahmen der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) bei der Inkubation mit Wirkstoffen nur schwierig sichtbar. Eine Verlängerung der Inkubation mit den jeweiligen Wirkstoffen war dahingehend nicht möglich, als dass dann toxische Effekte überwogen (s. 3.4.2). Um trotzdem eine Abnahme der RLA messen zu können, musste somit die HWZ der F-Luc herabgesetzt werden. Dies wurde dadurch erreicht, dass eine sogenannte PEST-Sequenz in die Konstrukte kloniert wurde. PEST-Sequenzen sind hierbei Polypeptid-Sequenzen, die angereichert sind mit Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T). Sie dienen als proteolytische Signale und führen so zu einem schnelleren Abbau von Proteinen (Rechsteiner und Rogers 1996). Die HWZ der F-Luc sollte laut Hersteller von 2 h (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15) auf nur ca. 45 min gesenkt werden (Leclerc et al. 2000). So wurde im Rahmen des Luciferase Assays durch eine 90 min lange Zugabe der Wirkstoffe zu den mit den PEST-Konstrukten transfizierten Zellen eine Inkubation gewährleistet, die die Länge zweier HWZ umfasste.

Die erfolgreiche Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors und die Klonierung des pLUC/Ca-ATXN3-PEST Konstruktes mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors gelang durch eine Variation von zahlreichen experimentellen Faktoren.

#### **3.3.1 Verarbeitung des *gBlock* Gen-Fragments**

Das *gBlock* Gen-Fragment, das von IDT bezogen wurde, enthielt das Insert mit der PEST-Sequenz für die Klonierung (Tab. 35). Der *gBlock* wurde zunächst resuspendiert. Dafür wurde das Reaktionsgefäß für 3-5 s bei einem Minimum von 3000 x g zentrifugiert, um sicherzustellen, dass sich das Material am Boden des Gefäßes sammelte. Daraufhin wurde TE-Puffer hinzugegeben, um eine

Endkonzentration von 10 ng/μl zu erreichen. Das Reaktionsgefäß wurde mit einem Vortexer gemischt und für 20 min bei 50 °C inkubiert. Nachdem das Reaktionsgefäß wieder gemischt und zentrifugiert wurde, wurde der resuspendierte *gBlock* bei -20 °C gelagert.

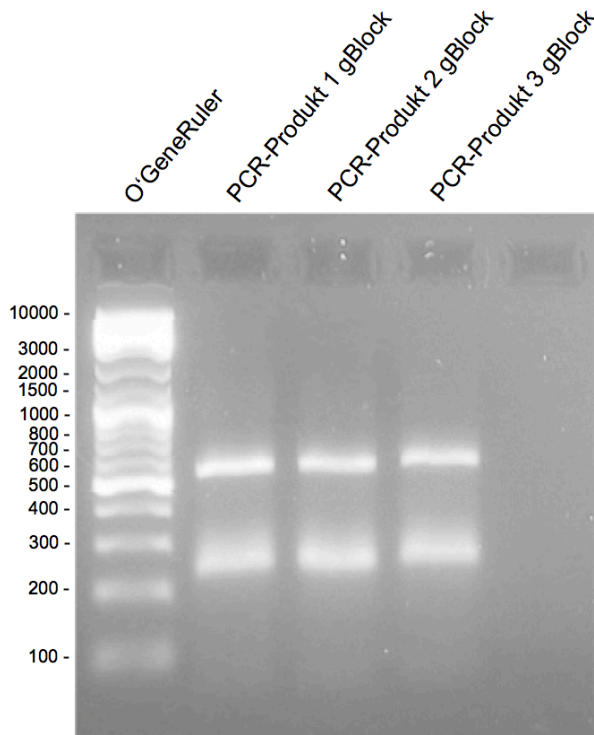
**Tabelle 35: Details zum *gBlock* Gen-Fragment.** Bestellt bei IDT, Löwen, Belgien. Luc-PEST: Firefly-Luciferase mit eingebauter PEST-Sequenz.

Name	Inhalt	Details	Marke
<i>gBlock</i>	Luc-PEST	Länge: 572 bp Menge: 500 ng GC- Gehalt: 54,90 % Molekulargewicht: 353341,7 g/ mol fmoles/ ng: 2,83 μg/ OD <sub>260</sub> : 50	IDT (Löwen, Belgien)

Die Verarbeitung des *gBlocks* erfolgte durch drei unterschiedliche Ansätze. Beim ersten Ansatz wurde der *gBlock* durch eine PCR amplifiziert und daraufhin auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen. Die gewünschte Bande wurde ausgeschnitten und die DNA mithilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* extrahiert. Nach einem Restriktionsverdau wurde die DNA mit dem *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt. Im Rahmen des zweiten Ansatzes wurde der *gBlock* auch durch eine PCR amplifiziert und direkt danach mithilfe des *QIAquick® PCR Purification Kit* aufgereinigt. Nach einem Restriktionsverdau wurde die DNA auf ein TAE-Agarosegel aufgetragen und die gewünschte Bande ausgeschnitten. Die DNA wurde daraufhin mithilfe des *QIAquick® Gel Extraction Kits* extrahiert. Beim dritten Ansatz wurde der *gBlock* direkt für den Restriktionsverdau verwendet.

Wenn das *gBlock* im ersten und zweiten Ansatz durch eine PCR amplifiziert und auf ein TBE-Testgel aufgetragen wurde, fiel auf, dass außer der gewünschten Bande von ca. 550 bp auch eine unspezifische, kleinere Bande amplifiziert wurde (Abb. 26). Das Auftreten von unspezifischen Banden nach einer Amplifikation ist nicht selten, da der *gBlock* aus mehreren kleineren, überlappenden Fragmenten synthetisiert wird, die während der PCR noch effizienter amplifiziert werden als das lange Fragment. Auch nach einer

Aufreinigung sind diese kleinen Nebenprodukte immer noch zum Teil vorhanden (<https://eu.idtdna.com/pages/support/faqs/should-i-amplify-my-gblocks-gene-fragments-when-i-receive-them-> [Zugriff 26.11.2019]). Auch wenn IDT die Amplifikation von *gBlock* Gen-Fragmenten erst ab einer Länge von >1 kb nicht empfiehlt, wurden in dieser Arbeit Konstrukte mit der richtigen Sequenz dann kloniert, wenn der *gBlock* direkt eingesetzt wurde, anstatt zuvor amplifiziert zu werden (dritter Ansatz).



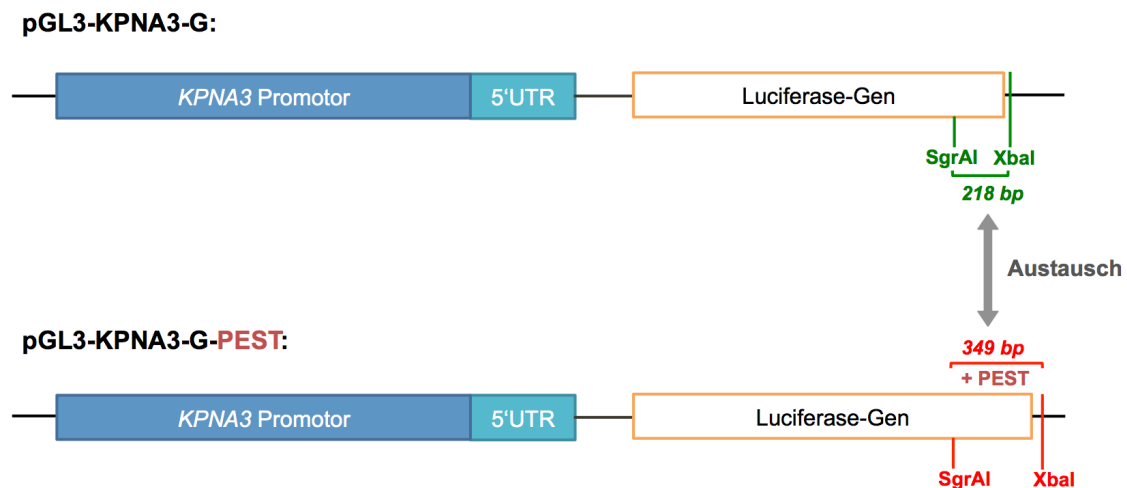
**Abbildung 26: Auf ein 1,5 %-iges TBE-Testgel aufgetragene, amplifizierte *gBlock*-Sequenzen.** Zu sehen sind drei unabhängig voneinander, durch eine PCR amplifizierte *gBlock*-Ansätze. Außer der gewünschten Bande bei ca. 550 bp wurde in allen drei Ansätzen auch eine zusätzliche Bande bei ca. 250 bp sichtbar, die für eine unspezifische Amplifikation des *gBlock* Genfragments sprach. Längenstandard: O'GeneRuler DNA-Leiter Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D).

### 3.3.2 Klonierung einer PEST-Sequenz in das pGL3-KPNA3-G Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors

#### 3.3.2.1 Klonierungsstrategie des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes

Für die Klonierung eines PEST-Konstruktes mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors wurde der pGL3-KPNA3-G Vektor verwendet (Abb. 27). Auf diesen

wurde zurückgegriffen, da er an der Stelle des SNPs rs11618521 ein Guanin trägt, und dies mit 61 % die in Europa häufigere Variante darstellt (Sherry et al. 2001). Die PEST-Sequenz wurde *in-frame* in den offenen Leserahmen des Luciferase Gens im pGL3-KPNA3-G Vektor eingefügt, indem das endogene Stopcodon entfernt und ein Fusionsprotein zwischen Luciferase und PEST-Sequenz C-terminal eingefügt wurden. Für die Gewinnung des PEST-Inserts und das Schneiden des pGL3-KPNA3-G Vektors wurden die Restriktionsenzyme SgrAI (5'-CR!CCGGYG-3', wobei R= A oder G und Y= C oder T) und XbaI (T!CTAGA) eingesetzt (Abb. 27).

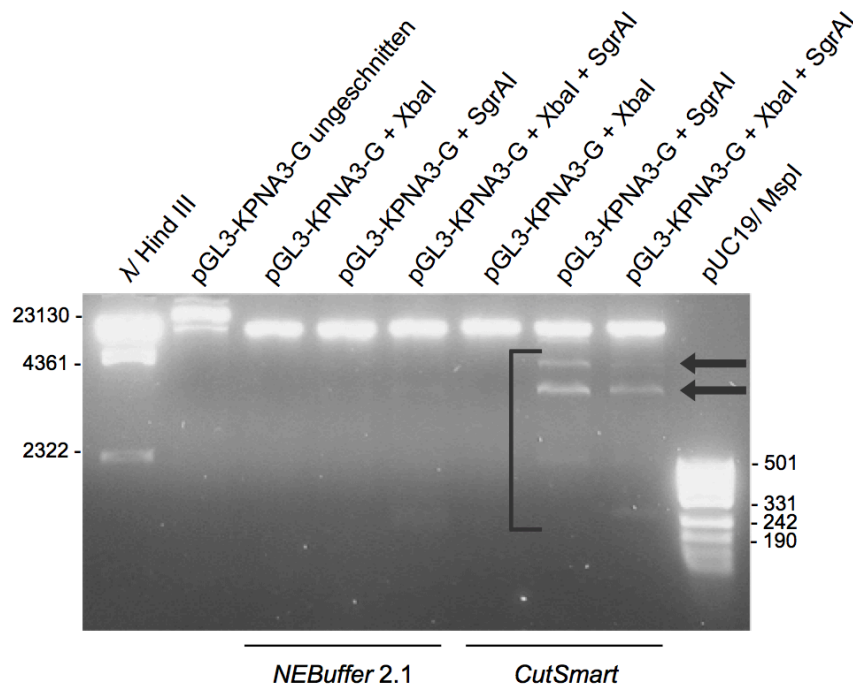


**Abbildung 27: Schematische Darstellung des Prinzips der Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes durch Einfügen einer PEST-Sequenz in das pGL3-KPNA3-G Konstrukt, das ein Fragment des KPNA3 Promotors enthält.** Aufgezeigt werden die spezifischen Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen SgrAI und XbaI sowie die Längen der ausgetauschten Sequenzen. Die ausgeschnittene Sequenz aus dem pGL3-KPNA3-G Vektor betrug 218 bp und reichte von Base 3914 bis Base 4132. Das in das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt einklonierte 349 bp lange PEST-Insert zog sich von Base 3914 bis Base 4263.

### 3.3.2.2 Variationen des Restriktionsverdau

Im Laufe der Klonierung wurden viele Variationen beim Restriktionsverdau vorgenommen, um optimal geschnittene Plasmide zu erhalten. Darunter fiel auch die vergleichende Betrachtung der verwendeten Puffer, da die Restriktionsendonukleasen XbaI und SgrAI laut Hersteller sowohl im *NEBuffer* 2.1 als auch im *CutSmart*- Puffer eine 100 prozentige Aktivität aufweisen

könnten (s. *New England BioLabs GmbH*). Hierfür wurden unter Einsatz des jeweiligen Puffers Restriktionsverdau von 0,5 µg pGL3-KPNA3-G DNA mit 1,7 U SgrAI und 10 U XbaI durchgeführt, wobei die Restriktionsenzyme in drei unterschiedlichen Ansätzen jeweils einzeln und gemeinsam eingesetzt wurden (Abb. 28).



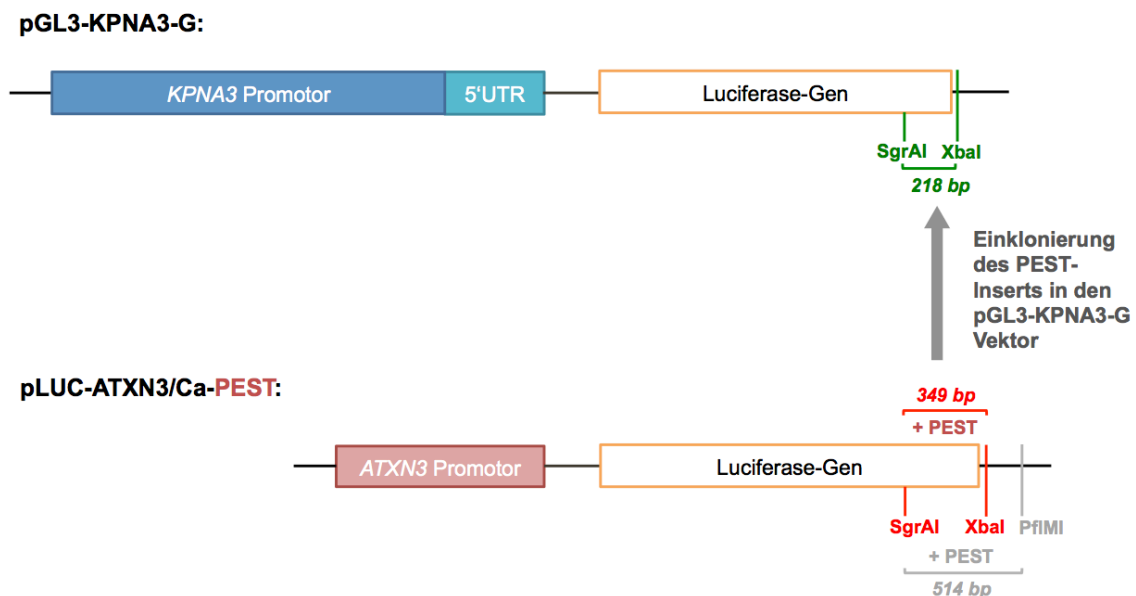
**Abbildung 28: Gegenüberstellung der Puffer *NEBuffer 2.1* und *CutSmart* für den Restriktionsverdau des Konstruktes pGL3-KPNA3-G.** 1,5 %-iges TBE-Testgel. Es sind der ungeschnittene pGL3-KPNA3-G Vektor, sowie Restriktionsverdau des pGL3-KPNA3-G Vektors mit XbaI, SgrAI oder XbaI und SgrAI in *NEBuffer 2.1* oder *CutSmart* zu sehen. Im *CutSmart*-Puffer wurde eine erhöhte Staraktivität des SgrAI Restriktionsenzym (Klammer und Pfeile) festgestellt. Längenstandard: λ DNA/ Hind III Marker (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D) und pUC19 DNA/MspI (HpaII) (Thermo Fisher Scientific Inc.; Dreieich, D).

Es konnte gezeigt werden, dass das SgrAI im *CutSmart*-Puffer eher zu Staraktivität neigte als im *NEBuffer 2.1*. Unter Staraktivität versteht man das Schneiden der DNA auch an unerwünschten Sequenzen als der eigentlichen Erkennungssequenz, was zu mehreren unspezifischen Banden in der Agarosegelelektrophorese führt (Mülhardt 2013). Dementsprechend wurde in den Folgeexperimenten auf den *NEBuffer 2.1* zurückgegriffen, in dem die für die Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST und des pLUC-ATXN3/Ca-PEST

Konstruktes eingesetzten Restriktionsenzyme SgrAI, XbaI bzw. PflMI eine 100 %- ige Aktivität aufweisen konnten.

### 3.3.2.3 Erfolgreiche Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes

Da sich die Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mithilfe des *gBlocks* als schwierig erwies, wurde das Insert mit der PEST-Sequenz aus dem pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt gewonnen (Abb. 29). Hierbei wurde das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt zuvor kloniert, indem das aus dem *gBlock* gewonnene Insert in den pLUC-ATXN3/Ca Vektor eingefügt wurde (s. 3.3.3). Da das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt somit auch die im PEST-Insert enthaltene XbaI-Schnittstelle enthielt, konnte durch die Verwendung der Restriktionsenzyme SgrAI und XbaI das für das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt passende Insert herausgeschnitten werden.



**Abbildung 29: Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes.** Da sich die Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes (mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors) mithilfe des *gBlocks* als schwierig erwies, wurde das PEST-Insert aus dem pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt (mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors) gewonnen. Dieses wurde zuvor durch Einfügen des PEST-Inserts kloniert, das durch Schneiden des *gBlocks* mit den Restriktionsendonukleasen SgrAI und PflMI gewonnen wurde. Durch das Schneiden des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes mit den Restriktionsenzymen SgrAI und XbaI entstand ein 349 bp langes PEST-Insert, das in den zuvor ebenfalls mit SgrAI und XbaI geschnittenen pGL3-KPNA3-G Vektor

einkloniert wurde. Durch die Ligation des PEST-Inserts in den pGL3-KPNA3-G Vektor entstand so das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt.

Für die Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes wurden 2 µg der pLUC-ATXN3/Ca-PEST DNA mit 10 U XbaI und 5 U SgrAI in einem Gesamtvolumen von 30 µl geschnitten, sodass ein 349 bp langes PEST-Insert gewonnen wurde. Zusätzlich wurden 2 µg des pGL3-KPNA3-G Vektors mit 10 U XbaI und 5 U SgrAI in einem Gesamtvolumen von 30 µl geschnitten. Das gewonnene PEST-Insert wurde in einem nächsten Schritt durch Ligation in den pGL3-KPNA3-G Vektor kloniert. Für die Ligation wurden ein Ligationsansatz von 10 µl, ein 3:1 molarer Überschuss des Inserts über den Vektor und ein Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1 eingesetzt. Im Laufe der Klonierung wurden unterschiedliche Inkubationszeiten für die Ligation gewählt, wobei die Ligation bei einer Inkubation bei 16 °C für 16 h mit direkt angeschlossener Hitzeinaktivierung (15 min bei 65 °C) erfolgreich war. Da für die Transformation durch das Aufteilen eines 10 µl Ligationsansatzes in jeweils zwei 5 µl Ansätze kein Kolonienwachstum auf den Agarplatten nachgewiesen werden konnte, wurde der komplette Ligationsansatz von 10 µl für die Transformation verwendet. Für die Transformation wurden selbst hergestellte, chemisch kompetente DH5α-Zellen eingesetzt. Durch die durchgeführte Sanger-Sequenzierung konnte die Sequenz des klonierten pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mit eingefügter PEST-Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 30).

#### T820\_Luc-SgrAI-F

[E][S][I][L][L][Q][H][P][N][I][F][D][A][G][V][A][G][L][P][D]  
 3841 GAATCCATCT TGCTC**CAACA CCCC AACATC TTCGAC**GCAG GTGTCGCAGG TCTTCCCGAC  
 CTTAGGTAGA ACGAG**GTTGT GGGGTTGTAG AAGCTG**CGTC CACAGCGTCC AGAAGGGCTG

#### SgrAI

[D][D][A][G][E][L][P][A][A][V][V][V][L][E][H][G][K][T][M][T]  
 3901 GATG**CGCCG CCG**AGCTGCC CGCCGCAGTC GTCGTGCTGG AACACGGTAA AACCATGACC  
 CTACT**GCGGC CGC**TCGACGG GCGGCGTCAG CAGCACGACC TTGTGCCATT TTGGTACTGG

[E][K][E][I][V][D][Y][V][A][S][Q][V][T][T][A][K][K][L][R][G]  
 3961 GAGAAGGAGA TCGTGGACTA TGTGGCCAGC CAGGTTACAA CCGCCAAGAA GCTGCGCGGT  
 CTCTTCCTCT AGCACCTGAT ACACCGGTCG GTCCAATGTT GCGGGTTCTT CGACGCGCCA

```

[G][V][V][ F][V][D][E ][V][P][K] [G][L][T][ G][K][L][D ][A][R][K]
4021 GGTGTTGTGT TCGTGGACGA GGTGCCTAAA GGACTGACCG GCAAGTTGGA CGCCCGCAAG
CCACAACACA AGCACCTGCT CCACGGATT CCTGACTGGC CGTTCAACCT GCGGGCGTTC

PEST

[I][R][E][ I][L][I][K ][A][K][K] [G][G][K][ I][A][V][N ][S][H][G]
4081 ATCCGCGAGA TTCTCATTAAGGCCAAGAAG GGCGGCAAGA TCGCCGTGAA TTCTCACGGC
TAGGCGCTCT AAGAGTAATT CCGGTTCTTC CCGCCGTTCT AGCGGCACCTT AAGAGTGCCG

PEST

[F][P][P][ E][V][E][E ][Q][A][A] [G][T][L][ P][M][S][C ][A][Q][E]
4141 TTCCCTCCCG AGGTGGAGGA GCAGGCCGCC GGCACCCTGC CCATGAGCTG CGCCAGGAG
AAGGGAGGGC TCCACCTCCT CGTCCGGCGG CCGTGGGACG GGTACTCGAC GCGGGTCTCT

PEST

[S][G][M][ D][R][H][P ][A][A][C] [A][S][A][ R][I][N][V ][*]
4201 AGCGGCATGG ATAGACACCC TGCTGCTTGC GCCAGCGCCA GGATCAACGT CTAAGGCCCG
TCGCCGTACC TATCTGTGGG ACGACGAACG CCGTCGCGGT CCTAGTTGCA GATTCCGGCG

Xbal
4261 GACTCTAGAT CGGGGCGGCC GGCCGCTTCG AGCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
CTGAGATCTA GCCCCGCCGG CCGGCGAAGC TCGTCTGTAC TATTCTATGT AACTACTCAA

```

**Abbildung 30: Ausschnitt der Sequenz des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mit Strang (von 5' nach 3') und Gegenstrang (von 3' nach 5').** Die Zahlen an der linken Seite geben die genaue Nummer der Basenpaarposition innerhalb des Konstruktes an. Es sind die genauen Bindestellen der Restriktionsenzyme SgrAI und XbaI (in grün) sowie die Bindestelle des für die Sequenzierung notwendigen Primers T820\_Luc-Sgral-F (in blau) angegeben. In rot ist die eingefügte PEST-Sequenz markiert. Über der Sequenz werden die Aminosäuren (in lila) als [Aminosäure] angegeben, die von jeweils einem Basentriplett kodiert werden. [\*] markiert hierbei das Stopcodon TAA.

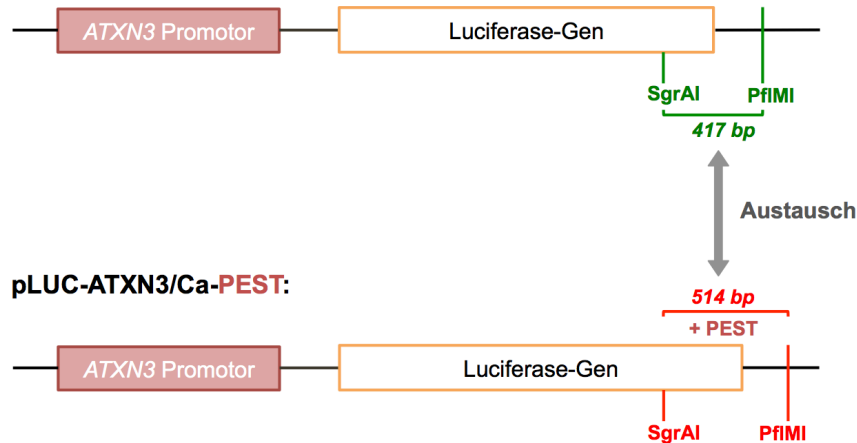
### 3.3.3 Klonierung einer PEST-Sequenz in das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt mit einem Fragment des ATXN3 Promotors

#### 3.3.3.1 Klonierungsstrategie der pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes

Das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt wurde verwendet, um ein PEST-Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors herzustellen (Abb. 31). Das *gBlock* Gen-Fragment diente als Insert mit der PEST-Sequenz, das mit den Restriktionsenzymen SgrAI (5'-CR!CCGGYG-3', wobei R= A oder G und Y= C oder T) und PflMI (5'-CCANNNN!NTGG-3', wobei N: A oder C oder G oder T) geschnitten wurde, sodass ein 514 bp langes Insert gewonnen wurde (Abb. 31). Auch hier wurde die PEST-Sequenz *in-frame* in den offenen Leserahmen des

Luciferase Gens eingefügt, indem das endogene Stopcodon C-terminal entfernt und ein Fusionsprotein zwischen Luciferase und PEST-Sequenz eingefügt wurden.

#### pLUC-ATXN3/Ca:



**Abbildung 31: Schematische Darstellung des Prinzips der Klonierung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes durch Einfügen einer PEST-Sequenz in das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt, das ein Fragment des ATXN3 Promotors enthält.** Aufgezeigt werden die spezifischen Schnittstellen der verwendeten Restriktionsendonukleasen SgrAI und PflMI sowie die Längen der ausgetauschten Sequenzen. Die ausgeschnittene Sequenz aus dem pLUC-ATXN3/Ca Vektor betrug 417 bp und reichte von Base 2605 bis Base 3022. Das in das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt inklonierte 514 bp lange PEST-Insert zog sich von Base 2605 bis Base 3119.

#### 3.3.3.2 Erfolgreiche Klonierung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes

Die Klonierung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes gelang mithilfe des pLUC-ATXN3/Ca Vektors und dem *gBlock* mit der PEST-Sequenz als Insert. Hierfür wurden 2 µg des pLUC-ATXN3/Ca Vektors mit 3 U PflMI und 3 U SgrAI in einem Gesamtvolumen von 30 µl geschnitten. Um das Insert für die Klonierung zu erhalten, wurden 150 ng des *gBlocks* mit 5 U PflMI und 5 U SgrAI in einem Gesamtvolumen von 30 µl geschnitten. Die Ligation gelang mit einem Ligationsansatz von 20 µl, einem 3:1 molaren Überschuss des Inserts über den Vektor und einem Verhältnis Vektor zu Insert von 1:15. Erfolgreich war die Klonierung beider Konstrukte bei einer Inkubation für 16 h bei 16 °C mit direkt angeschlossener Hitzeinaktivierung. Für die Transformation in DH5α-Zellen wurde das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes von 20 µl eingesetzt.

Durch eine Sanger-Sequenzierung konnte die Sequenz des klonierten pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes mit eingefügter PEST-Sequenz nachgewiesen werden (Abb. 32).

T820\_Luc-SgrAI-F

2521 P] [A] [E] [L] ] [E] [S] [I] [L] [L] [Q] [ H] [P] [N] [I] ] [F] [D] [A] [G] [V] [A] [  
 CCGCTGAATT GGAATCGATA TTGTTA**CAAC ACCCCAACAT CTTCGAC**GCG GGCCTGGCAG  
 GGCGACTTAA CCTTAGCTAT AACAAAT**GTTG TGGGGTTGTA GAAGCTG**GCG CCGCACCGTC

SgrAI

2581 G] [L] [P] [D] ] [D] [D] [A] [G] [E] [L] [ P] [A] [A] [V] ] [V] [V] [L] [E] [H] [G] [  
 GTCTTCCCGA CGATGAC**CGCC GCGG**AGCTGC CCGCCGAGT CGTCGTGCTG GAACACGGTA  
 CAGAAGGGCT GCTACT**GCGG CCGC**TCGACG GCGGGCGTCA GCAGCACGAC CTTGTGCCAT

2641 K] [T] [M] [T] ] [E] [K] [E] [I] [V] [D] [ Y] [V] [A] [S] ] [Q] [V] [T] [T] [A] [K] [  
 AAACCATGAC CGAGAAGGAG ATCGTGGACT ATGTGGCCAG CCAGGTTACA ACCGCCAAGA  
 TTTGGTACTG GCTCTTCCTC TAGCACCTGA TACACCGGTC GGTCCAATGT TGGCGGTCTC

2701 K] [L] [R] [G] ] [G] [V] [V] [F] [V] [D] [ E] [V] [P] [K] ] [G] [L] [T] [G] [K] [L] [  
 AGCTGCGCGG TGGTGTGTG TTCGTGGACG AGGTGCCTAA AGGACTGACC GGCAAGTTGG  
 TCGACGCGCC ACCACAACAC AAGCACCTGC TCCACGGATT TCCTGACTGG CCGTTCAACC

2761 D] [A] [R] [K] ] [I] [R] [E] [I] [L] [I] [ K] [A] [K] [K] ] [G] [G] [K] [I] [A] [V] [  
 ACGCCCGCAA GATCCGCGAG ATTCTCATTA AGGCCAAGAA GGGCGGCAAG ATCGCCGTGA  
 TCGGGCGGTT CTAGGCGCTC TAAGAGTAAT TCCGGTTCTT CCCGCCGTC TAGCGGCACT

PEST

2821 N] [S] [H] [G] ] [F] [P] [P] [E] [V] [E] [ E] [Q] [A] [A] ] [G] [T] [L] [P] [M] [S] [  
**ATTCTCACGG CTTCCCTCCC GAGGTGGAGG AGCAGGCCGC CGGCACCCTG CCCATGAGCT**  
**TAAGAGTGCC GAAGGGAGG CTCCACCTCC TCGTCCGGCG GCCGTGGGAC GGGTACTCGA**

PEST

2881 C] [A] [Q] [E] ] [S] [G] [M] [D] [R] [H] [ P] [A] [A] [C] ] [A] [S] [A] [R] [I] [N] [  
**GCGCCAGGA GAGCGGCATG GATAGACACC CTGCTGCTTG CGCCAGCGCC AGGATCAACG**  
**CGCGGGTCCT CTCGCCGTAC CTATCTGTGG GACGACGAAC GCGGTCGCGG TCCTAGTTGC**

XbaI

2941 V] [\*]  
**TC**TAAGGCCG CGACT**CTAGA** GTCGGGGCGG GCCCGGCCGC TTCGAGCAGA CATGATAAGA  
**AG**ATTCCGGC GCT**GAGATCT** CAGCCCCGCC CGGGCCGGCG AAGCTCGTCT GTACTATTCT

3001 TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAAC T AGAATGCAGT GAAAAAATG CTTTATTGT  
 ATGTAAC TACAAACCTG T TGGTGTGA TCTTACG TCA CTTTTTTTAC GAAATAAACA

```

3061  GAAATTTGTG ATGCTATGTC TTTATTTGTA ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC
      CTTTAAACAC TACGATAACG AAATAAACAT TGGTAATATF CGACGTTATF TGTTC AATTG

      PfIMI

3121  CAACCTATGG AACTGATGAA TGGGAGCAGT GGTGGAATGC CTTTAATGAG GAAAACCTGT
      GTTGGATACC TTGACTACTT ACCCTCGTCA CCACCTTACG GAAATTACTC CTTTTGGACA

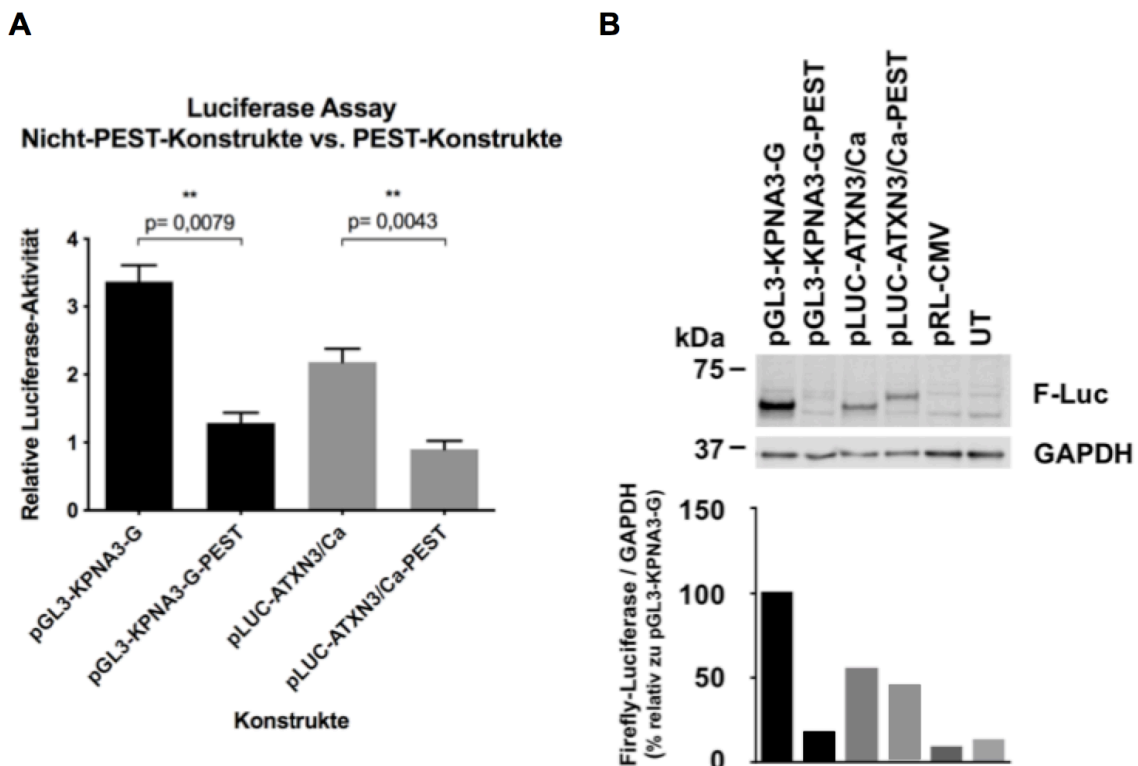
```

**Abbildung 32: Ausschnitt der Sequenz des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes mit Strang (von 5' nach 3') und Gegenstrang (von 3' nach 5').** Die Zahlen an der linken Seite geben die genaue Nummer der Basenpaarposition innerhalb des Konstruktes an. Es sind die genauen Bindestellen der Restriktionsenzyme SgrAI, PfIMI (in grün) und XbaI (in grau) sowie die Bindestelle des für die Sequenzierung notwendigen Primers T820\_Luc-Sgral-F (in blau) angegeben. In rot ist die eingefügte PEST-Sequenz markiert. Über der Sequenz werden die Aminosäuren (in lila) als [Aminosäure] angegeben, die von jeweils einem Basentriplett kodiert werden. [\*] markiert hierbei das Stopcodon TAA.

### 3.3.4 PEST-Konstrukte senken im Luciferase Assay und Western-Blot signifikant die Halbwertszeit der Luciferase.

Nach der erfolgreichen Sequenzierung wurden die neu klonierten PEST-Konstrukte in einem Luciferase Assay eingesetzt. Hierfür wurden die interne Kontrolle pRL-CMV mit jeweils einem Nicht-PEST-Konstrukt (pGL3-KPNA3-G oder pLUC-ATXN3/Ca) oder einem PEST-Konstrukt (pGL3-KPNA3-G-PEST oder pLUC-ATXN3/Ca-PEST) in HEK-293T Zellen kotransfiziert und für 48 h bei 37 °C inkubiert, bevor das Luciferase Assay durchgeführt wurde (s. 2.4.3.2). Mithilfe des Luciferase Assays konnte gezeigt werden, dass die HWZ der Luciferase durch die PEST-Konstrukte signifikant herabgesetzt werden konnte. Das pGL3-KPNA3-G Signal war 2,6-fach stärker als das seines PEST-Konstruktes, während das pLUC-ATXN3/Ca Signal 2,4-fach stärker war als das des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes (Abb. 33 A). Auch im Western-Blot konnte eine Reduktion der Firefly-Luciferase durch die PEST-Konstrukte beobachtet werden (Abb. 33 B). Hierbei waren die transfizierten Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert worden (s. 2.4.2.1). Es wurde die Firefly-Luciferase detektiert, die normalerweise eine Größe von 61 kDa aufweist (Sigma-Aldrich). Durch das einklonierte PEST-Konstrukt (123 bp) wurde die Firefly-Luciferase um 41 Aminosäuren verlängert, sodass die Molekülmasse der Firefly-Luciferase

mit eingesetzter PEST-Sequenz ungefähr 65,51 kDa betrug (die mittlere Molekülmasse einer Aminosäure liegt bei 0,11 kDa (Rehm und Letzel 2016)). Im Western-Blot zeigte das pGL3-KPNA3-G Konstrukt ein 5,8-fach stärkeres Signal als das des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes mit einklonierter PEST-Sequenz. Das pLUC-ATXN3/Ca Signal war hingegen 1,2-fach stärker als das seines PEST-Konstruktes (Abb. 33 B).



**Abbildung 33: Auswirkungen einer zusätzlichen C-terminalen PEST-Sequenz auf die Halbwertszeit der Firefly-Luciferase (F-Luc).** **A)** Mithilfe eines Luciferase Assays konnte gezeigt werden, dass die PEST-Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors (pGL3-KPNA3-G-PEST) oder *ATXN3* Promotors (pLUC-ATXN3/Ca-PEST) wie erwartet die Relative Luciferase-Aktivität signifikant senken gegenüber den Nicht-PEST-Konstrukten (pGL3-KPNA3-G und pLUC-ATXN3/Ca). Hierbei war das pGL3-KPNA3-G Signal 2,6-fach bzw. das pLUC-ATXN3/Ca Signal 2,4-fach stärker als das des jeweiligen PEST-Konstruktes pGL3-KPNA3-G-PEST bzw. pLUC-ATXN3/Ca-PEST. Inkubation von transfizierten HEK-293T für 48 h bei 37 °C. Technische Replikat= 5. Mann Whitney U-Test. **B)** Auch im Western-Blot konnte gezeigt werden, dass die PEST-Konstrukte wie erwartet die Relative Luciferase-Aktivität signifikant senken. Hierbei war das pGL3-KPNA3-G Signal 5,8-fach bzw. das pLUC-ATXN3/Ca Signal 1,2-fach stärker als das des jeweiligen PEST-Konstruktes pGL3-KPNA3-G-PEST bzw. pLUC-ATXN3/Ca-PEST. Sowohl der pRL-CMV Vektor (Konstrukt mit Renilla-Luciferase) als auch die untransfizierten Zellen (UT) exprimieren keine Firefly-Luciferase (F-Luc). Inkubation von transfizierten HEK-293T für 24 h bei 37 °C. Primärer AK: Anti-Luciferase (gegen Firefly-Luciferase (F-Luc), 1:2000 verdünnt; Sigma-Aldrich,

Darmstadt, D). Ladekontrolle: GAPDH (1:2500 verdünnt; LI-COR Biotechnology, Bad Homburg, D). Die quantifizierte Expression des pGL3-KPNA3-G Konstruktes im Western-Blot wurde auf 1 normalisiert.

### **3.4 Durchführung eines Medikamenten-Screenings zur Testung von der Wirkung elf unterschiedlicher Wirkstoffe auf die KPNA3 Promotoraktivität**

In vorherigen Experimenten identifizierte Dr. Zijian Wang unterschiedliche Wirkstoffe, die eine Auswirkung auf die Translokation von Ataxin-3 zeigten (Wang 2015). In Anbetracht dieser Tatsache und den Erkenntnissen zur Transportfunktion von KPNA3 stellte sich die Frage, ob diese Wirkungseffekte durch eine Beeinflussung des *KPNA3* Gens oder KPNA3 Proteins zustande kommen könnten. In diesem Zusammenhang sollte ein Medikamenten-Screening schrittweise etabliert und optimiert werden, mit dessen Hilfe die Wirkung unterschiedlicher Wirkstoffe auf die *KPNA3* Promotoraktivität gemessen werden konnte.

#### **3.4.1 Zu den Wirkstoffen**

Es wurden elf Wirkstoffe getestet, die bereits von der *Food and Drug Administration* (FDA; Silver Spring, Maryland, USA) zugelassen wurden (Tab. 36).

**Tabelle 36: Auflistung der untersuchten Wirkstoffe mit Informationen zu den Wirkstofftypen, den Wirkmechanismen, den klinischen Einsätzen und der Fähigkeit zur Passage der Blut-Hirn-Schranke (BHS).** Die Angabe zur Passage der BHS ist in der Hinsicht von Relevanz, als dass Medikamente, die als mögliche Kandidaten für die Therapie der SCA3 in Frage kommen, *in vivo* auch an ihren Wirkort gelangen sollten. (Basierend auf PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH).

<b>Wirkstoff-name</b>	<b>Wirkstofftyp</b>	<b>Wirk-mechanismus</b>	<b>Klinischer Einsatz</b>	<b>Passage der BHS</b>
<b>Divalproex Sodium</b>	HDAC-Inhibitor (1:1: Valproat: Valproinsäure (VPA))	Inhibierung der Deacetylierung von Histonen, Inhibierung der GABA-Transaminase, Inaktivierung spannungsabhängiger	Epilepsie, manische Episode bei Bipolarer Störung, Migräneprophylaxe	Ja

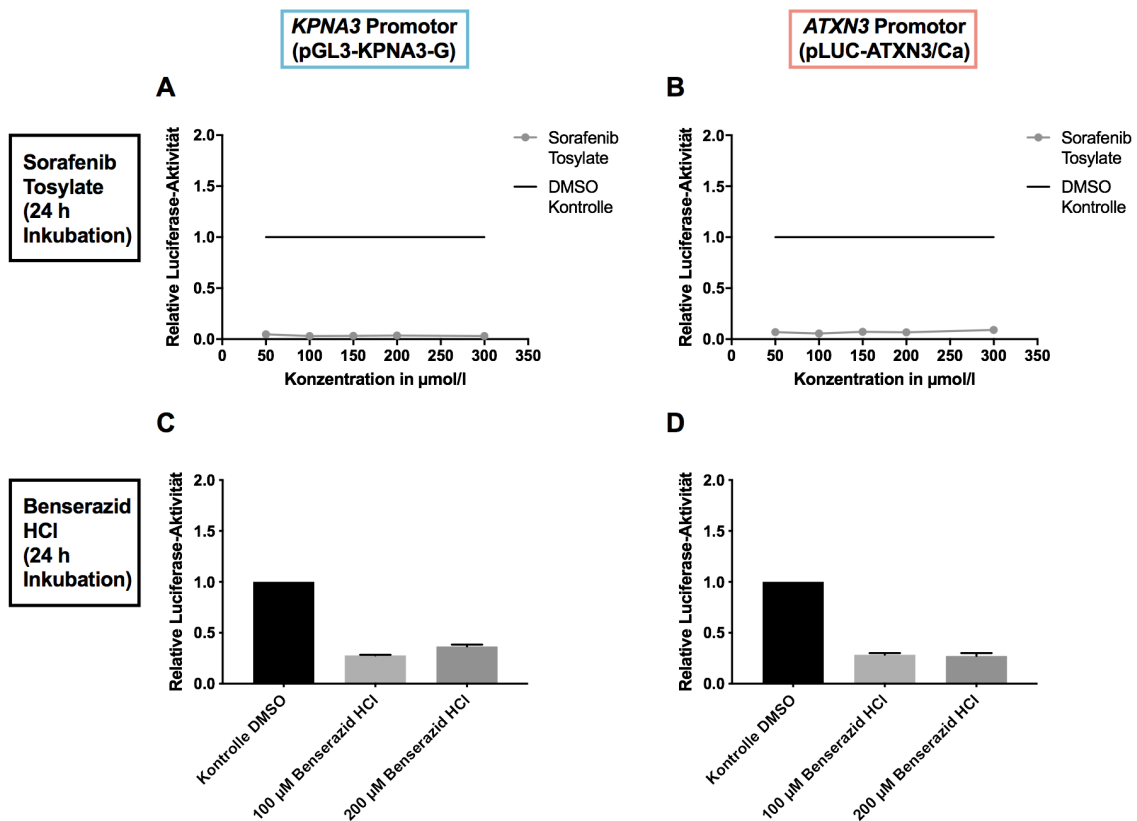
		Natrium-Kanäle?		
<b>Natriumbutyrat</b>	HDAC-Inhibitor	Kompetitive Bindung der Zinkseiten der Klasse I und Klasse II Histone-Deacetylasen	Regeneration der Darmschleimhaut, Verarbeitungshilfsmittel in Nahrungproduktion	Ja
<b>Sorafenib Tosylate</b>	Multi-Kinase-Inhibitor	Inhibition der Raf-Kinase mit Blockade der Raf-Signalkaskade, Inhibierung des VEGF ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> ) - Signalweges	Hepatozelluläreskarzinom, metastasiertes Schilddrüsenkarzinom, Nierenzellkarzinom	Ja
<b>Benserazid HCl</b>	L-DOPA-Decarboxylase-Inhibitor	Hemmung der Konversion von Levodopa zu Dopamin in der Peripherie	M. Parkinson, Restless-Legs-Syndrom	Nein
<b>Artemether</b>	Anti-protozoikum: Antimalaria Mittel	Freisetzung freier Radikale	Behandlung von resistenten Plasmodium falciparum-Stämmen	Ja
<b>Clotrimazol</b>	Antimykotikum	Hemmung der Ergosterolsynthese: Schädigung des Membranaufbaus	Pilzinfektionen	Ja
<b>Bleomycinsulfat</b>	Glykopeptid-Antibiotikum und Antikancerogenes Mittel	Zytostatikum: Veränderung der nukleären Funktion und der Transkription	Chemotherapie	Nein
<b>Furosemid</b>	Schleifendiuretikum	Hemmung des Na-K-2Cl Symporters	Herzinsuffizienz, Ödeme	Nein
<b>Zolmitriptan</b>	Triptan: Selektiver 5-HT <sub>1B</sub> - und 5-HT <sub>1D</sub> -Rezeptor-Agonist	Serotonin-Agonismus	Akute Migräne	Ja

<b>Rizatriptanbenzoat</b>	Triptan: Selektiver 5-HT1B- und 5-HT1D-Rezeptor-Agonist	Serotonin-Agonismus	Akute Migräne	Ja
<b>Disulfiram</b>	Aldehyddehydrogenase-Inhibitor	Akute Sensitivität gegenüber Alkohol	Chronischer Alkoholismus	Ja

### 3.4.2 Etablierung des Medikamenten-Screenings

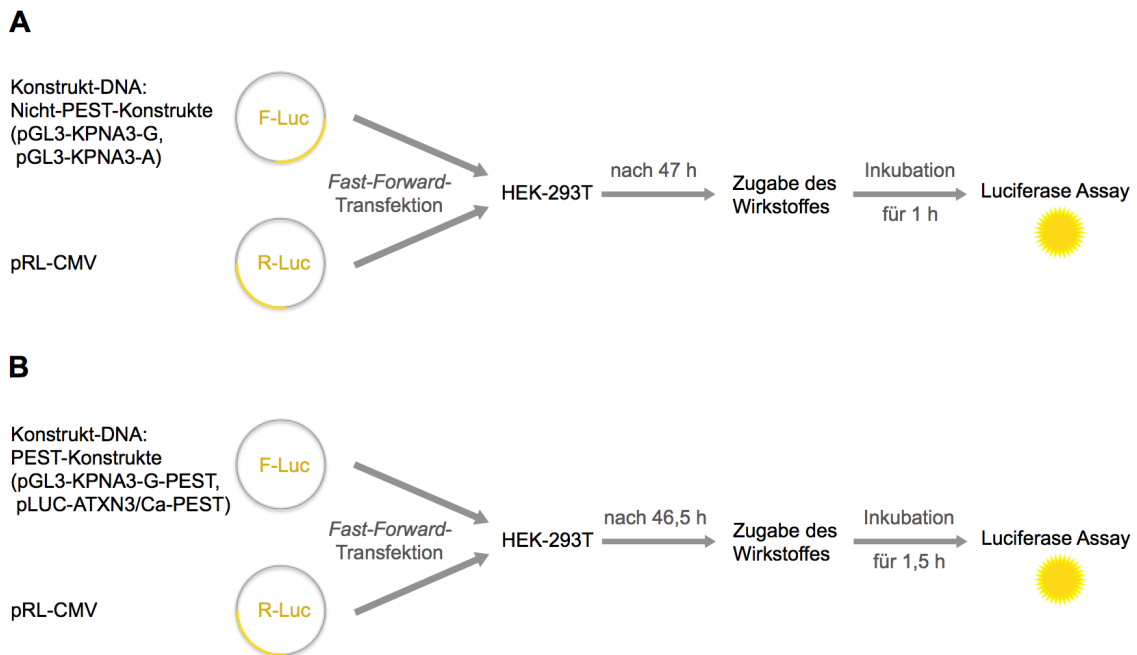
Um beurteilen zu können, ob diese Wirkstoffe Auswirkungen auf die *KPNA3* Promotoraktivität haben, mussten mehrere Schritte in der Versuchsdurchführung des Medikamenten-Screenings schrittweise etabliert werden. Das Medikamenten-Screening wurde in 384-Well-Platten durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen mit einer Konstrukt-DNA, die eine Firefly-Luciferase (F-Luc) exprimiert, und der internen Kontrolle pRL-CMV, die eine Renilla-Luciferase (R-Luc) exprimiert, kotransfiziert. Die Zellen, die mit den PEST-Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST und pLUC-ATXN3/Ca-PEST transfiziert wurden, wurden in den hier dargestellten Ergebnissen in einem Verhältnis von F-Luc zu R-Luc von 8:1 transfiziert. Die Nicht-PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A wurden in einem Verhältnis von 40:1 zum pRL-CMV Konstrukt eingesetzt (s. 3.1.5). Wie in 2.6.2 beschrieben, wurden unterschiedliche Verdünnungsmethoden ausprobiert, wobei die Untersuchung größerer Konzentrationsbereiche durch die Herstellung von Verdünnungsreihen umgesetzt wurde.

Im Rahmen der Etablierung wurden auch unterschiedliche Inkubationszeiten der transfizierten Zellen mit den Wirkstoffen ausprobiert. In einem Versuchsansatz wurden transfizierte Zellen mit einigen Wirkstoffen für 24 h inkubiert. Hierbei fiel auf, dass vor allem bei Sorafenib Tosylate (Abb. 34 A) und Benserazid HCl (Abb. 34 B) so niedrige absolute Werte gemessen wurden, dass davon auszugehen war, dass die Wirkstoffe toxische Effekte auf die Zellen hatten. Aus diesem Grund wurde der Inkubationszeitraum von 24 h als eindeutig zu lang für die Durchführung des Medikamenten-Screenings gewertet.



**Abbildung 34: Luciferase Assays, bei denen transfizierte Zellen mit Sorafenib Tosylate (A und B) und Benserazid HCl (C und D) für 24 h inkubiert wurden.** Dem pGL3-KPNA3-G Konstrukt (mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors) links (A und C) ist das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt (mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors) rechts (B und D) gegenübergestellt. Als Kontrolle wurden HEK-293T Zellen für 24 h nur mit DMSO behandelt. Bei der Behandlung der Zellen mit den Wirkstoffen wurden sehr geringe absolute Werte gemessen, sodass von toxischen Effekten ausgegangen werden muss. Die hier gezeigten deutlich geringeren Werte der Relativen Luciferase-Aktivität sind somit als Ausdruck einer Toxizität auf die Zellen zu interpretieren. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. Technische Replikate = 3.

Da durch die Klonierung der PEST-Sequenz in die Konstrukte die HWZ der Luciferase auf ca. 45 min gesenkt wurde, wurden die PEST-Konstrukte in den im Folgenden dargestellten Ergebnissen für 90 min mit den Wirkstoffen inkubiert, sodass die Inkubationszeit die Länge zweier Luciferase HWZ umfasste (Abb. 35 B). Die im Folgenden gezeigten Auswertungen der Nicht-PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A wurden hingegen für 60 min mit den Wirkstoffen inkubiert (Abb. 35 A). Dabei wurde stets nach insgesamt 48 h nach der Transfektion der Zellen das Luciferase Assay durchgeführt.

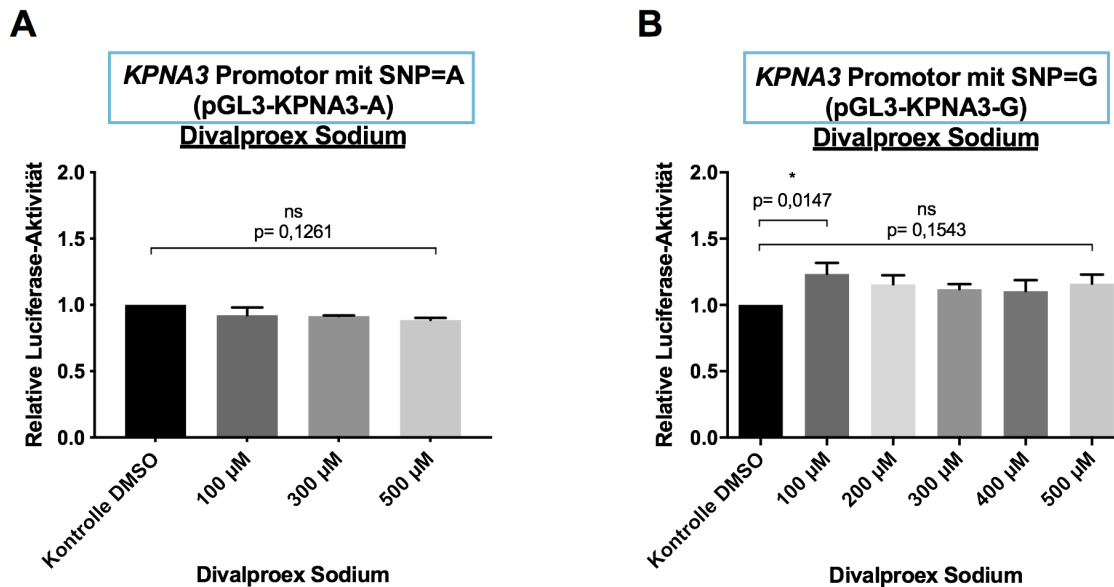


**Abbildung 35: Zeitliche Abfolge der Versuchsdurchführung des Medikamenten-Screenings.** **A)** Die Nicht-PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A wurden mit der internen Kontrolle pRL-CMV durch eine *Fast-Forward* Transfektion in HEK-293T Zellen kotransfiziert, für 47 h lang inkubiert, um dann die Wirkstoffe zugeben zu können. Nach einer Inkubation von 1 h wurde das Luciferase Assay durchgeführt. **B)** Für die PEST-Konstrukte pGL3-KPNA3-G-PEST und pLUC-ATXN3/Ca-PEST war die Durchführung die gleiche, wobei hier die Zellen 1,5 h lang mit den Wirkstoffen inkubiert wurden, und somit die Inkubation nach der Transfektion bis zur Wirkstoffzugabe nur 46,5 h betrug.

### 3.4.3 Divalproex Natrium zeigt eine vom SNP rs11618521 abhängige Modulation der *KPNA3* Promotoraktivität.

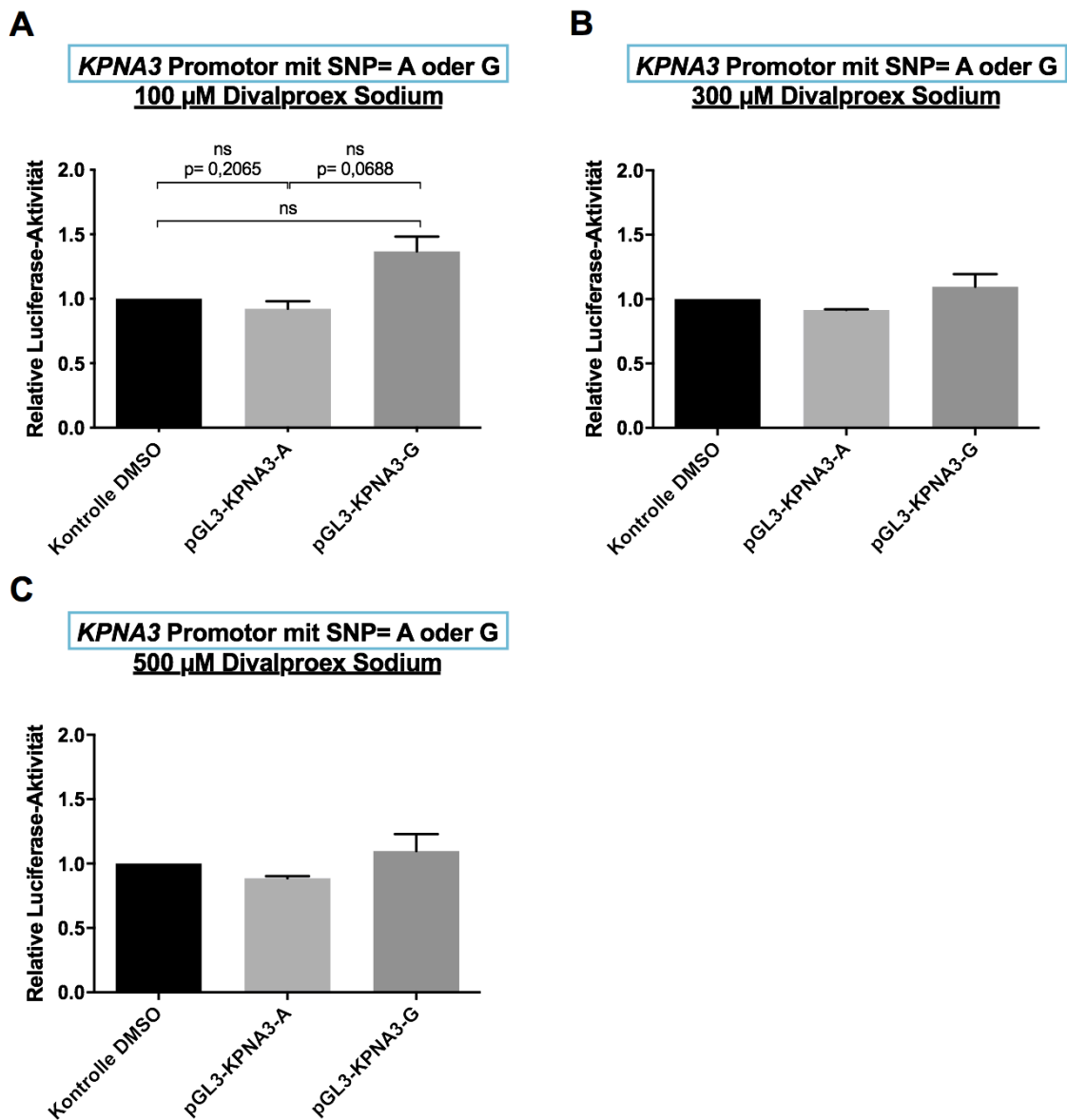
Unter den zu testenden Wirkstoffen zählte der Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) Divalproex Natrium, eine 1:1- Mischung aus Valproat und Valproinsäure (VPA) (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH). Um die mögliche Wirkung von Divalproex Natrium auf den *KPNA3* Promotor zu testen, wurden das pGL3-KPNA3-G und pGL3-KPNA3-A Konstrukt verwendet, die beide ein Fragment des *KPNA3* Promotors enthalten und sich nur in dem Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 voneinander unterscheiden, indem im pGL3-KPNA3-G Vektor ein Guanin und im pGL3-KPNA3-A Vektor ein Adenin an dieser Stelle vorliegen (s. 3.1.1).

Beim Einsatz des pGL3-KPNA3-G Konstruktes mit dem SNP= G konnte eine signifikante Erhöhung der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei der Zugabe von 100  $\mu$ M Divalproex Natrium beobachtet werden (Abb. 36 B). Interessanterweise wurde im Gegensatz dazu bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes mit dem SNP= A eine Tendenz zur Abnahme der RLA beobachtet (Abb. 36 A).



**Abbildung 36: Luciferase Assays bei Zugabe von Divalproex Natrium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-A (A) und pGL3-KPNA3-G (B).** Beide Konstrukte enthalten ein Fragment des *KPNA3* Promotors und unterscheiden sich nur in dem SNP rs11618521, wobei im pGL3-KPNA3-A Konstrukt ein Adenin und im pGL3-KPNA3-G Konstrukt ein Guanin an dieser Stelle zu finden sind. Man sieht eine signifikante Zunahme der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle bei der Zugabe von 100  $\mu$ M Divalproex Natrium zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt (mit SNP= G) (B), während das pGL3-KPNA3-A Konstrukt (mit SNP= A) eine Tendenz zur Abnahme der RLA zeigt (A). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n (100  $\mu$ M)= 3; n (300  $\mu$ M)= 2; n (500  $\mu$ M)= 3. B): n (100  $\mu$ M)= 7; n (200  $\mu$ M)= 4; n (300  $\mu$ M)= 7; n (400  $\mu$ M)= 6; n (500  $\mu$ M)= 8. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

Der direkte Vergleich der gemessenen RLA bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A und des pGL3-KPNA3-G Vektors wurde dadurch möglich, dass beide Konstrukte innerhalb eines Luciferase Assays eingesetzt wurden (Abb. 37).



**Abbildung 37: Luciferase Assays bei Zugabe von 100 µM (A), 300 µM (B) und 500 µM (C) Divalproex Sodium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G.** Das pGL3-KPNA3-G Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors mit SNP= G) zeigt eine Tendenz zur Zunahme der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, während das pGL3-KPNA3-A Konstrukt (Fragment des *KPNA3* Promotors mit SNP= A) eher eine Tendenz zur Abnahme der RLA aufweist. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n (100 µM)= 3. B): n (300 µM)= 2. C): n (500 µM)= 3. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

Die mittels Kruskal-Wallis-Test analysierten Ergebnisse bei der Zugabe von 100 µM Divalproex Sodium zu den Konstrukten (Abb. 37 A) zeigten im Gesamtbild ein signifikantes Ergebnis von  $p= 0,0357$ . Durch den im Anschluss durchge-

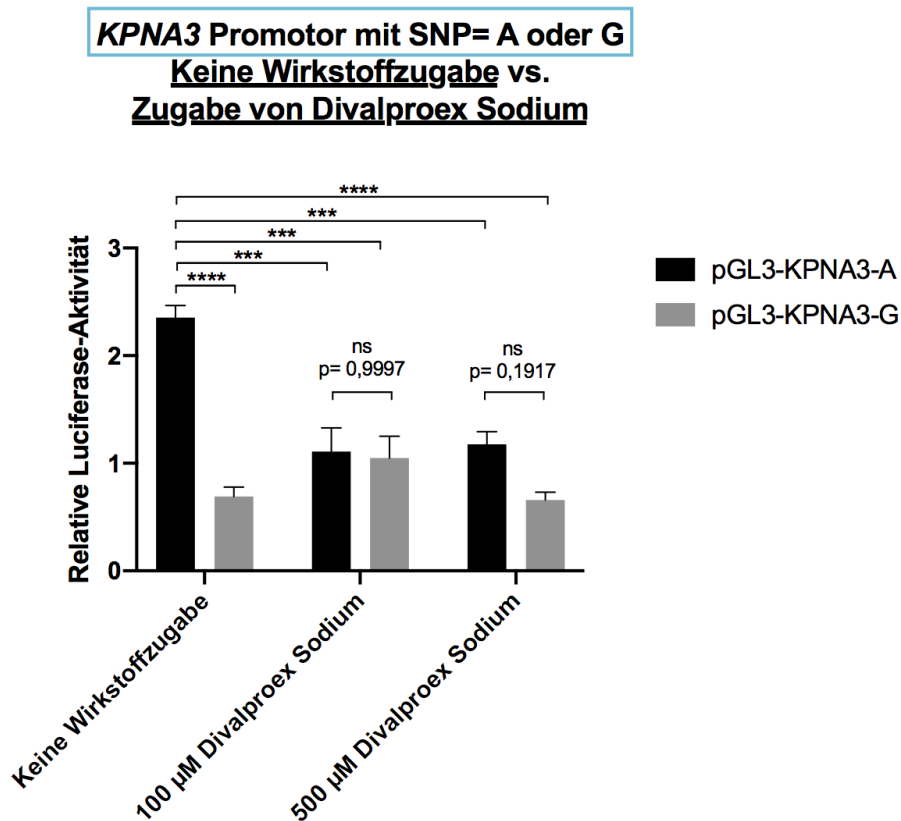
fürten Dunn's Post-hoc-Test konnten allerdings bei Vergleich jeweils zweier Gruppen miteinander keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Bei der Zugabe von 300  $\mu\text{M}$  (Abb. 37 B) und 500  $\mu\text{M}$  (Abb. 37 C) Divalproex Natrium zu den Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Allerdings kann durchaus bei der Zugabe der drei Konzentrationen von einer Tendenz zur Zunahme der RLA beim pGL3-KPNA3-G Konstrukt bzw. von einer Tendenz zur Abnahme der RLA beim pGL3-KPNA3-A Konstrukt im Vergleich zu der DMSO-Kontrolle gesprochen werden.

Interessant sind diese Beobachtungen vor allem vor dem Hintergrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Regulation der *KPNA3* Promotoraktivität durch den SNP rs11618521. Wie zuvor beschrieben, konnte gezeigt werden, dass es zu einer signifikant höheren Genexpression kam, wenn das pGL3-KPNA3-A Konstrukt, das an der Stelle des SNPs ein Adenin trägt, anstelle des pGL3-KPNA3-G Konstruktes mit SNP= G eingesetzt wurde (s. 3.2). Durch den direkten Vergleich von mit dem pGL3-KPNA3-A oder pGL3-KPNA3-G Vektor transfizierten Zellen, denen entweder kein Wirkstoff oder 100  $\mu\text{M}$  bzw. 500  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium zugegeben wurden, wurden wichtige Zusammenhänge deutlich (Abb. 38). Zum einen wurde analog zu den vorherigen Ergebnissen (s. 3.2) beobachtet, dass die Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes eine deutlich signifikant höhere ( $p < 0,0001$ ) RLA als bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G Konstruktes aufwies. Nach der Zugabe von Divalproex Natrium waren diese Unterschiede zwischen dem pGL3-KPNA3-A und dem pGL3-KPNA3-G Vektor nicht mehr messbar: Bei 100  $\mu\text{M}$  zeigten beide Konstrukte ähnliche Werte für die RLA; bei der Zugabe von 500  $\mu\text{M}$  war die RLA bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstrukt zwar höher als die des pGL3-KPNA3-G Konstruktes, allerdings waren hier die Unterschiede nicht mehr signifikant wie zuvor.

Die Zugabe von Divalproex Natrium führte hierbei bei der Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes zu einer signifikanten Abnahme der RLA im Vergleich zu den mit dem pGL3-KPNA3-A Vektor transfizierten Zellen, denen kein Wirkstoff zugesetzt worden war (bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium mit  $p = 0,0002$  und bei 500  $\mu\text{M}$  mit  $p = 0,0003$ ). Bei Verwendung des

pGL3-KPNA3-G Konstruktes wurden durch die Zugabe von Divalproex Natrium im Vergleich zu keiner Wirkstoffzugabe eine Tendenz zu einer Zunahme der RLA bei 100  $\mu\text{M}$  und kein Unterschied bei 500  $\mu\text{M}$  detektiert. Im Vergleich zu den mit dem pGL3-KPNA3-A Vektor transfizierten Zellen, zu denen kein Wirkstoff gegeben wurde, waren die RLA Werte allerdings immernoch signifikant niedriger (bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium mit  $p=0,0001$  und bei 500  $\mu\text{M}$  mit  $p<0,0001$ ).

Somit kann gesagt werden, dass durch die Zugabe von Divalproex Natrium Effekte nicht mehr messbar wurden, die zuvor bei keiner Wirkstoffinkubation zu deutlichen Unterschieden zwischen den Genexpressionen des pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G Konstruktes führten.



**Abbildung 38: Vergleich von mit dem pGL3-KPNA3-A (mit SNP= A) oder pGL3-KPNA3-G (mit SNP= G) transfizierten Zellen, zu denen entweder kein Wirkstoff oder 100  $\mu\text{M}$  bzw. 500  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium zugegeben wurden. Die beiden Konstrukte enthalten beide ein Fragment des *KPNA3* Promotors und unterscheiden sich nur im SNP rs11618521, indem im pGL3-KPNA3-A Konstrukt ein Adenin und im pGL3-KPNA3-G Konstrukt ein Guanin an dieser Stelle vorliegen. Wenn kein Wirkstoff zu den transfizierten Zellen gegeben wurde, war die gemessene Relative Luciferase-**

Aktivität (RLA) bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes deutlich signifikant höher ( $p < 0,0001$ ) als bei dem pGL3-KPNA3-G Konstrukt. Durch die Zugabe von Divalproex Natrium verschwanden diese deutlichen Unterschiede in den RLA Werten zwischen dem pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G Vektor. Hierbei führte die Zugabe von Divalproex Natrium bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes zu einer signifikanten Abnahme der RLA im Vergleich zu den mit dem pGL3-KPNA3-A Vektor transfizierten, ohne Wirkstoff inkubierten Zellen (bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium mit  $p = 0,0002$  und bei 500  $\mu\text{M}$  mit  $p = 0,0003$ ). Bei der Verwendung des pGL3-KPNA3-G Konstruktes wurden durch die Zugabe von Divalproex Natrium im Vergleich zu keiner Wirkstoffzugabe eine Tendenz zu einer Zunahme der RLA bei 100  $\mu\text{M}$  und kein Unterschied bei 500  $\mu\text{M}$  detektiert. Im Vergleich zu den mit dem pGL3-KPNA3-A Vektor transfizierten Zellen ohne Wirkstoffzugabe waren die RLA Werte allerdings immernoch signifikant niedriger (bei Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Divalproex Natrium mit  $p = 0,0001$  und bei 500  $\mu\text{M}$  mit  $p < 0,0001$ ). Durch die Zugabe von Divalproex Natrium wurden somit die deutlichen Unterschiede zwischen den Genexpressionen des pGL3-KPNA3-A und pGL3-KPNA3-G Konstruktes, die bei keiner Wirkstoffzugabe beobachtet wurden, nicht mehr messbar. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Bei Wirkstoffinkubation: Inkubation für 1 h. Technische Replikate= 3. Statistik: Einfaktorielle ANOVA gefolgt von Tukey's Post-hoc-Test.

#### 3.4.4 Die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Divalproex Natrium und Natriumbutyrat zeigen eine mögliche Wirkung auf die ATXN3 Promotoraktivität.

Für die Testung größerer Konzentrationsbereiche bei der Zugabe des Histon-Deacetylase-Inhibitors (HDACi) Divalproex Natrium wurden PEST-Konstrukte verwendet, in die zuvor eine PEST-Sequenz kloniert wurde (s. 3.3). Dem pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt mit einem Teil des *KPNA3* Promotors wurde der Vektor pLUC-ATXN3/Ca-PEST als Kontrolle gegenübergestellt, der einen Teil des *ATXN3* Promotors enthält (Abb. 39).

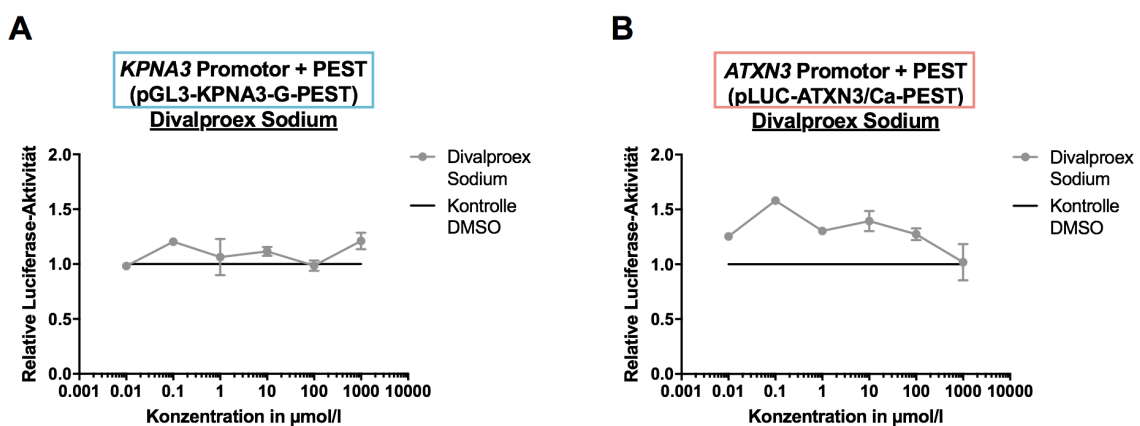


Abbildung 39: Luciferase Assays bei Zugabe von Divalproex Natrium zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). Während

das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt keine nennenswerten Veränderungen durch die Zugabe von Divalproex Natrium erzielte (A), zeigte sich für das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors eine Tendenz zu einer Zunahme der Relativen Luciferase-Aktivität (B). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1,5 h. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert.  $n(0,01; 0,1 \mu\text{M})=1$ ;  $n(1; 10; 100; 1000 \mu\text{M})=2$ . Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

Bei Zugabe von Divalproex Natrium zum pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt wurden keine detektierbaren Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen. Auch konnte die Zunahme der RLA, die bei Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  zum pGL3-KPNA3-G Vektor beobachtet wurde (Abb. 36 B), mit dem neu klonierten pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt nicht reproduziert werden (Abb. 39 A). Interessanterweise zeigten die Werte für das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors hingegen eine Tendenz zu einer Erhöhung der RLA bei Zugabe von Divalproex Natrium, obgleich keine signifikanten Ergebnisse gemessen werden konnten (Abb. 39 B).

Auch Natriumbutyrat gehört zu der Gruppe der HDACi und zeigte bei der Zugabe zum Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors, genauso wie Divalproex Natrium, eine Tendenz zu einer Erhöhung der RLA (Abb. 40 B). Beim pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt erkennt man die Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve, die dafür spricht, dass das Assay eine zuverlässige Messmethode darstellt (Abb. 40 A).

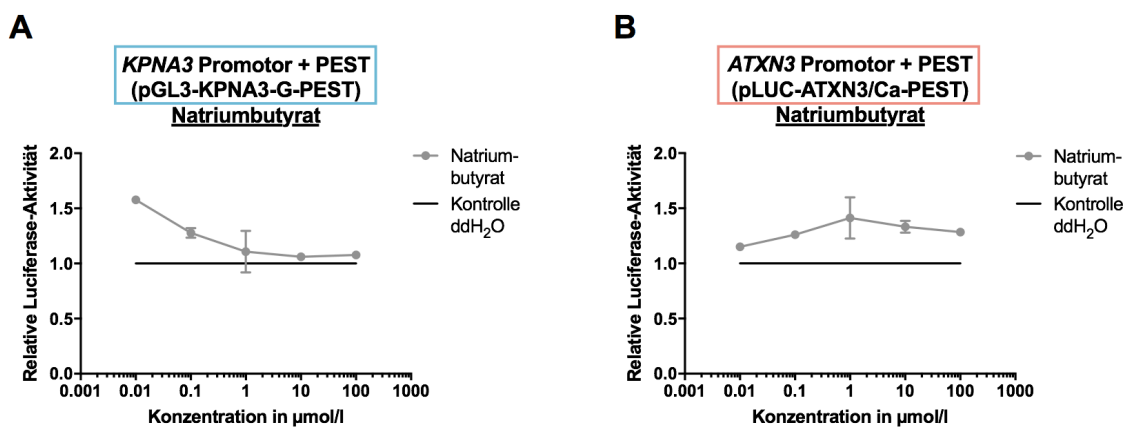


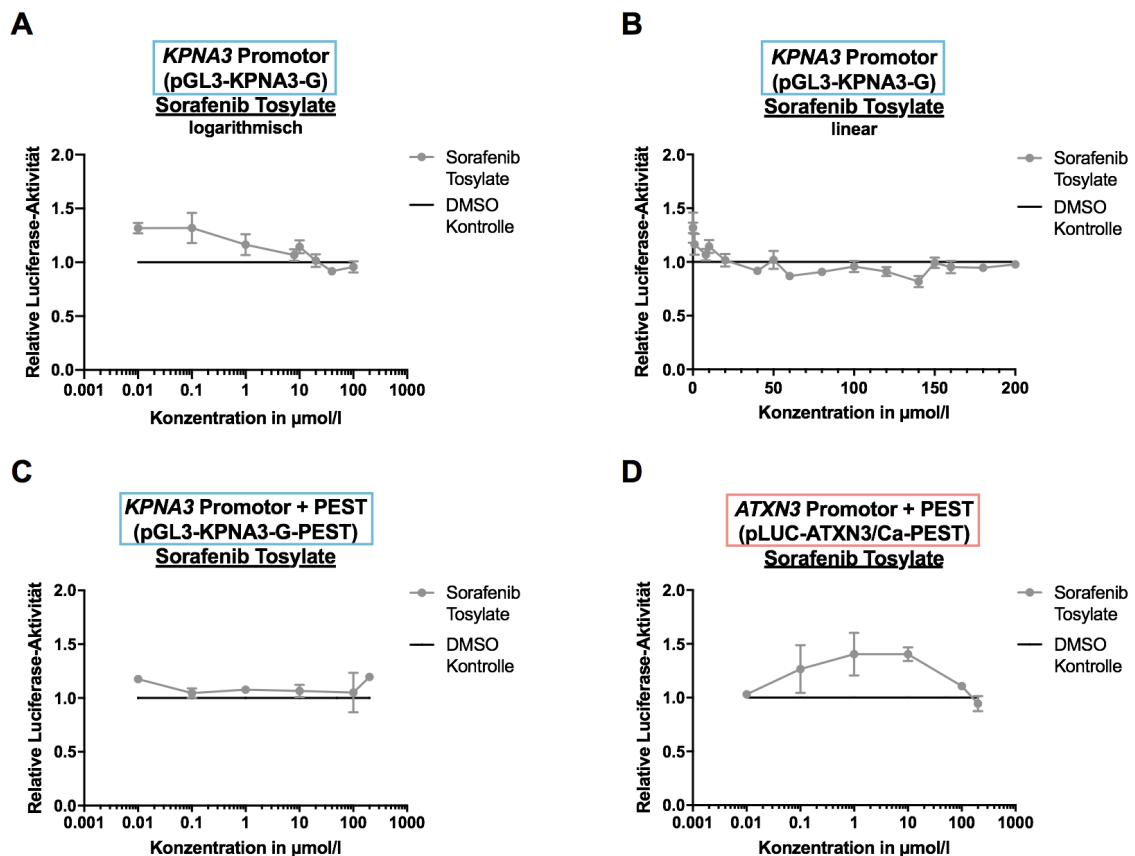
Abbildung 40: Luciferase Assays bei Zugabe von Natriumbutyrat zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B). Vor allem

bei **A** ähnelt das Schaubild einer Dosis-Wirkungs-Kurve, was als Hinweis für die Funktionalität und Verlässlichkeit des Luciferase Assays angesehen werden kann. Natriumbutyrat scheint bei Verwendung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST (Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors) Konstruktes eine Tendenz zur Steigerung der Relativen Luciferase-Aktivität aufzuweisen (**B**). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1,5 h. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. n (0,01  $\mu$ M)= 1; n (0,1; 1; 10; 100  $\mu$ M)= 2. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

#### **3.4.5 Sorafenib Tosylate zeigt eine mögliche Wirkung auf die *KPNA3* und *ATXN3* Promotoraktivitäten.**

Die Wirkung des Multi-Kinase-Inhibitors Sorafenib Tosylate auf den *KPNA3* und *ATXN3* Promotor wurde ebenfalls untersucht. In unseren Experimenten wiesen die Konzentrationen zwischen 40 und 150  $\mu$ M eine Tendenz zur Abnahme der RLA bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G Konstruktes mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors auf (Abb. 41 B). Die erhobenen Daten bei der Zugabe von Sorafenib Tosylate zum pGL3-KPNA3-G Vektor wurden mittels eines Kruskal-Wallis-Tests analysiert, der ein signifikantes Ergebnis von  $p= 0,0026$  aufzeigte. Der im Anschluss durchgeführte Dunn's Post-hoc-Test zeigte allerdings beim direkten Vergleich jeweils zweier Gruppen miteinander keine signifikanten Unterschiede.

Im Gegensatz zum pGL3-KPNA3-G Vektor konnte bei Verwendung des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstruktes mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors eine Tendenz zu einer erhöhten RLA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle gemessen werden (Abb. 41 D). Auch hier wurde ein signifikantes Ergebnis von  $p= 0,0349$  mittels Kruskal-Wallis-Tests gemessen, wobei der nachfolgende Dunn's Post-hoc-Test keine Signifikanzen beim Vergleich jeweils zweier Gruppen miteinander aufzeigte. Auffällig an der Kurve des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes ist, dass trotz der Verwendung des neu klonierten PEST-Konstruktes, das die HWZ der Luciferase herabsenken konnte, die tendenzielle Abnahme der RLA, nicht stärker sichtbar wurde, die zuvor bei dem pGL3-KPNA3-G Konstrukt ohne inklonierter PEST-Sequenz auffiel (Abb. 41 C).



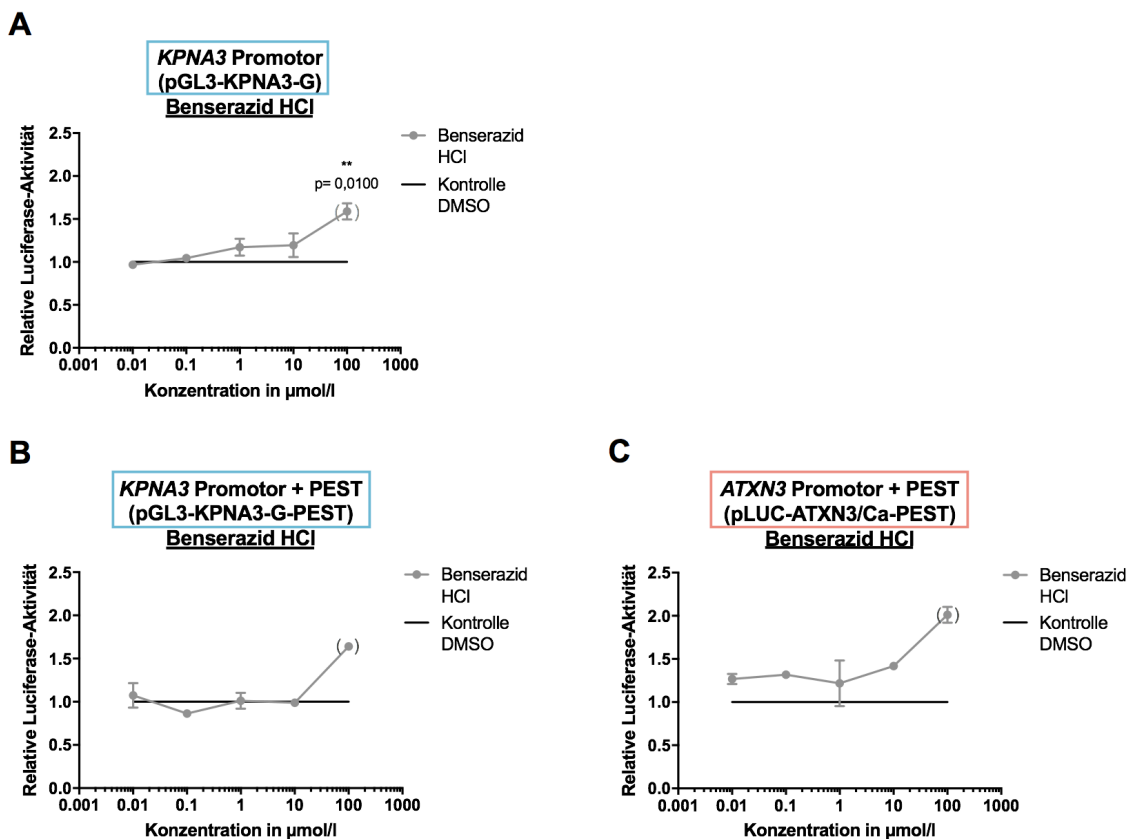
**Abbildung 41: Luciferase Assays bei Zugabe von Sorafenib Tosylate zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A, B), pGL3-KPNA3-G-PEST (C) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (D).** Bei Zugabe von Sorafenib Tosylate zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt sieht man zwischen 40 und 150  $\mu\text{M}$  eine Tendenz zur Abnahme der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) (A, B). Diese Abnahme ist bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes nicht sichtbar, obwohl das PEST-Konstrukt die Halbwertszeit der Luciferase herabsenkt (C). Das Konstrukt mit dem ATXN3 Promotor zeigt eine Tendenz zu einer erhöhten RLA (D). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h (A, B) und 1,5 h (C, D). Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen (mit Ausnahme von B). Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A) und B): n (0,01; 0,1; 1; 8; 20; 60  $\mu\text{M}$ )= 3; n (10; 80; 200  $\mu\text{M}$ )= 6; n (50  $\mu\text{M}$ )= 4; n (40; 120  $\mu\text{M}$ )= 7; n (100  $\mu\text{M}$ )= 10; n (140; 180  $\mu\text{M}$ )= 2; n (150; 160  $\mu\text{M}$ )= 5. C) und D): n (0,01  $\mu\text{M}$ )= 1; n (0,1; 200  $\mu\text{M}$ )= 2; n (1; 10; 100  $\mu\text{M}$ )= 3. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

### 3.4.6 Benserazid HCl und Artemether zeigen eine mögliche Wirkung auf die ATXN3 Promotoraktivität.

#### 3.4.6.1 Benserazid HCl

Durch die Zugabe des L-DOPA-Decarboxylase-Inhibitors Benserazid HCl zu den transfizierten Zellen wurden Graphen generiert, die Dosis-Wirkungs-Kurven

entsprachen (Abb. 42). Diese Tatsache spricht dafür, dass das Luciferase Assay funktioniert und verlässliche Ergebnisse erzeugt. Das PEST-Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors zeigte bei Zugabe von Benserazid HCl eine Tendenz zu einer erhöhten RLA (Abb. 42 C), während die Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors keine nennenswerten Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle aufwiesen (Abb. 42 A und B). Bei der Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  Benserazid HCl zu den Zellen wurden toxische Effekte beobachtet, wodurch auch die hohe Signifikanz bei Verwendung des pGL3-*KPNA3*-G Konstruktes erklärt werden kann (Abb. 42 A).

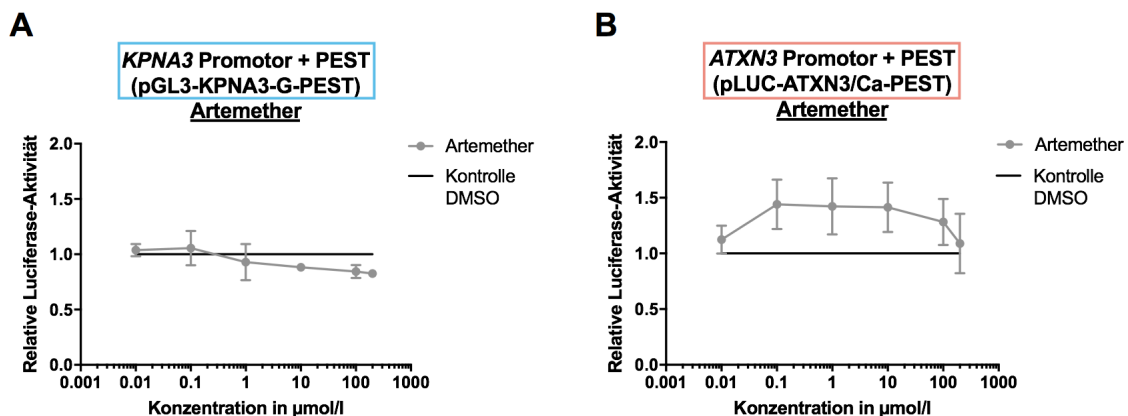


**Abbildung 42: Luciferase Assays bei Zugabe von Benserazid HCl zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (C).** Alle drei Schaubilder ähneln Dosis-Wirkungs-Kurven, was für die Funktionalität und Verlässlichkeit des Luciferase Assays spricht. Die Klammern „()“ um die Werte bei 100  $\mu\text{M}$  zeigen an, dass bei dieser Konzentration zum Teil toxische Reaktionen beobachtet wurden, wodurch auch die hohe Signifikanz bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G Vektors (mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors) erklärt wird (A). Das PEST-Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors zeigt bei Zugabe des Wirkstoffes eine Tendenz zu einer erhöhten Relativen Luciferase-Aktivität (C), während die Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors keine nennens-

werten Veränderungen gegenüber der DMSO-Kontrolle aufweisen (**A**, **B**). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h (**A**) und 1,5 h (**B**, **C**). Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n (0,01; 10  $\mu\text{M}$ )= 3; n (0,1; 1; 100  $\mu\text{M}$ ) = 4. B) und C): n = 2. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

### 3.4.6.2 Artemether

Bei der Zugabe des Antimalaria-Mittels Artemether zum pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors konnte eine Tendenz zu einer Zunahme der RLA beobachtet werden, die allerdings nicht signifikant war (Abb. 43 B). Beim pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors wurden für die Bereiche zwischen 0,01  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  keine Veränderungen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet, während zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  eine Tendenz zu einer Abnahme der RLA gemessen wurde (Abb. 43 A). Für das pGL3-KPNA3-G Konstrukt wurden nur einmalig die Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  getestet, die keine Veränderungen der Relativen Luciferase-Aktivität im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aufzeigten (hier nicht dargestellt).



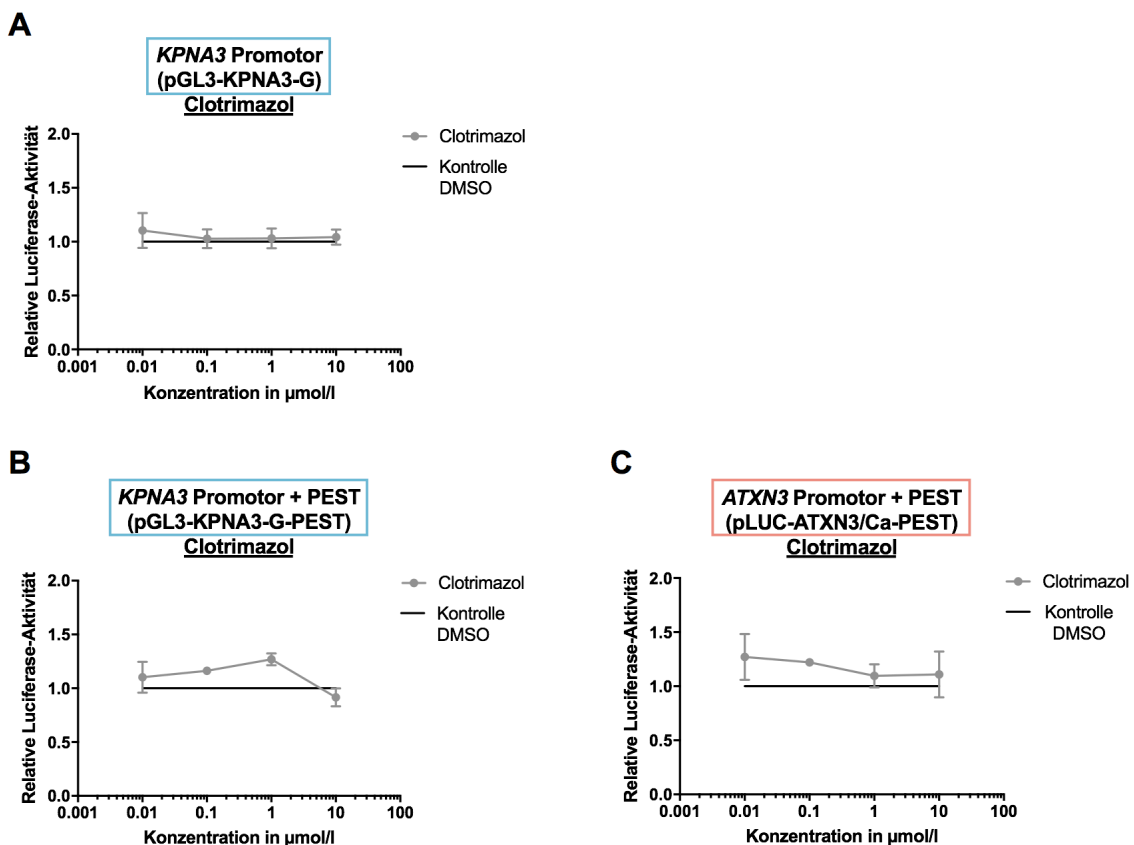
**Abbildung 43: Luciferase Assays bei Zugabe von Artemether zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B).** Auch wenn keine signifikanten Ergebnisse für das pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors beobachtet werden konnten, sah man doch eine Tendenz zur Steigerung der RLA (**B**), während es in den Bereichen zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  für das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors zu einer Tendenz zur Abnahme der RLA kam (**A**). Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1,5 h. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1

normalisiert. n (0,01; 200  $\mu$ M)= 2; n (0,1; 1; 10; 100  $\mu$ M)= 3. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

### 3.4.7 Ergebnisse weiterer getesteter Wirkstoffe: Clotrimazol, Bleomycin-sulfat, Furosemid, Zolmitriptan, Rizatriptanbenzoat und Disulfiram

#### 3.4.7.1 Clotrimazol

Bei der Zugabe des Antimykotikums Clotrimazol zum pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors und einklonierter PEST-Sequenz wurde eine Tendenz zu einer Zunahme der RLA bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M gemessen werden (Abb. 44 B), die allerdings bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G Vektors nicht bestätigt wurde (Abb. 44 A).



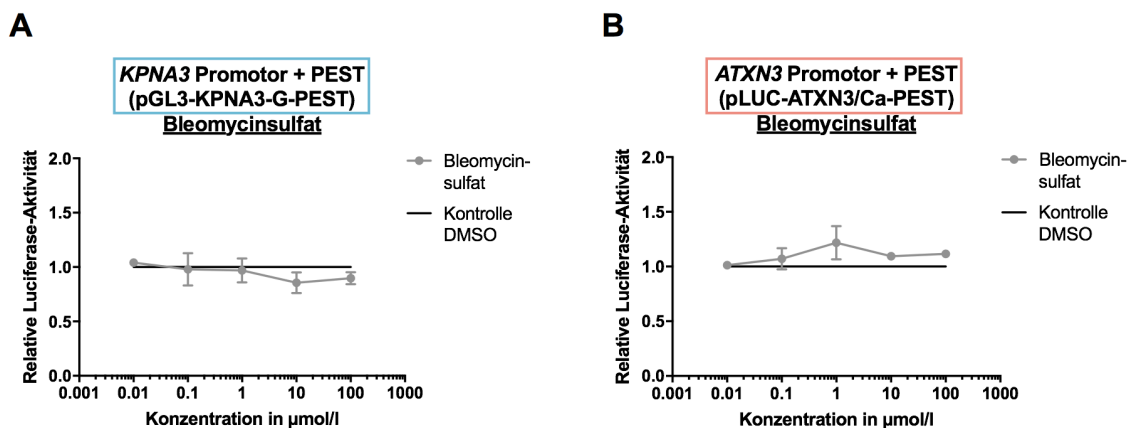
**Abbildung 44: Luciferase Assays bei Zugabe von Clotrimazol zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (C).** Außer einer Tendenz zur Erhöhung der Relativen Luciferase-Aktivität beim pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt (mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors) bei Zugabe von 1  $\mu$ M (B) und beim pLUC-ATXN3/Ca-PEST Konstrukt (mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors) bei Zugabe von 0,1  $\mu$ M (C), wurden keine weiteren

nennenswerten Veränderungen durch die Zugabe von Clotrimazol beobachtet (**A**, **B**, **C**). Aufgrund toxischer Prozesse musste die Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  aus der Auswertung genommen werden und wurde hier nicht dargestellt. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h (**A**) und 1,5 h (**B**, **C**). Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n = 4. B) und C): n (0,01; 0,1  $\mu\text{M}$ )= 2; n (1; 10  $\mu\text{M}$ )= 3. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

Für das Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors wurde bei der Zugabe von 0,1  $\mu\text{M}$  Clotrimazol eine leichte Tendenz zu einer Zunahme der RLA beobachtet, weitere Tendenzen einer Veränderung der RLA waren allerdings nicht messbar (Abb. 44 C). Die Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  musste aufgrund toxischer Werte aus der Auswertung genommen werden.

### 3.4.7.2 Bleomycinsulfat

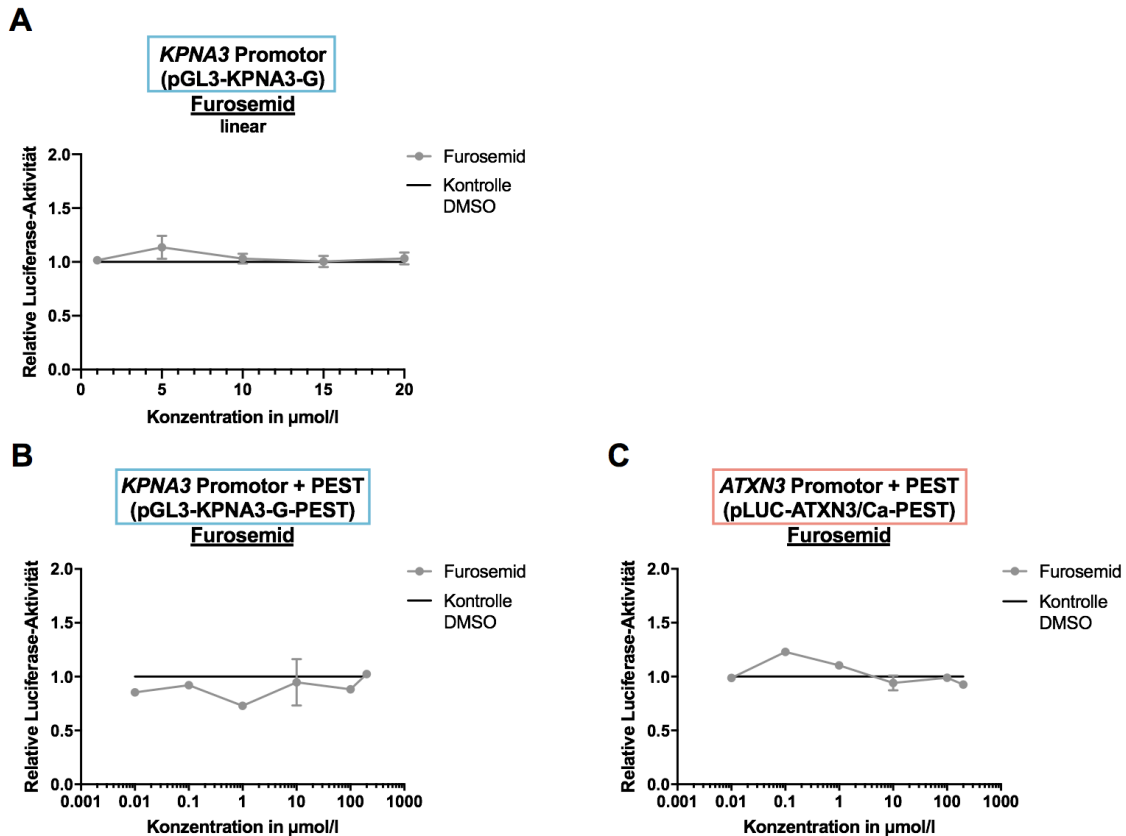
Die Zugabe des Glykopeptid-Antibiotikums und Zytostatikums Bleomycinsulfat zeigte sowohl beim pLUC-*ATXN3*/Ca-PEST als auch beim pGL3-*KPNA3*-G-PEST keine Unterschiede der RLA zur DMSO-Kontrolle, sodass eine Beeinflussung des *KPNA3* bzw. *ATXN3* Promotors sehr unwahrscheinlich erscheint (Abb. 45 A und B).



**Abbildung 45: Luciferase Assays bei Zugabe von Bleomycinsulfat zu den Konstrukten pGL3-*KPNA3*-G-PEST (A) und pLUC-*ATXN3*/Ca-PEST (B).** Es sind keine Tendenzen zu erkennen, die Rückschlüsse auf eine Beeinflussung des *KPNA3* oder *ATXN3* Promotors zulassen könnten. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1,5 h. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. n (0,01  $\mu\text{M}$ )= 1; n (0,1; 1; 10; 100  $\mu\text{M}$ )= 2. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

### 3.4.7.3 Furosemid

Die Zugabe des Schleifendiuretikums Furosemid zeigte sowohl beim pGL3-KPNA3-G Konstrukt (Abb. 46 A) als auch bei den PEST-Konstrukten (Abb. 46 B und C) keine relevanten Veränderungen zur DMSO-Kontrolle.

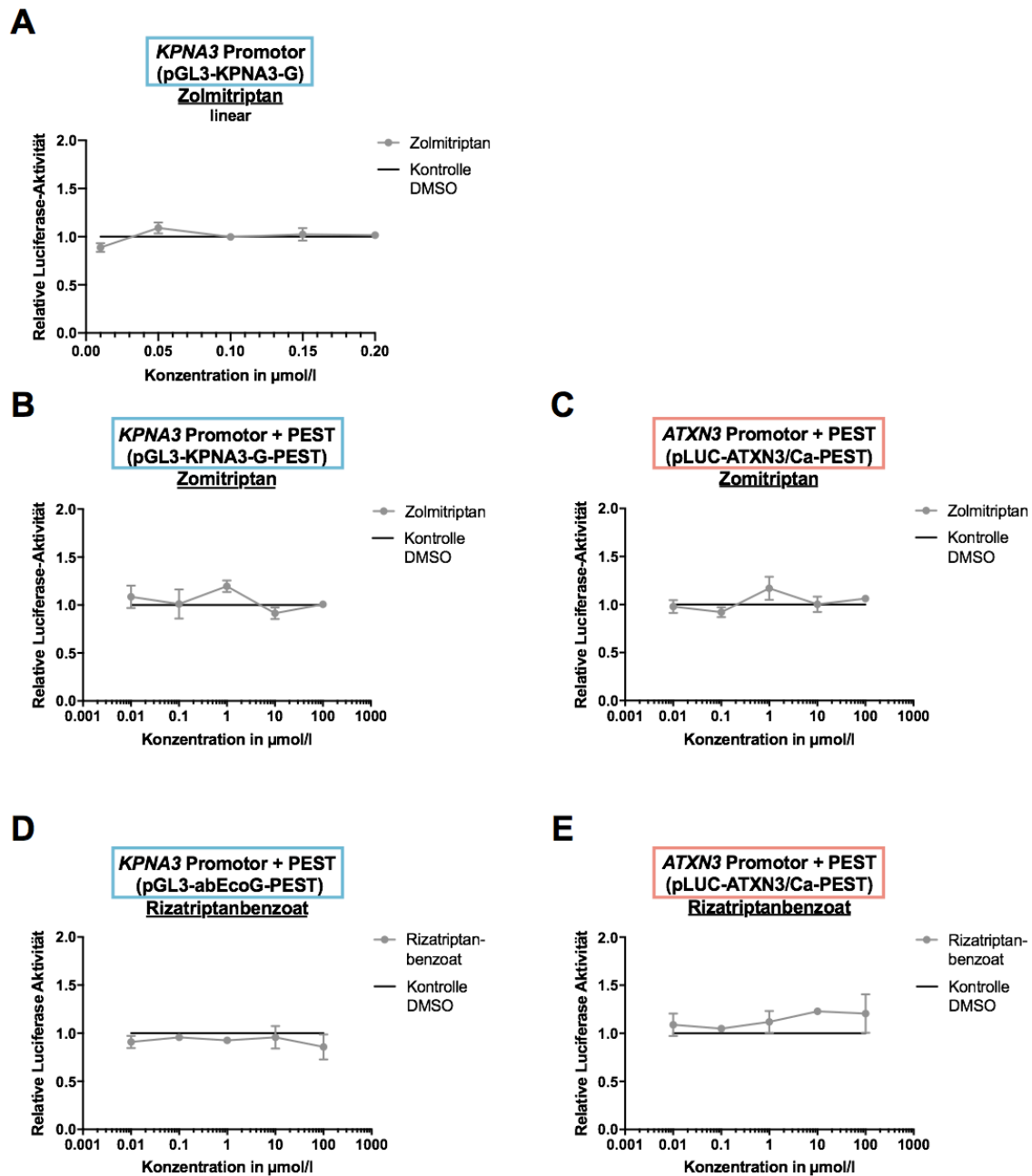


**Abbildung 46: Luciferase Assays bei Zugabe von Furosemid zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (C).** Es wurden keine nennenswerten Veränderungen der RLA hinsichtlich der DMSO-Kontrolle beobachtet. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h (A) und 1,5 h (B, C). Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen (mit Ausnahme von A). Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n (1; 5 µM)= 4; n (10 µM)= 9; n (15 µM)= 6; n (20 µM)= 6. B): n (0,01; 0,1; 1, 100, 200 µM)= 1; n (10 µM)= 2. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

### 3.4.7.4 Zolmitriptan und Rizatriptanbenzoat

Des Weiteren wurden zwei selektive 5-HT<sub>1B</sub>- und 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptor-Agonisten, Zolmitriptan und Rizatriptanbenzoat, untersucht. Bei der Zugabe von Zolmitriptan zum pGL3-KPNA3-G (Abb. 47 A), pGL3-KPNA3-G-PEST (Abb. 47

B) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (Abb. 47 C) wurden keine Veränderungen der RLA in Bezug auf die DMSO-Kontrolle beobachtet. Dies macht einen Einfluss von Zolmitriptan auf die hier verwendeten Fragmente des *KPNA3* und *ATXN3* Promotors unwahrscheinlich.



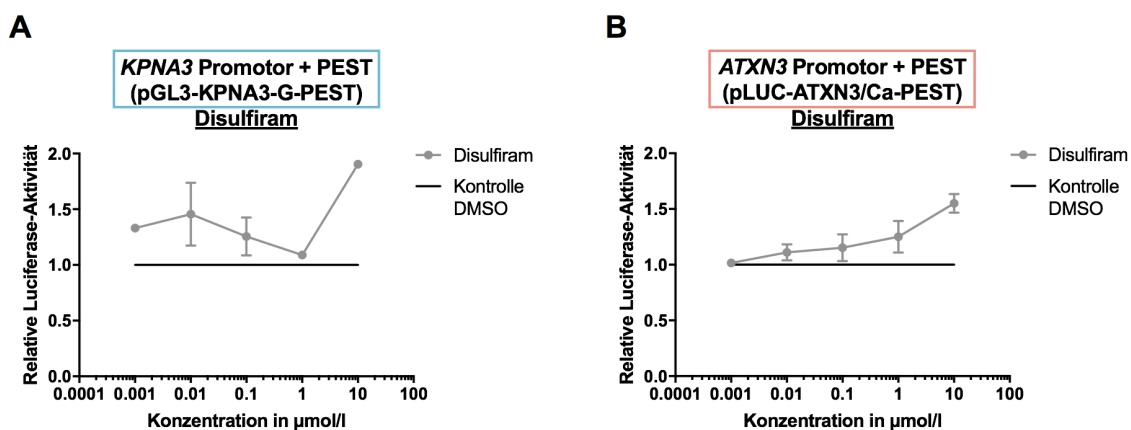
**Abbildung 47: Luciferase Assays bei Zugabe von Zolmitriptan zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G (A), pGL3-KPNA3-G-PEST (B) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (C) und Rizatriptanbenzoat zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (D) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (E). Es wurden keine relevanten Veränderungen der RLA in Bezug auf die DMSO-Kontrolle beobachtet. Eine Beeinflussung des *KPNA3* bzw.**

*ATXN3* Promotors erscheint somit unwahrscheinlich. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1 h (A) und 1,5 h (B, C, D, E). Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ ) aufgetragen (mit Ausnahme von A). Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert. A): n (0,01; 0,05; 0,2  $\mu$ M)= 4; n (0,1  $\mu$ M)= 6; n (0,15  $\mu$ M)= 5. B) und C): n = 2. D) und E): n = 2. Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

Rizatriptanbenzoat zeigte bei der Zugabe zum pLUC-*ATXN3*/Ca-PEST Konstrukt eine Tendenz zu einer Erhöhung der RLA bei 10  $\mu$ M (Abb. 47 E). Ansonsten wurden aber auch hier sowohl für das Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* als auch des *ATXN3* Promotors keine relevanten Veränderungen zur DMSO-Kontrolle beobachtet (Abb. 47 D und E).

### 3.4.7.5 Disulfiram

Bei der Zugabe des Aldehyd-Dehydrogenase-Inhibitors Disulfiram zu den transfizierten Zellen entsprachen die Graphen Dosis-Wirkungs-Kurven, was für die Effektivität der hier angewendeten Luciferase Assays spricht (Abb. 48 A und B). Da sich Disulfiram in den Konzentrationen von 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M als sehr toxisch gegenüber den Zellen zeigte, mussten diese Werte aus der Auswertung genommen werden.



**Abbildung 48: Luciferase Assays bei Zugabe von Disulfiram zu den Konstrukten pGL3-KPNA3-G-PEST (A) und pLUC-ATXN3/Ca-PEST (B).** Man erkennt die Form von Dosis-Wirkungs-Kurven, die für eine Effektivität der hier angewendeten Luciferase Assays sprechen (A, B). In den Konzentrationen von 50  $\mu$ M und 100  $\mu$ M zeigte sich Disulfiram als sehr toxisch gegenüber den Zellen, weshalb diese Werte aus der Auswertung genommen wurden. Verwendeter Zelltyp: HEK-293T. Wirkstoffinkubation für 1,5 h. Die Wirkstoffkonzentrationen sind auf der x-Achse logarithmisch ( $\log_{10}$ )

aufgetragen. Die DMSO-Kontrollen wurden auf 1 normalisiert.  $n(0,001 \mu\text{M})=1$ ;  $n(0,01; 0,1; 1; 10 \mu\text{M})=2$ . Statistik: Kruskal-Wallis-Test gefolgt von Dunn's Post-hoc-Test.

#### **3.5 Zusammenfassung Ergebnisse**

Da das Importin KPNA3 am Transport von expandiertem Ataxin-3 in den Nukleus beteiligt ist (Sowa et al. 2018), war das Ziel dieser Arbeit, ein Assay zu etablieren, mit dessen Hilfe die *KPNA3* Promotoraktivität verlässlich gemessen werden kann. Im Rahmen dieser Studie ist es uns gelungen, ein funktionierendes Reporter-gen Assay in Form eines Luciferase Assays zur Messung der Promotoraktivität von *KPNA3* sowohl zu etablieren, als auch zu optimieren und zu validieren. Für die Etablierung des Luciferase Assays wurden viele unterschiedliche Variationen vorgenommen, um eine möglichst präzise und effektive, aber auch einfache und schnelle Versuchsdurchführung für ein breites Medikamenten-Screening zu gewährleisten.

Bei der Analyse der *KPNA3* Promotoraktivität konnte gezeigt werden, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors eine signifikante Auswirkung auf die Genexpression ausübt. Hierbei wurde eine signifikant höhere Expression beobachtet, wenn der SNP in der Adenin-Variante vorliegt und die 5' UTR vorhanden ist. Dies spricht dafür, dass dieser SNP die *KPNA3* Promotoraktivität regulieren kann, was vorherigen Beobachtungen von M. Wanner entspricht (Wanner 2021).

Da bei einer HWZ der Firefly-Luciferase von 2 h (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15) Abnahmen der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) bei der Wirkstoffinkubation nur schwierig sichtbar wurden, wurde in das pGL3-KPNA3-G Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors und in das pLUC-ATXN3/Ca Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors eine PEST-Sequenz kloniert. Als Polypeptid-Sequenz mit angereichertem Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) dient die PEST-Sequenz als proteolytisches Signal zum schnelleren Abbau von Proteinen (Rechsteiner und Rogers 1996). Durch die erfolgreiche Klonierung des pGL3-KPNA3-G-PEST Konstruktes und des pLUC-ATXN3/Ca-PEST Vektors konnte die HWZ der Luciferase herabgesetzt werden,

was mithilfe eines Luciferase Assays und einem Western-Blot bestätigt werden konnte.

Das etablierte Assay wurde für ein Screening von elf verschiedenen Wirkstoffen herangezogen, die zuvor eine Auswirkung auf die Translokation von Ataxin-3 gezeigt hatten (Wang 2015). Somit wurden die Wirkstoffe auf die Fragestellung hin getestet, ob sie eine Wirkung auf die *KPNA3* Promotoraktivität ausüben konnten. Parallel dazu wurde auch die Wirkung auf den *ATXN3* Promotor betrachtet. Im Rahmen dieses Medikamenten-Screenings gelang es, Ergebnis-kurven zu generieren, die Dosis-Wirkungs-Kurven ähnelten, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das eingesetzte Luciferase Assay die *KPNA3* bzw. *ATXN3* Promotoraktivität zuverlässig wiedergeben kann. Es konnte gezeigt werden, dass der Histon-Deacetylase-Inhibitor (HDACi) Divalproex Natrium möglicherweise eine Modulation der Promotoraktivität von *KPNA3* bewirken kann, wobei der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors die Aktivität zu regulieren scheint. Dabei fiel auf, dass die zuvor beobachtete, signifikant höhere Genexpression bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes mit dem SNP= A im Vergleich zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt (SNP= G) durch die Zugabe von Divalproex Natrium nicht mehr messbar wurde. Stattdessen bewirkte das pGL3-KPNA3-A Konstrukt eine Tendenz zu einer Erniedrigung der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA), während beim pGL3-KPNA3-G Konstrukt eine Tendenz zur Erhöhung der RLA gemessen wurde (Tab. 37). Mit dem pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt konnte allerdings keine Tendenz sichtbar gemacht werden. Auf den *ATXN3* Promotor wirkten Divalproex Natrium sowie auch der HDACi Natriumbutyrate mit einer Tendenz zu einer Erhöhung der RLA.

Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib Tosylate bewirkte eine Tendenz zu einer Reduktion der *KPNA3* Promotoraktivität bei Einsatz des Konstruktes pGL3-KPNA3-G, die ebenfalls nicht detektiert werden konnte, wenn das pGL3-KPNA3-G-PEST Konstrukt mit der inklonierten PEST-Sequenz verwendet wurde (Tab. 37). Das Konstrukt mit dem *ATXN3* Promotor zeigte unter der Behandlung mit Sorafenib Tosylate eine Tendenz zu einer erhöhten RLA.

Der DOPA-Decarboxylase-Inhibitor Benserazid HCl und das Antimalaria-Mittel Artemether wirkten auf den *ATXN3* Promotor mit einer Tendenz zur Erhöhung der *ATXN3* Promotoraktivität (Tab. 37).

**Tabelle 37: Zusammenfassung der Wirkung von getesteten Wirkstoffen auf den *KPNA3* bzw. *ATXN3* Promotor.** Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors: pGL3-KPNA3-A (mit einem Adenin an der Stelle des SNPs rs11618521), pGL3-KPNA3-G (mit einem Guanin an der Stelle des SNPs rs11618521), pGL3-KPNA3-G-PEST. Konstrukte mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors: pLUC-*ATXN3*/Ca-PEST. PEST-Konstrukte enthalten im Gegensatz zu den Nicht-PEST-Konstrukten eine inklonierte PEST-Sequenz zur Reduktion der Halbwertszeit der Luciferase. ↑: Steigerung der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. ↓: Verminderung der RLA in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. - : keine Veränderung der RLA in Bezug auf die DMSO-Kontrolle. Durchgestrichen sind diejenigen Felder, bei denen keine Testung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes erfolgte.

Wirkstoff-name	<i>KPNA3</i> Promotor			<i>ATXN3</i> Promotor
	Nicht-PEST-Konstrukte		PEST-Konstrukte	
	pGL3-KPNA3-A	pGL3-KPNA3-G	pGL3-KPNA3-G-PEST	pLUC- <i>ATXN3</i> /Ca-PEST
Divalproex Natrium	Tendenz ↓	Tendenz ↑	-	Tendenz ↑
Natriumbutyrat			-	Tendenz ↑
Sorafenib Tosylate		Tendenz ↓	-	Tendenz ↑
Benserazid HCl		Tendenz -	Tendenz -	Tendenz ↑
Artemether		Tendenz -	Tendenz - / Tendenz ↓	Tendenz ↑

## **4. Diskussion**

### **4.1 Durch die Etablierung und Optimierung des Luciferase Assays als Reporter-gen Assay wird die Promotoraktivität von *KPNA3* zuverlässig messbar.**

Ein zentrales, pathologisches Merkmal der neurodegenerativen Erkrankung SCA3 ist die Aggregatbildung von mutiertem Ataxin-3 Protein, die durch einen verlängerten polyQ-Trakt im mutierten Protein zustande kommt. Diese Aggregate werden innerhalb der Zelle vor allem im Zellkern beobachtet, wohingegen Ataxin-3 normalerweise im Zytoplasma zu finden ist (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998). In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass das Importin KPNA3 am nukleären Transport von Ataxin-3 beteiligt ist, und dass die Herunterregulierung von *KPNA3* in *Drosophila*- und Mausmodellen von SCA3 zu einer Abmilderung der Neurodegeneration und des SCA3-Phänotyps führte (Sowa et al. 2018). In den Fokus unserer Arbeit gelangte in diesem Zusammenhang die genauere Betrachtung des *KPNA3* Promotors, der für die Aktivität und die Transkription des nachgeschalteten *KPNA3* Gens eine wesentliche Bedeutung hat. Das hier eingesetzte *KPNA3* Promotorfragment befindet sich 5' vom Transkriptionsstart des *KPNA3* Gens und enthält die letzten 1981 bp am 3' Ende des *KPNA3* Promotors. In vorangegangenen Studien von M. Wanner wurde gezeigt, dass diese Promotorlänge für eine Expression des Gens ausreichend ist (Wanner 2021). Auch die Literatur zeigt, dass vor allem die ersten 1000 bis 2000 bp *upstream* vom Transkriptionsstart eine besondere Relevanz für die Expression des zugehörigen Gens haben (Pedersen et al. 1999). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass diese Arbeit Rückschlüsse auf den *KPNA3* Promotor erlaubt, selbst wenn nur ein Fragment des Promotors berücksichtigt werden konnte. Das Gleiche gilt auch für das *ATXN3* Kontrollkonstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors, das die Wildtyp-Variante darstellt und ebenfalls nur die ersten 1089 bp des *ATXN3* Promotors *upstream* des Transkriptionsstarts enthält (Schmitt et al. 2003).

Als Reportergen Assay zur Analyse des *KPNA3* Promotors wurde das *Dual-Glo Luciferase Assay System* in dieser Arbeit sukzessive etabliert. Hierbei stellen Reportergen Assays die häufigste verwendete Methode dar, um die Aktivität regulierender Genregionen zu analysieren (Tudini et al. 2019). Um kontrollierte und reproduzierbare Ergebnisse mithilfe des Luciferase Assays generieren zu können, wurden zahlreiche Faktoren im Rahmen der Etablierung optimiert. Hierzu zählten die Variation der Anzahl der transfizierten Zellen und der Verhältnisse der eingesetzten Plasmid-DNA, unterschiedliche Versuchsdurchführungen, die Variation der Reihenfolge der Arbeitsschritte sowie auch diverse technische Umsetzungen. Nach einer Optimierung des Assays waren die durchgeführten Experimente reproduzierbar, sodass im Rahmen dieser Arbeit von einer zuverlässigen angewandten Methodik ausgegangen werden.

F-Luc und R-Luc werden als Ko-Reporter oft verwendet, da ihre Anwendung einfach, schnell, relativ kostengünstig und sensitiv ist. Das Luciferase Assay ist mit seiner hohen Sensitivität eine hervorragende Methode, um Promotoraktivitäten zuverlässig messen zu können (Alam und Cook 1990, Xu et al. 2013). Auch in Western-Blots sind Quantifizierungen der Expression eines Proteins möglich, wie in dieser Arbeit auch durchgeführt, jedoch ist die Quantifizierung abhängig von der Antigen-Antikörper Wechselwirkung. Im Luciferase Assay wird hingegen der Enzymumsatz einer Luciferase gemessen. Außerdem können sehr kleine Mengen an DNA für die Transfektion verwendet werden, wodurch unerwünschte Effekte durch größere Mengen an DNA verhindert werden (Selden et al. 1986). So kann mithilfe eines Luciferase Assays eine hohe Anzahl an Proben parallel und in relativ kurzer Zeit gemessen werden. Durch die in dieser Arbeit vorgenommene Überführung des Assays von einer 96-Well-Platte in eine 384-Well-Platte wurde die Anzahl der zeitgleich untersuchten Proben deutlich gesteigert. Durch die geringer eingesetzte Zellzahl und DNA-Menge waren die absoluten Messwerte bei der Verwendung einer 384-Well-Platte deutlich niedriger als bei einer 96-Well-Platte. Außerdem hatten die Zellen in einer 384-Well-Platte eine kleinere Wachstumsfläche, was auch zu der Abnahme der absoluten Messwerte beitrug. Nichtsdestotrotz konnten durch das Verhältnis von F-Lum zu R-Lum zuver-

lässige und reproduzierbare Lumineszenzen auch in einer 384-Well-Platte gemessen werden. Aufgrund der Instabilität exogen zugeführter DNA musste berücksichtigt werden, dass die Transkription nur während einer limitierten Zeitspanne aktiv war. Weitere Informationen über die Enzymaktivität des Reporterenzym waren somit nötig, um einen guten Zeitpunkt zu finden, an dem die Regulation des betrachteten DNA-Elements erfolgen sollte. Hierfür wurde laut Manual das Luciferase Assay immer nach 48 h nach der *Fast-Forward* Transfektion durchgeführt (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15).

Die in dieser Arbeit verwendeten HEK-293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) Zellen stammen von embryonalen Nierenzellen ab. Das „T“ steht dafür, dass diese Zelllinie anders als HEK-293 Zellen zusätzlich das SV40 T Antigen stabil exprimiert, das an den SV40 *origin of replication* von Vektoren binden und so die Expression von Genen erhöhen kann (Lin YC et al. 2014). Außerdem kann das SV40 T Antigen einen Komplex mit p53 bilden, wodurch das p53 inhibiert wird und die Amplifikation und Transfektionseffizienz von Plasmiden erhöht wird (Lilyestrom et al. 2006). HEK-293T Zellen besitzen ein neuronales Expressionsprofil (Shaw et al. 2002), was im Kontext der neuronalen Erkrankung SCA3 eine gewisse Analogie zu den bei den Patienten betroffenen Neuronen erlaubt. Nichtsdestotrotz müssen die hier in der Zellkultur erhobenen Daten kritisch beurteilt werden in Hinblick darauf, wie die Ergebnisse auf echte menschliche Neurone der SCA3-Patienten übertragen werden können. So wurde bei dieser Zelllinie bereits eine gewisse Dynamik des Genoms beschrieben (Lin YC et al. 2014), die bei menschlichen Neuronen nicht gegeben ist. Wie in allen in der Zellkultur durchgeführten Experimenten ist somit eine direkte Übertragung der hier gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen nicht möglich. Viel mehr sollen die in der Zellkultur erhobenen Ergebnisse eine Möglichkeit bieten, mögliche Einflussfaktoren zu studieren, deren Relevanz für den Menschen sich dann erst in folgenden *in vivo* Studien zeigen wird.

Die verwendeten Assay-Platten durften nicht transparent sein, da der *Crosstalk* zwischen den *Wells* während der Lumineszenzmessung so gering wie möglich gehalten werden sollte (Manual MicroLumat *Plus* LB 96V,  $\mu$ p-Version 2.0,

Berthold Technologies GmbH, Stand: 11/00). Der klare Nachteil bei der Verwendung dieser Platten bestand aber darin, dass die Zellen vor dem Luciferase Assay aufgrund des weißen Plattenbodens nicht unter dem Mikroskop betrachtet und beurteilt werden konnten. So fehlten Rückschlüsse über die Konfluenz der Zellen und ihrer Anzahl, genauso wie über die Vitalität der Zellen. Zwar wurde stets eine konstante Zellzahl zur Transfektion eingesetzt, jedoch konnte die Transfektionseffizienz nicht beurteilt werden, sodass hierzu im Rahmen des Luciferase Assays Rückschlüsse fehlten. Durch die Verwendung eines Kontrollreportergens konnten allerdings eine Variabilität in der Transfektionseffizienz als solche häufig erkannt werden. Des Weiteren wurde stets darauf geachtet, dass biologische Replikate eines Experimentes oder Vergleiche zwischen unterschiedlichen Experimenten mit HEK-293T Zellen durchgeführt wurden, die sich in einer ähnlichen Zellpassage befanden.

Zwischenzeitlich wurden Korrelationen zwischen den beiden Luciferasen beobachtet, da auffiel, dass bei den Messungen hohe bzw. niedrige Firefly-Lumineszenz (F-Lum) Werte mit hohen bzw. niedrigen Renilla-Lumineszenz (R-Lum) Werten korrelierten. Dabei sollte aber die R-Lum als interne Kontrolle in einem Experiment immer halbwegs stabil bleiben (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Synergistische Effekte kotransfizierter Vektoren auf die Transfektionseffizienz wurden bereits mehrfach in der Literatur erwähnt. Bei der Kotransfektion kann es hierbei zu Trans-Effekten zwischen den Promotoren der kotransfizierten Plasmide kommen, die die Reporter-Expression beeinflussen können (Farr und Roman 1992). Dies muss immer berücksichtigt werden, wenn der Experimentvektor oder der Kontrollvektor sehr starke Promotoren enthalten wie z. B. den hier verwendeten *CMV* Promotor im pRL-CMV Konstrukt (Promega 2001). Transaktivierungseffekte zwischen den beiden Promotoren des Firefly- und Renilla-Konstruktes können außerdem je nach Zellpassage, Transfektionseffizienz oder Plasmid-DNA Isolierung von Experiment zu Experiment schwanken (Farr und Roman 1992). Optimierungen der eingesetzten Menge der Vektor-DNA sowie des Verhältnisses zwischen der Konstrukt-DNA und der kotransfizierten Kontroll-DNA waren aus diesem Grund unabdingbar.

Ursächlich für die beobachteten Korrelationen zwischen den F-Lum und R-Lum Werten konnte auch ein unzureichendes *Quenching* der F-Lum sein. Da bei der Durchführung des Luciferase Assays zunächst die F-Lum gemessen wird und daraufhin die R-Lum, bedarf es eines sogenannten *Quenchers*, um die Aktivität der F-Luc für die folgende Messung der R-Luc einzudämmen. Dies erfolgt laut Manual in dem *Dual-Glo Luciferase Assay System* mithilfe des Dual-Glo Stop&Glo Puffers, wobei die genaue Natur des *Quenchers* nicht weiter aufgeführt wird (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15). Durch die Veränderung des Verhältnisses der F-Luc zur R-Luc wurde einem ineffizienten *Quenching* in der Art und Weise vorgebeugt, als dass der Anteil der F-Lum, die bei der R-Lum noch mitgemessen werden konnte, an der Gesamtlumineszenz der Renilla geringer ausfiel. Durch die im Rahmen dieser Arbeit vorgenommenen Änderungen wurden die Korrelationen zwischen den Firefly- und Renilla-Signalen nicht mehr gemessen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass das *Quenching* der F-Lum durch das Dual-Glo Stop&Glo Reagenz (DSR) regelrecht verlief.

Nach zahlreichen Optimierungen steht somit mit dem hier etablierten Luciferase Assay ein validiertes Reportergen Assay zur Verfügung, durch das die *KPNA3* Promotoraktivität zuverlässig gemessen werden kann.

#### **4.2 Der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors reguliert die *KPNA3* Promotoraktivität.**

Innerhalb des *KPNA3* Promotors befindet sich der SNP rs11618521, der im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht wurde. SNPs sind Einzelnukleotidpolymorphismen, d.h. Sequenzvarianten der DNA, die dadurch charakterisiert sind, dass sie sich nur in einem Basenpaar voneinander unterscheiden. Durch die Entwicklung und den Einsatz des *Next-Generation Sequencings* wurden vielfach Varianten in nichtkodierenden Regionen des Genoms entdeckt, die potenziell mit den jeweiligen Erkrankungen assoziiert sein können. So konnten SNPs bereits in anderen Erkrankungen mit der Expression des entsprechenden Gens in Verbindung gebracht werden (Wang et al. 2004). Die Analyse der

Funktion und Bedeutung solcher Varianten eröffnet ganz neue Möglichkeiten für die humangenetische Beratung (Tudini et al. 2019). Hierbei haben SNPs in regulatorischen Regionen der DNA, wie im Promotorbereich eines Gens, eine erhöhte Wahrscheinlichkeit den zugehörigen Phänotypen zu beeinflussen. Dies liegt daran, dass hier Transkriptionsfaktoren binden können, die Auswirkungen auf die Expression des nachgeschalteten Gens haben (Collins et al. 1998). Durch die Lokalisation von SNPs in solchen regulatorischen Bereichen können die Bindungsaktivitäten von Transkriptionsfaktoren damit soweit verändert sein, dass die Transkription und die Expression des zugehörigen Gens beeinflusst werden (Myers et al. 2007).

Der SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors liegt in Europa in zwei Varianten vor: Zu etwa 39 % findet sich an dieser Stelle ein Adenin, zu 61 % ein Guanin (Sherry et al. 2001). In dieser Arbeit konnten vorherige Beobachtungen (Wanner 2021) bestätigt werden, indem gezeigt werden konnte, dass es zu einer höheren Genexpression kam, wenn an der Stelle des SNPs ein Adenin vorlag. Da die Variante des SNPs einen maßgeblichen Einfluss auf die *KPNA3* Promotoraktivität zu haben scheint, untersuchte M. Wanner, ob es möglicherweise Transkriptionsfaktoren gibt, die nur binden, wenn der SNP in der Adenin-Variante vorliegt (Wanner 2021). Die erhöhte Bindung von Transkriptionsfaktoren könnte so eine *KPNA3* Überexprimierung erklärbar machen. In vorherigen Studien wurden tatsächlich spezifische Transkriptionsfaktoren entdeckt, die wahrscheinlich eher an den Promotor binden können, wenn am SNP rs11618521 ein Adenin vorliegt und die 5' UTR im Konstrukt vorhanden ist (Wanner 2021). Zu den potenziellen und vielversprechenden Transkriptionsfaktoren zählt das im Gehirn exprimierte C/EBPalpha (*CCAAT-enhancer binding protein alpha*), das spezifisch am *KPNA3* Promotor bindet, wenn der SNP= A ist (Wanner 2021). C/EBPalpha wurde hierbei bereits in Zusammenhang mit dem Energiestoffwechsel (Wang et al. 1995), mit Stoffwechselfvorgängen im Fettgewebe (Miller et al. 1996) sowie mit der Hämatopoese (Takei und Kobayashi 2019) gebracht.

Da die beobachteten Effekte nur gesehen wurden, wenn die 5' UTR vorhanden ist, scheint die 5' UTR einen Einfluss auf die Promotoraktivität und die

Genexpression zu haben (Wanner 2021). Die Funktion der 5' UTR als regulatorische Sequenz liegt im Allgemeinen darin, dass beispielsweise Ribosomen an ihr binden können, die ihrerseits die Translation initiieren (Schaaf und Zschocke 2013). Dass die 5' UTR an der Regulation der Translation beteiligt sein kann, wurde bereits auch in anderen Studien beschrieben (Young und Korsmeyer 1993, van der Velden und Thomas 1999, Bugaut und Balasubramanian 2012). Da die 5' UTR an der Expression des *KPNA3* Gens mitverantwortlich zu sein scheint, wenn der SNP= A, wurde in vorherigen Studien untersucht, ob es Proteine gibt, die mit C/EBPalpha interagieren können. Hier wurden der Transkriptionsfaktor Jun und der Koaktivator von Transkriptionsfaktoren EP300 gefunden, die beide Bindestellen in der 5' UTR besitzen (Wanner 2021). Weitere Analysen auf diesem Gebiet sind notwendig und wären hilfreich, um aus diesen Erkenntnissen möglicherweise einen therapeutischen Nutzen für SCA3-Patienten ziehen zu können.

Des Weiteren ist bereits bekannt, dass die CAG-Wiederholung im Mittel mit dem Erkrankungsalter (AAO (*Age at onset*)) korreliert, wobei Patienten mit der gleichen *CAG-Repeat*-Anzahl einen stark voneinander abweichenden AAO haben können (Riess et al. 2001). Somit muss es andere Faktoren geben, die einen Einfluss auf den AAO ausüben können. So wurde bereits in vorherigen Studien eine Korrelation zwischen dem SNP rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors und dem AAO der SCA3 Erkrankung beobachtet (Dieterle 2019). Da das pGL3-KPNA3-A Konstrukt in unserer Arbeit eine signifikant höhere Expression besitzt als das pGL3-KPNA3-G Konstrukt, wäre anzunehmen, dass es unter dem pGL3-KPNA3-A Konstrukt durch eine höhere Transkription und Translation des Transportproteins KPNA3 zu einer vermehrten Anzahl an nukleären Ataxin-3 Aggregaten kommen müsste. Dies könnte zu einem früheren AAO führen. In vorherigen Studien wurde hingegen beobachtet, dass das AAO nicht früher erreicht wird, wenn die SCA3-Patienten am SNP rs11618521 ein Adenin tragen, sondern wenn an dieser Stelle ein Guanin zu finden ist (Dieterle 2019). Diese Beobachtungen sind somit nicht kongruent zu unseren Ergebnissen. Allerdings stehen sie auch nicht in komplettem Widerspruch zueinander, da auch noch weitere SNPs in Kopplung zum SNP

rs11618521 stehen könnten, die einen Einfluss auf den AAO ausüben könnten. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist notwendig, um weitere Aussagen über die Korrelation des SNPs und dem AAO zu treffen. Interessant wäre dabei die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher SNP Varianten in *in vivo* Modellen auf den Krankheitsbeginn und -verlauf der SCA3 Erkrankung. Möglicherweise könnte dann durch die Hinzunahme des hier dargestellten SNPs die Vorhersage des AAO sowohl erleichtert als auch deutlich verbessert werden.

#### **4.3 Die erfolgreiche Klonierung einer PEST-Sequenz in die verwendeten Konstrukte senkt signifikant die Halbwertszeit der Luciferase.**

Das Luciferase Assay sollte im Rahmen dieser Arbeit für ein Medikamenten-Screening eingesetzt werden, durch das mehrere Wirkstoffe auf ihre mögliche Wirkung auf die *KPNA3* Promotoraktivität untersucht werden konnten. Bei einer HWZ der Firefly-Luciferase (F-Luc) von 2 h (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15) wurden allerdings Abnahmen der Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) nur schwierig sichtbar. Da eine Verlängerung der Inkubation mit den jeweiligen Wirkstoffen aufgrund von toxischen Effekten nicht möglich war, wurden PEST-Sequenzen in die Konstrukte einkloniert. Die mit Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T) angereicherten hydrophilen Polypeptid-PEST-Sequenzen dienen als proteolytische Signale und führen zu einem schnelleren Abbau von Proteinen (Rechsteiner und Rogers 1996). Durch eine Reduktion der HWZ der Luciferase durch die PEST-Konstrukte sollten somit Abnahmen der Luciferase-Aktivität messbar gemacht werden, die zuvor möglicherweise nur deshalb nicht detektiert werden konnten, weil die Luciferase noch nicht abgebaut worden war. Hierbei muss beachtet werden, dass sich durch die Erfassung geringerer Messwerte auch der dynamische Bereich verringert, in dem man Unterschiede erwartet. Dieser geringere dynamische Bereich wurde aber in Kauf genommen, um eine größere Chance zu haben, Abnahmen der RLA besser zu sehen.

Die erfolgreiche Klonierung der PEST-Sequenzen in die Konstrukte mit dem *KPNA3* und *ATXN3* Promotor konnte durch eine Sanger-Sequenzierung nachgewiesen werden. Mithilfe eines Luciferase Assays und einem Western-Blot konnte außerdem gezeigt werden, dass die PEST-Konstrukte die HWZ der Luciferase erfolgreich herabsenken konnten (s. 3.3.4). Durch die PEST-Sequenz wurde laut Hersteller die HWZ der Luciferase von 2 h (Technisches Manual des *Dual-Glo Luciferase Assay Systems*, Promega, Stand: 09/15) auf ca. 45 min gesenkt (Leclerc et al. 2000). Somit wurde im Rahmen des Medikamenten-Screenings durch eine 90-minütige Wirkstoff-Inkubation der mit den PEST-Konstrukten transfizierten Zellen eine Inkubation gewährleistet, die die Länge zweier HWZ umfasste. Die ursprüngliche Erwartung, Abnahmen der RLA besser detektieren zu können, wurde allerdings nicht in dem Maße erfüllt, wie erhofft wurde. Während z. B. bei der Zugabe von Sorafenib Tosylate zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt eine Tendenz zu geringeren RLA-Werten als bei der DMSO-Kontrolle beobachtet wurden, sah man bei der Verwendung der PEST-Konstrukte in diesen Konzentrationsbereichen keine Verminderung der Werte. Gründe dafür könnten sein, dass der dynamische Bereich doch zu klein wurde. Auch wenn etwas unwahrscheinlich, könnte es außerdem sein, dass die HWZ nach wie vor zu lang war, wenn man die Zellen nur für die Länge von zwei HWZ mit den Wirkstoffen inkubierte.

PEST-Sequenzen dienen als Signale für die Proteolyse. Sie kommen in natürlicher Weise vor allem in eukaryotischen Proteinen vor, die schnell degradieren und die eine intrazelluläre HWZ von weniger als 2 h aufweisen (Rogers et al. 1986, Rechsteiner et al. 1987, Rechsteiner und Rogers 1996, Soloviev 2000, Chen und Clarke 2002). Die PEST-Sequenz ist meistens von positiv geladenen Aminosäuren wie Lysin, Arginin oder Histidin flankiert (Chen und Clarke 2002). Außerdem ist bekannt, dass die Aktivität der PEST-Sequenz reguliert wird, indem benachbarte Regionen phosphoryliert werden (Löffler und Petrides 2003). Für die Proteolyse durch PEST-Sequenzen werden vor allem die Ubiquitinierung, die schnelle Endozytose oder die Degradation durch das Proteasom oder lysosomale Proteasen verantwortlich gemacht (Rechsteiner und Rogers 1996, Soloviev 2000). Dabei müssen PEST-Sequenzen allerdings

nicht unbedingt zu einer Degradation des Proteins beitragen. Letzteres passiert nur, wenn die Sequenzen auch an der Oberfläche des Proteins exponiert werden, und nicht durch interagierende Proteine verdeckt werden. Deshalb sind sowohl die strukturelle Konformation als auch die Zugänglichkeit an der Oberfläche des Proteins wichtig, damit eine PEST-Sequenz überhaupt ihre Wirkung entfalten kann (Soloviev 2000). Diese Tatsache wurde in dieser Arbeit dahingehend beachtet, als dass die PEST-Sequenz in der Firefly-Luciferase C-terminal vorlag (s. 3.3.2 und 3.3.3). Außerdem spielen PEST-Sequenzen nicht nur eine Rolle in der Proteolyse von Proteinen, sondern können auch an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sein. So wurden bereits Interaktionen der PEST-Sequenz des SUMO-1 Proteins mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym Ubc9 beobachtet (Bies et al. 2002). Zusätzlich können die PEST-Regionen einiger Proteine Liganden als solche erkennen (Soloviev 2000, Ghose et al. 2001). So kann die PEST-Region potenziell mit Ubiquitinierungsproteinen, anderen Proteasen oder molekularen Chaperonen interagieren (Chen und Clarke 2002). Diese Interaktionen könnten bei den hier verwendeten Reporterenzymen ungewollte posttranskriptionelle Veränderungen bewirken, durch die strukturellen Veränderungen der Proteine herbeigeführt werden könnten, die ihrerseits die Aktivität der Reporterenzyme beeinflussen würden.

Bei den Vorbereitungen für den Western-Blot fiel außerdem auf, dass die geernteten Zell-Pellets, die transfizierte PEST-Konstrukte enthielten, sehr viel kleiner waren als die Zell-Pellets, die mit den Nicht-PEST-Konstrukten transfiziert worden waren. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die PEST-Konstrukte auf irgendeine Art und Weise toxisch auf die Zellen wirkten. Die genauen Mechanismen, die in dieser Arbeit zum Tragen kamen, bleiben unbekannt.

Abschließend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass die PEST-Konstrukte wie erwartet die HWZ der Luciferase erfolgreich senken konnten. Allerdings wurden bei ihrer Anwendung im Medikamenten-Screening Abnahmen der RLA nicht stärker sichtbar als bei Verwendung der Nicht-PEST-Konstrukte, sodass wir durch die Klonierung der

PEST-Konstrukte keinen Mehrwert für das Medikamenten-Screening verzeichnen können.

#### **4.4 Durchführung eines Medikamenten-Screenings zur Testung von der Wirkung elf unterschiedlicher Wirkstoffe auf die *KPNA3* Promotoraktivität**

Da es bisher keine kausale Therapie für die SCA3 gibt, hat sich die Forschung im Laufe der letzten Jahre auf viele unterschiedliche Gebiete ausgeweitet. Hierbei sollen die Mechanismen hinter der Erkrankung schrittweise besser erforscht werden, um durch einen geplanten Eingriff in die beteiligten Strukturen sowohl eine Linderung und Besserung der Symptome von SCA3-Patienten als auch eine mögliche kausale Behandlung der SCA3 zu erreichen. In der Einleitung wurde bereits auf diverse zelluläre Angriffspunkte und therapeutische Ansätze eingegangen, die zurzeit untersucht werden (s. 1.7.2). Die Studienergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass es sich bei der SCA3 um eine hochkomplexe Erkrankung handelt, deren genauer Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig verstanden ist. Einige Therapieansätze konnten bereits vielversprechende präklinische Ergebnisse erzielen wie beispielsweise die Stimulation der Autophagie, wodurch die Translation in klinische Studien sehr wünschenswert ist (Menzies et al. 2010, Nascimento-Ferreira et al. 2011, Nascimento-Ferreira et al. 2013, Nobrega et al. 2013b, Matos et al. 2019). Andere Ansätze wie der Eingriff in posttranslationale Modifikationen oder die allgemeine Hochregulierung des Ubiquitin-Proteasom-System werden im klinischen Kontext wohl an bestimmten Limitierungen durch die bisher fehlende Selektivität der Ansätze scheitern (Matos et al. 2019). Viele der therapeutischen Ansätze greifen nämlich in Stoffwechselwege ein, die für die zelluläre Homöostase wichtig und notwendig sind, und die somit erst dann für die Behandlung von SCA3-Patienten eingesetzt werden können, wenn eine gewisse Selektivität gewährleistet werden kann. Außerdem sollte beachtet werden, dass Wirkstoffe für eine Therapie von SCA3-Patienten in der Lage sein sollten, das Gehirn in wirksamen Konzentrationen zu erreichen, ohne zu viele Nebenwirkungen auf den restlichen Organismus zu haben.

Aus den wenigen bisherigen klinischen Studien, wie dem Einsatz von Histone-Deacetylase Inhibitoren (HDACi), konnten noch keine endgültigen Rückschlüsse gezogen werden, da größere, randomisierte Studien fehlen (Lei et al. 2016, Matos et al. 2019). Somit ist die weitere Erforschung der Möglichkeit einer kausalen Therapie der SCA3 nach wie vor aktuell und notwendig.

Der in dieser Arbeit betrachtete, mögliche therapeutische Ansatz beschäftigt sich mit dem Eingriff in den nukleären Transport von mutiertem Ataxin-3 durch das Importin Karyopherin  $\alpha$ -3 (KPNA3), das in vorherigen Studien als Transportprotein von Ataxin-3 identifiziert wurde (Sowa et al. 2018). KPNA3 zeigte hierbei bereits einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf von SCA3: Durch einen *Knockdown* des *KPNA3* Gens konnte die typische SCA3 Symptomatik in transgenen Mäusen signifikant verbessert werden (Sowa et al. 2018). In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen dieser Studie ein Medikamenten-Screening durchgeführt, um die Wirkung elf unterschiedlicher, vielversprechender Wirkstoffe auf die Aktivität des *KPNA3* Promotors zu testen. Durch eine mögliche therapeutische Herunterregulierung der *KPNA3* Promotoraktivität könnte die *KPNA3* Expression reduziert werden, die wiederum zu geringeren KPNA3 Proteinspiegeln führen würde. Durch die verminderte Translokation von Ataxin-3 in den Zellkern durch KPNA3 könnte somit der Bildung von intranukleären Einschlusskörperchen entgegengewirkt werden, die für den Krankheitsverlauf von SCA3-Patienten maßgeblich verantwortlich sind (Paulson et al. 1997a, b, Schmidt et al. 1998). Da das KPNA3 als Transportprotein der Zelle nicht nur Ataxin-3 sondern auch andere Proteine in den Zellkern befördert, ist die Sorge begründet, dass durch die Unterbindung der Wirkung von KPNA3 auch Zellwege gestört werden könnten, die für die Zelle unabdingbar sind. Sowa et al. konnten allerdings zeigen, dass transgene Mäuse, bei denen ein *KPNA3* *Knockdown* durchgeführt wurde, keine großen weiteren unerwünschten Nebenwirkungen aufzeigten (Sowa et al. 2018). Weitere *in vivo* Studien sind notwendig, um diese Beobachtung nochmals zu bestätigen, und um die Unbedenklichkeit eines solchen Angriffs am Menschen abzuschätzen.

#### 4.4.1 Allgemeine Überlegungen zur Interpretation der Ergebnisse

In den Fokus des Medikamenten-Screenings gelangten elf Wirkstoffe, die zuvor Auswirkungen auf die Translokation von Ataxin-3 gezeigt hatten (Wang 2015). Durch den Einsatz von Luciferase Assays wurde untersucht, ob sich die Relative Luciferase-Aktivität (RLA) durch Zugabe der Wirkstoffe zu den transfizierten Zellen im Vergleich zu der DMSO- bzw. ddH<sub>2</sub>O- Kontrolle veränderte oder gleich blieb. So konnten Aussagen über die Wirkung der Wirkstoffe auf den *KPNA3* und *ATXN3* Promotor getätigt werden.

Für die Interpretation der Ergebnisse wurden folgende Relationen angenommen: Wenn das Konstrukt mit einem Fragment des *KPNA3* Promotors durch einen Wirkstoff eine niedrigere bzw. höhere RLA aufwies als die Kontrolle, dann lag dies an einer erniedrigten bzw. erhöhten Translation der Luciferase. Dies könnte dadurch erzielt worden sein, dass der Wirkstoff durch Interaktion mit dem Promotor eine verminderte bzw. verstärkte Transkription des Luciferase Gens, das an den Promotor gekoppelt ist, bewirkte. Da das Luciferase Gen im Luciferase Assay das *KPNA3* Gen ersetzt, sprach dies dafür, dass der Wirkstoff eine erniedrigte bzw. erhöhte Expression des *KPNA3* Gens zur Folge haben könnte. Zusätzlich diente ein Konstrukt mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors als Negativkontrolle, um Effekte ausschließen zu können, die sich allgemein auf Promotoren bezogen und nicht spezifisch für den *KPNA3* Promotor waren. Die Hinzunahme des Konstruktes mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors hatte darüber hinaus den Vorteil, dass Effekte, die möglicherweise durch die direkte Wirkung der Wirkstoffe auf den *ATXN3* Promotor entstanden, auch als solche erkannt werden konnten. Somit wurden durch unseren Versuchsaufbau nicht nur Effekte auf den *KPNA3* Promotor sondern auch solche auf den *ATXN3* Promotor sichtbar, was durch die gemeinsame Bedeutung im untersuchten Wirkmechanismus durchaus von Vorteil war.

Wenn somit ein Wirkstoff Auswirkungen auf den *KPNA3* Promotor hatte, die spezifisch für diesen Promotor waren und nicht auf Promotoren allgemein zutrafen, musste folgende Beobachtung gewährleistet sein: Eine Erniedrigung bzw. Erhöhung der RLA durch den *KPNA3* Promotor ging nicht mit einer

Erniedrigung bzw. Erhöhung der RLA durch den *ATXN3* Promotor einher (Tab. 38). Somit sollte bei einem spezifischen Effekt auf den *KPNA3* Promotor entweder kein Effekt oder ein gegenläufiger Effekt auf den *ATXN3* Promotor beobachtet werden.

**Tabelle 38: Interpretation der Ergebnisse eines Luciferase Assays.** Im oberen Abschnitt der Tabelle werden die Ergebnisse der Relativen Luciferase-Aktivität (Quotient aus der Firefly-Lumineszenz (F-Lum) und der Renilla-Lumineszenz (R-Lum)) der Konstrukte mit einem Fragment des *KPNA3* oder *ATXN3* Promotors miteinander verglichen. Die R-Lum wird bei der Interpretation der Ergebnisse ebenfalls angeschaut, um zu kontrollieren, dass letztere innerhalb eines Luciferase Assays weitgehend konstant bleibt. Im unteren Abschnitt der Tabelle werden die Werte der F-Lum und R-Lum miteinander verglichen, wobei bei einem gleichen Anstieg oder Abstieg der Lumineszenzen von einem globalen Effekt ausgegangen werden kann. ↓: Abnahme in Bezug auf die DMSO- oder ddH<sub>2</sub>O-Kontrolle. ↑: Zunahme in Bezug auf die DMSO- oder ddH<sub>2</sub>O-Kontrolle. - : kein Effekt in Bezug auf die DMSO- oder ddH<sub>2</sub>O-Kontrolle.

Relative Luciferase-Aktivität (F-Lum / R-Lum)		R-Lum	Interpretation
<b>Konstrukt mit <i>KPNA3</i> Promotor</b>	<b>Konstrukt mit <i>ATXN3</i> Promotor</b>	<b>pRL-CMV Konstrukt</b>	
↓ oder ↑	-	konstant	spezifischer Effekt auf <i>KPNA3</i> Promotor
↓ oder ↑	↑ oder ↓	konstant	spezifischer Effekt auf <i>KPNA3</i> Promotor
↓ oder ↑	↓ oder ↑	konstant	unspezifischer Effekt auf Promotoren
-	-	konstant	kein Effekt
<b>F-Lum</b>		<b>R-Lum</b>	<b>Interpretation</b>
<b>Konstrukt mit <i>KPNA3</i> Promotor</b>	<b>Konstrukt mit <i>ATXN3</i> Promotor</b>	<b>pRL-CMV Konstrukt</b>	
↓ oder ↑	↓ oder ↑	↓ oder ↑	globaler Effekt

Wenn allerdings nach der Zugabe eines Wirkstoffes sowohl die RLA beim *KPNA3* Konstrukt als auch beim *ATXN3* Konstrukt im Vergleich zu der Kontrolle anstiegen, konnte es für eine allgemeine Aktivierung der Transkriptionsfunktion sprechen oder der Wirkstoff konnte möglicherweise direkte Auswirkungen auf die Luciferase haben (Tab. 38). Für letzteren Fall war deswegen die Kontrolle

mit dem pRL-CMV Vektor als interne Kontrolle wichtig, da sich anhand der Rohdaten entnehmen ließ, ob auch hier die R-Luc Aktivität anstieg. In diesem Fall konnte von einem generellen und globalen Effekt ausgegangen werden, der nicht erwünscht war. Wenn sehr niedrige absolute Werte gemessen wurden, musste davon ausgegangen werden, dass der Wirkstoff toxisch für die transfizierten Zellen war. Letzteres war beispielsweise beim Wirkstoff Disulfiram (s. 3.4.7.5) oder bei der Zugabe hoher Konzentrationen von Benserazid HCl (s. 3.4.6.1) und Clotrimazol (s. 3.4.7.1) der Fall.

Wenn keine Effekte auf die *KPNA3* Promotoraktivität durch Zugabe der Wirkstoffe beobachtet wurden, waren mehrere Szenarien denkbar. Zum einen muss berücksichtigt werden, dass wir in dieser Arbeit nur einen Teilaspekt der möglichen Wirkung der Wirkstoffe betrachten konnten. Beispielsweise konnten epigenetische Einflussfaktoren wie die DNA-Methylierung (Schaaf und Zschocke 2013) oder posttranskriptionelle Regulationsmechanismen nicht erfasst werden. Zum anderen wäre es möglich, dass die Wirkstoffe keine Wirkung auf den in dieser Arbeit untersuchten Bereich des Promotors ausüben könnten, obwohl es sich um den Bereich des Promotors handelt, an dem die meisten Transkriptionsfaktoren binden (s. 4.1). Zuletzt könnte das *KPNA3* auch schlicht nicht für die Wirkstoffeffekte verantwortlich sein, die in vorherigen Experimenten beobachtet wurden. Für die Effekte könnten andere Zielstrukturen und Signalwege zuständig sein, die durch die Wirkstoffe moduliert werden, und die noch unbekannt sind.

Da das Luciferase Assay eine sehr sensitive Methode darstellt, ist anzunehmen, dass Wirkstoffe mit relevanten Effekten auch deutlich signifikante Veränderungen erzielen sollten. Auch wenn klare, signifikante Ergebnisse in den hier durchgeführten Luciferase Assays zum größten Teil nicht erzielt werden konnten, können beobachtete Tendenzen eine Richtung für eine mögliche Wirkung vorgeben.

#### 4.4.2 Divalproex Natrium zeigt eine vom SNP rs11618521 abhängige Modulation der *KPNA3* Promotoraktivität.

Divalproex Natrium stellt eine 1:1- Mischung aus Valproinsäure (VPA), der künstlich hergestellten Carbonsäure 2-Propylpentansäure, und Valproat, dem Salz der VPA, dar (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH). Es ist ein von der FDA freigegebener Wirkstoff zur Behandlung der Bipolaren Störung, Epilepsie und Migräne (Frankenburg und Zanarini 2002). Divalproex Natrium gehört zu den Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDACi). Diese inhibieren die Deacetylierung von Histonen, sodass die Histone durch die vermehrten Acetylgruppen negativ geladen vorliegen. Da die DNA auch negativ geladen ist, kann sie nicht so eng an die Histone binden, wodurch es zu einer lockereren Chromatinstruktur und folglich zu einer Aktivierung der Transkription kommt (Hebbes et al. 1988, Lee et al. 1993, Rundlett et al. 1996). Der Hauptmechanismus der HDACi beruht daher auf einer Aufrechterhaltung der Transkription durch die Stabilisierung der Histonacetylierung-Homöostase. Der genaue Wirkmechanismus dahinter ist bis heute allerdings noch weitgehend unbekannt. Da HDACi die BHS passieren können (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH), wurden sie bereits auch als therapeutische Mittel für die Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington und der Amyotrophen Lateralsklerose getestet (McCampbell et al. 2001, Steffan et al. 2001, Ferrante et al. 2003, Hockly et al. 2003, Bates et al. 2006, Butler and Bates 2006, Hahnen et al. 2008, Mielcarek et al. 2011, Siebzehrübl et al. 2018).

Der Fragestellung, ob HDACi auch im Rahmen der SCA3 wirken, wurde bereits in einigen Studien nachgegangen. Dies ist in der Hinsicht von Interesse, als dass das pathologische polyQ-Protein in polyQ-Erkrankungen Inklusionen bildet, die Transkriptionsfaktoren rekrutieren und eine transkriptionelle Dysfunktion einleiten können (Steffan et al. 2000, Wood et al. 2000, Li et al. 2002, Evert et al. 2006). Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass die Acetylierung von Histonen in polyQ-Erkrankungen reduziert ist, wodurch die Balance zwischen Histonacetylierung und -deacetylierung verändert ist (Yi et al. 2013, Minamiyama et al. 2004). So führt das expandierte Ataxin-3 in der SCA3 zu

einer Hypoacetylierung von spezifischen Histonen und setzt die Aktivität von Histon-Acetyltransferasen herab (Jung und Bonini 2007, Chou et al. 2014).

Zu den bisher getesteten HDACi im Rahmen der SCA3 gehören unter anderem Valproinsäure (VPA) sowie Natriumbutyrat (Chou et al. 2011, Yi et al. 2013, Chou et al. 2014, Lin XP et al. 2014, Esteves et al. 2015, Lei et al. 2016). VPA und Natriumbutyrat verbesserten in *in vivo* SCA3-Modellen die ataktischen Symptome, indem sie eine Wirkung auf die Transkription durch die Beeinflussung der hypoacetylierten Histon H3- und H4- Spiegel ausübten (Chou et al. 2011, Yi et al. 2013, Chou et al. 2014). Auch unter Divalproex Natrium wurde eine Erhöhung der Acetylierung des Histons H3 beobachtet (Wang et al. 2018b). Während in einem *Drosophila* SCA3-Modell durch die Verwendung von VPA die Neurodegeneration gelindert und die Lebensspanne erhöht werden konnten (Yi et al. 2013), wies eine weitere Studie zu VPA *in vivo* nur eine geringe Verbesserung der motorischen Defizite auf und hatte keine Auswirkungen auf die neuropathologischen Korrelate (Esteves et al. 2015). Durch die zum Teil nur mild ausgefallenen Verbesserungen in diesem SCA3-Mausmodell könnte daher der therapeutische Effekt von HDACi limitiert sein (Esteves et al. 2015, Matos et al. 2019). VPA wurde bereits innerhalb einer klinischen Studie in SCA3-Patienten untersucht, wodurch die Effizienz und Sicherheit von VPA bestätigt werden konnte (Lei et al. 2016). Hohe Dosen von VPA zeigten in dieser Studie positive Effekte auf die Ataxie Symptome von SCA3-Patienten (Lei et al. 2016). Allerdings wurde in dieser Studie nur eine kleine Probandenanzahl (n= 12) für nur 12 Wochen mit VPA behandelt, sodass aus den erhobenen Daten keine endgültigen Rückschlüsse gezogen werden können. Größere, randomisierte Studien sind somit für eine fundierte Beurteilung der Wirkung von VPA in SCA3-Patienten unumgänglich (Lei et al. 2016, Matos et al. 2019).

Acetylasen können Histone, aber auch andere Proteine acetylieren. So zeigte die Acetylase CREB-binding protein (CBP) nicht nur eine Acetylierung von Transkriptionsfaktoren, sondern konnte auch Importin- $\alpha$ -Isoformen, wie KPNA2 (Importin *subunit*  $\alpha$ -1) und KPNA6 (Importin *subunit*  $\alpha$ -7), acetylieren (Bannister et al. 2000). HDACi zeigten in diesem Zusammenhang bereits einen Einfluss

auf die Translokation durch Importine, indem der nukleäre Import durch die erhöhte Acetylierung moduliert wurde (Ryan et al. 2006). Im Rahmen der SCA3 wurde beim Einsatz von Divalproex Natrium bereits eine Einflussnahme auf die Lokalisation von expandiertem Ataxin-3 beobachtet, durch die eine geringere nukleäre Akkumulation und eine geringere zelluläre Toxizität erreicht werden konnten (Wang et al. 2018b). Konkret wurde bereits von einer Wirkung von Divalproex Natrium auf das Transportprotein KPNA2 (Importin *subunit*  $\alpha$ -1) berichtet, dessen Vorkommen mit einer erhöhten Menge an Ataxin-3 im Nukleus und einer erhöhten Aggregationsbildung von mutiertem Ataxin-3 korreliert (Wang et al. 2019). Durch Behandlung mit Divalproex Natrium wurde diese Aggregationsbildung verringert, wodurch angenommen wurde, dass Divalproex Natrium durch die Behinderung der Funktion von KPNA2 auch den Transport von Ataxin-3 in den Nukleus reduziert (Wang et al. 2019).

In unserer Arbeit konnten wir einen Einfluss von Divalproex Natrium auf den Promotorbereich des Transportproteingens *KPNA3* beobachten, dessen exprimiertes Importin KPNA3 in vorherigen Studien für den Transport von Ataxin-3 in den Nukleus verantwortlich gemacht wurde (Sowa et al. 2018). Der in dieser Studie in den Fokus gerückte Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors scheint hierbei die Wirkung von Divalproex Natrium zu modulieren. Es konnte gezeigt werden, dass die zuvor beobachtete, signifikant höhere Genexpression bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes, das am SNP rs11618521 ein Adenin trägt, im Vergleich zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt mit dem SNP= G durch die Zugabe von Divalproex Natrium nicht mehr messbar wurde. Stattdessen wurde eine Tendenz zur Abnahme der RLA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle beobachtet, wenn das pGL3-KPNA3-A Konstrukt (SNP= A) verwendet wurde, während das pGL3-KPNA3-G Konstrukt (SNP= G) eine signifikante Zunahme der RLA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle aufwies.

Offen bleibt die Frage, wie das Divalproex Natrium in diesem Kontext wirkt. Insgesamt kann gesagt werden, dass für unsere Fragestellung die Abnahme der RLA beim *KPNA3* Konstrukt erwünscht ist, da eine Abnahme der *KPNA3* Expression zu einer verringerten Translation von KPNA3 führt, das dann

wiederum weniger expandiertes Ataxin-3 in den Nukleus befördern kann. Möglich wäre die Hypothese, dass Divalproex Natrium Transkriptionsfaktoren beeinflusst, die nur binden können, wenn der SNP= A ist, und die dann durch eine verminderte Andockung an den Promotor zu einer verminderten Transkription des *KPNA3* Gens führen. So könnte Divalproex Natrium möglicherweise eine Wirkung auf den Transkriptionsfaktor C/EBP $\alpha$  haben, der vornehmlich an der Adenin-Variante des SNPs bindet (s. 4.2; Wanner 2021). In diesem Kontext konnte bereits gezeigt werden, dass Valproat die mRNA- und Proteinspiegel des *C/EBP homologous proteins* (CHOP) reduzieren kann (Penas et al. 2011, Huang et al. 2014), wobei es sich beim CHOP um eine weitere Isoform des *CCAAT-enhancer binding proteins* (C/EBP) handelt (Maytin und Habener 1998). Eine andere Studie zeigte hingegen, dass die chronische Gabe von VPA in einem Rattenmodell nicht die DNA-Bindungsaktivität von C/EBP beeinflussen konnte (Rao et al. 2007). Die weitere Erforschung dieser Fragestellung wäre in Hinblick auf unsere erhobenen Ergebnisse deshalb sehr interessant.

Außerdem ist die Beobachtung von Relevanz, dass durch die Zugabe von Divalproex Natrium die zuvor deutlichen Unterschiede zwischen den Genexpressionen des pGL3-KPNA3-A (SNP= A) und pGL3-KPNA3-G Konstruktes (SNP= G) nicht mehr messbar wurden. Die signifikant höhere Genexpression bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes mit dem SNP= A im Vergleich zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt war nach Zugabe von Divalproex Natrium nicht mehr vorhanden, da es zu einer Abnahme der RLA bei den Proben mit dem pGL3-KPNA3-A Konstrukt kam. Das pGL3-KPNA3-G Konstrukt zeigte hingegen eine Tendenz zu einer Zunahme der gemessenen RLA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Somit könnte Divalproex Natrium auch wirken, indem es spezifische Transkriptionsfaktoren binden und beeinflussen könnte, die an beide Varianten des SNPs binden. Als Transkriptionsfaktor, der sowohl an die Adenin- als auch die Guanin-Variante des SNPs binden kann, wurde bereits das Forkhead-Box-Protein P3 identifiziert (FOXP3) (Wanner 2021). FOXP3 wurden schon zahlreiche Funktionen zugesprochen, wobei dieser Transkriptionsfaktor je nach Wirkort zu einer höheren oder niedrigen Expression

des zugehörigen Gens führt (Zheng et al. 2007). Vor allem spielt FOXP3 eine Rolle in der Immunabwehr, indem es ein zentraler Regulator für die Expression von Proteinen darstellt, die notwendig für die Funktion von regulatorischen T-Zellen sind (Hori et al. 2003, Deng et al. 2019, Nagai et al. 2019). Des Weiteren wurde FOXP3 bereits mit diversen Krebsarten (Karanikas et al. 2008, Martin et al. 2010, Rudra et al. 2012, Ren et al. 2020) und Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose (Huan et al. 2005, Sakaguchi et al. 2006, Katoh et al. 2013) in Verbindung gebracht. FOXP3 wird außerdem auch im Kleinhirn exprimiert, was bei einer möglichen Bedeutung im Rahmen der SCA3 von Relevanz ist (Uhlen et al. 2015, Wanner 2021). Die ebenfalls zur FOXP Familie gehörenden Transkriptionsfaktoren FOXP1 und FOXP2 spielen eine Rolle in der Chorea Huntington bei der Expression von wichtigen Genen für das Wachstum, die Proliferation und Differenzierung der Neurone (Hachigian et al. 2017, Titus et al. 2017, Pogoda et al. 2021).

In zahlreichen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivität von FOXP3 durch Histon-Deacetylasen (HDAC) beeinflusst werden kann (Li et al. 2007, Katoh et al. 2013, Nagai et al. 2019). In diesem Zusammenhang wurde ebenfalls eine Wirkung von HDACi auf FOXP3 postuliert. So konnte VPA bereits die Expression von FOXP3 erhöhen, indem es die Klassen 1 und 2a von HDAC hemmt (Fayyad-Kazan et al. 2010, Lin et al. 2021). Auch der HDACi Natriumbutyrat führte zu erhöhten FOXP3 Spiegeln (Cao et al. 2018). Vor diesem Hintergrund könnten die hier beobachteten Effekte auf die *KPNA3* Promotoraktivität bei der Zugabe von Divalproex Natrium auf einer Beeinflussung von FOXP3 beruhen. Da FOXP3 sowohl ein Aktivator als auch ein Repressor der Transkription sein kann (Zheng et al. 2007), ist nicht klar, wie das FOXP3 auf den *KPNA3* Promotor wirkt. Angenommen die Bindung des FOXP3 am *KPNA3* Promotor würde insgesamt zu einer erniedrigten Expression des *KPNA3* Gens führen, könnte durch die Zugabe von Divalproex Natrium die Expression von FOXP3 gesteigert werden, was wiederum zu einer Abnahme der *KPNA3* Genexpression führen würde. So könnte erklärt werden, dass die Genexpression bei Verwendung des Konstruktes mit der Adenin-Variante des SNPs abnahm und die zuvor beobachteten Effekte zwischen dem

pGL3-KPNA3-A (SNP= A) und dem pGL3-KPNA3-G Konstrukt (SNP= G) nicht mehr sichtbar wurden. Allerdings wäre in diesem Fall die Tendenz zu einer Zunahme der Genexpression bei Verwendung des pGL3-KPNA3-G Konstruktes mit dem SNP= G nicht geklärt. Möglicherweise könnten daher auch Kofaktoren involviert sein, die je nach Variante des SNPs zu Unterschieden in der Aktivität des FOXP3 führen könnten. Weitere Analysen auf diesem Gebiet sind erforderlich, um die hier gestellten Hypothesen zu untersuchen. Durch die bereits vorhandenen Erkenntnisse zur Modulation von FOXP3 durch HDACi und die Tatsache, dass FOXP3 sowohl am SNP in der Adenin- als auch in der Guanin-Variante binden kann, wäre die weitere Erforschung dieser Fragestellung von großem Interesse.

#### **4.4.3 Die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Divalproex Natrium und Natriumbutyrat zeigen eine mögliche Wirkung auf die *ATXN3* Promotoraktivität.**

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass Divalproex Natrium die mutierten Ataxin-3 Proteinspiegel senken konnte, während die normalen Ataxin-3 Spiegel nicht verändert wurden (Wang 2015). In unserer Arbeit wirkte das Divalproex Natrium auf das Konstrukt mit dem *ATXN3* Promotor mit einer Tendenz zur Erhöhung der RLA. Auch dieses Ergebnis ist in der Art und Weise von Interesse, als dass bisher nur direkte Reaktionen des Divalproex Natriums auf die Ataxin-3 mRNA oder das Ataxin-3 Protein beobachtet wurden (Wang 2015), während hier gezeigt werden konnte, dass Divalproex Natrium wohl auch Auswirkungen auf den *ATXN3* Promotor haben könnte. In einer weiteren, vorherigen Studie übte Divalproex Natrium keinen Einfluss auf die Ataxin-3 mRNA aus, wodurch davon ausgegangen wurde, dass die Genexpression von Ataxin-3 durch den Wirkstoff nicht beeinflusst wird (Wang et al. 2019). Da unser Versuchsaufbau allerdings auf der Ebene des Promotors eingreift, könnten wir durch diese Arbeit neue Einblicke in den möglichen Wirkmechanismus von Divalproex Natrium erlangt haben. Der im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls getestete HDACi Natriumbutyrat zeigte auch eine Tendenz zur Steigerung der RLA bei Verwendung des *ATXN3* Promotors. Natriumbutyrat, das Natriumsalz der Buttersäure, die ihrerseits natürlicherweise von der Darmflora gebildet wird,

wird in der Regeneration der Darmschleimhaut und als Verarbeitungshilfsmittel in der Nahrungsproduktion eingesetzt (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH). Als HDACi wurde seine Wirkung bereits im Rahmen der SCA3 untersucht. So erzielte Natriumbutyrat in einem transgenen SCA3-Mausmodell eine Verbesserung der ataktischen Symptome, indem es positive Effekte auf die Transkription durch Beeinflussung von hypoacetylierten Histonen ausübte (Chou et al. 2011). Darüber hinaus wirkte Natriumbutyrat auch durch eine Induktion der Autophagie in *in vitro* und *in vivo* SCA3-Modellen (Watchon et al. 2021). Dadurch, dass die hier getesteten HDACi auf den *ATXN3* Promotor zu wirken scheinen, stellen wir im Rahmen dieser Arbeit bisher unbekannte, mögliche Angriffspunkte von HDACi vor. Es bedarf weiterer Forschung, um zu sehen, ob sich die hier gestellten Vermutungen bestätigen lassen.

#### **4.4.4 Sorafenib Tosylate zeigt eine mögliche Wirkung auf die *KPNA3* und *ATXN3* Promotoraktivitäten.**

Sorafenib Tosylate ist ein Multikinase-Inhibitor, der Multikinasen wie Tyrosin-Proteinkinasen und Serin/Threonin-Proteinkinasen inhibiert, die die Aktivität von Enzymen und Transkriptionsfaktoren regulieren (Wilhelm et al. 2008, Keating und Santoro 2009). Durch die Inhibierung der Raf-Kinase und der Raf-Signalkaskade, kommt es durch Sorafenib Tosylate zu einer verminderten Zellteilung und Proliferation. Darüber hinaus konnte bereits durch die Inhibierung des VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*)- Signalweges eine partielle Inhibierung der Tumorangiogenese und somit eine abnehmende Tumorzellproliferation beobachtet werden (Rini 2006, Gollob 2005, Strumberg 2005). Zur Zeit wird Sorafenib Tosylate deshalb in der Behandlung von Nierenzell-, Hepatozellulären- und Schilddrüsenkarzinomen eingesetzt (Llovet et al. 2008, Wilhelm et al. 2008). Zuletzt konnte gezeigt werden, dass Sorafenib ein potenter Inhibitor in der TNF (Tumornekrosefaktor)- abhängigen Nekroptosis ist, die eine programmierte Form der Nekrose von Zellen darstellt (Martens et al. 2017). Außerdem kann Sorafenib die Autophagie induzieren (Ullén et al. 2010, Bareford et al. 2011). Da in der SCA3 die SCA3-Aggregate nicht mehr regelrecht degradiert werden können, weil zahlreiche Proteindegradations-

systeme wie die Autophagie beeinträchtigt sind (Ashkenazi et al. 2017), könnte Sorafenib eine durchaus positive Wirkung auf das Krankheitsgeschehen haben. Da Sorafenib Tosylate auch die BSH überwinden kann (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH), ist es für die mögliche Anwendung in der SCA3-Erkrankung von Interesse. In vorherigen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass das Sorafenib Tosylate eine Wirkung auf die Translokation von Ataxin-3 zu haben scheint (Wang 2015). In unserer Arbeit konnten wir bei den Nicht-PEST-Konstrukten, die ein Fragment des *KPNA3* Promotors enthielten, eine Tendenz zur Abnahme der RLA unter Sorafenib Tosylate Gabe beobachten. Wieso diese Tendenz zur Abnahme bei den PEST-Konstrukten nicht beobachtet werden konnte, ist unklar (s. 4.3). Möglicherweise könnte das Sorafenib Tosylate als Multikinase-Inhibitor eine Wirkung auf einen Transkriptionsfaktor haben, der normalerweise an den *KPNA3* Promotor binden würde, sodass die Transkription des *KPNA3* Gens abnimmt. Da bei dem verwendeten *ATXN3* Kontrollpromotor eine Tendenz zur Zunahme der RLA beobachtet wurde, kann man eventuell annehmen, dass der beobachtete Effekt auf den *KPNA3* Promotor nicht auf einer allgemeinen Wirkung auf Promotoren beruht, sondern spezifisch für den *KPNA3* Promotor sein könnte. Aufgrund der fehlenden Signifikanzen sind allerdings weitere Untersuchungen in anderen Zellmodellen sowie in *in vivo* Modellen notwendig, um hier weitere Rückschlüsse ziehen zu können.

### **4.4.5 Benserazid HCl und Artemether zeigen eine mögliche Wirkung auf die *ATXN3* Promotoraktivität.**

#### **4.4.5.1 Benserazid HCl**

Benserazid Hydrochlorid (HCl) ist ein L-DOPA-Decarboxylase-Inhibitor, das zusätzlich zur Levodopa-Therapie in der Therapie des Morbus Parkinson und des Restless-Legs-Syndroms gegeben wird, da er die Umwandlung von Levodopa in Dopamin in der Peripherie hemmt und somit zu höheren verfügbaren Konzentrationen von Levodopa im Gehirn führt (PubChem, *U.S. National Library of Medicine*, NIH). Benserazid HCl wurde darüber hinaus auch

in der Behandlung anderer Erkrankungen getestet wie in der  $\beta$ -Thalassämie intermedia und major (*European Medicines Agency, PubChem, National Library of Medicine, 2015*) und der Sichelzellanämie (*European Medicines Agency, PubChem, National Library of Medicine, 2019*), da der Wirkstoff die Produktion von fetalem Hämoglobin im Blut zu fördern scheint.

Benserazid HCl kann die BHS nicht überwinden (*PubChem, U.S. National Library of Medicine, NIH*), und wäre somit für die Verwendung im Rahmen der SCA3 nicht unbedingt geeignet. Da Benserazid HCl aber in Voruntersuchungen ebenfalls eine Wirkung auf den Transport von Ataxin-3 gezeigt hatte (*Wang 2015*), könnten noch unbekannte Wirkmechanismen für diesen Effekt verantwortlich sein. Im Vordergrund dieser Arbeit steht die Tatsache, dass bei der Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von Benserazid HCl zu den Zellen die Form einer Dosis-Wirkungs-Kurve erzielt werden konnte. Letztere spricht sehr dafür, dass das Luciferase Assay eine verlässliche Methode darstellt. Während für die Konstrukte mit dem *KPNA3* Promotor tendenziell kein Unterschied gegenüber der DMSO-Kontrolle beobachtet wurde, konnte eine Tendenz zur Zunahme der RLA bei Verwendung des *ATXN3* Promotors gezeigt werden. Wie diese Tendenz zu werten ist, ist aufgrund fehlender weiterer Informationen zum Wirkmechanismus des Wirkstoffes schwierig. Weitere Analysen könnten hier mehr Klarheit schaffen.

### 4.4.5.2 Artemether

Artemether, auch bekannt als Artesunat, ist ein Antimalaria-Mittel, das bereits gegen Malariaparasiten und unterschiedliche Trematoden wie Schistosomen eingesetzt wird (*Shuhua et al. 2002*). Darüber hinaus hat Artemether auch antikanzerogene Eigenschaften, wobei der genaue Wirkmechanismus des Wirkstoffes immer noch unbekannt ist (*Efferth 2006, Wu et al. 2009, Chaturvedi et al. 2010, Crespo-Ortiz und Wei 2012, Das 2015*). Artemether wurden bereits zahlreiche Funktionen zugesprochen: Zum einen kann der Wirkstoff die Autophagie durch Hochregulierung von Beclin-1 induzieren (*Chen K et al. 2014*), was in der Therapie der SCA3, wie zuvor bereits erwähnt, auch hilfreich wäre. Zum anderen kann Artemether die Synthese von NO vermindern, was dem

Entstehen von intrazellulärem oxidativen Stress entgegenwirkt (Aldieri et al. 2003). Da auch der oxidative Stress an der Translokation des Ataxin-3 in den Zellkern beiträgt, könnte eine Verminderung positive Auswirkungen auf die subzelluläre Lokalisation von Ataxin-3 haben (Reina et al. 2010). Auch die Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen werden durch die Inhibition der Cyclooxygenase COX-3 durch Artemether gesenkt (Gale et al. 2007). Darüber hinaus inhibiert Artemether die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B (*Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells*), das eine Rolle in der Pathogenese von neurodegenerativen Erkrankungen zu spielen scheint (Camandola und Mattson 2007, Das 2015). Durch die Inhibierung dieses Faktors könnte Artemether somit neuroprotektive Eigenschaften ausüben. Günstig ist auch die Tatsache, dass Artemether die BHS passieren kann (PubChem, U.S. National Library of Medicine, NIH).

Interessant ist die Entdeckung, dass einige Malaria Parasiten mit Resistenzen gegenüber Artemether eine Mutation in einem Deubiquitinase-Enzym aufweisen (Hunt et al. 2007, Borrmann et al. 2013). Da die aktive Deubiquitinierungs-Aktivität von Ataxin-3 die Ataxin-3 Translokation in den Nukleus fördert (Todi et al. 2007, Todi et al. 2010), könnte dieser Wirkstoff in unserem Therapieansatz von Nutzen sein. Zuvor konnte Artemether die neuronale Dysfunktion in einem *Caenorhabditis elegans* SCA3-Modell verbessern, indem die Spiegel an nukleärem Ataxin-3 und die gesamten Aggregationsspiegel gesenkt wurden (Wang 2015). In unseren Versuchen wurde bei der Zugabe von Artemether zum *ATXN3* Konstrukt eine Tendenz zur Zunahme der RLA beobachtet, während das *KPNA3* Konstrukt eher keine bis eine schwache Tendenz zur Abnahme der RLA zeigte. Die hier beobachtete Wirkung auf den *ATXN3* Promotor, die jedoch nicht signifikant war, könnte ein Hinweis dafür sein, wie der Wirkstoff im Rahmen der SCA3 wirken könnte. Auch hier sind weitere Experimente notwendig, um klare Aussagen treffen zu können.

#### **4.5 Schlussfolgerung**

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der molekularen Analyse des *KPNA3* Promotors, da das Transportprotein *KPNA3* an dem Transport von expandiertem Ataxin-3 beteiligt ist und daher als therapeutischer Angriffspunkt von Interesse ist (Sowa et al. 2018). In diesem Zusammenhang wurde ein Luciferase Assay zur Messung der *KPNA3* Promotoraktivität erfolgreich etabliert und optimiert. Mit diesem Assay wurde es möglich den Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors näher zu betrachten, der in vorherigen Untersuchungen einen Einfluss auf die *KPNA3* Promotoraktivität gezeigt hatte (Wanner 2021). Auch in unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass je nach vorliegender Nukleinbase die beobachteten Effekte variierten: So wurde eine höhere Genexpression beobachtet, wenn an der Stelle des SNPs ein Adenin vorlag und die 5' UTR vorhanden war. Diese Beobachtung ist in dem Hinblick von Interesse, als dass bereits von einer Korrelation zwischen dem SNP und dem Erkrankungsalter von SCA3-Patienten berichtet wurde (Dieterle 2019). Weitere Analysen sind somit notwendig, um feststellen zu können, ob der SNP hilfreich bei der Bestimmung des Erkrankungsalters sein kann.

In dieser Arbeit wurde das Luciferase Assay für die Durchführung eines Medikamenten-Screenings eingesetzt, um die Wirkung unterschiedlicher, vielversprechender Wirkstoffe auf die *KPNA3* bzw. *ATXN3* Promotoraktivität zu beurteilen. Es konnte gezeigt werden, dass der Histon-Deacetylase Inhibitor (HDACi) Divalproex Natrium, dem bereits eine Wirkung in der Translokation von Ataxin-3 zugesprochen wurde (Wang et al. 2018b), möglicherweise eine Modulation der *KPNA3* Promotoraktivität bewirken könnte. Hierbei fiel auf, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors an dieser Wirkung beteiligt zu sein scheint. Die zuvor beobachtete, signifikant höhere Genexpression bei Verwendung des pGL3-KPNA3-A Konstruktes, das in der Adenin-Variante des SNPs vorliegt, wurde im Vergleich zum pGL3-KPNA3-G Konstrukt mit dem SNP= G durch die Zugabe von Divalproex Natrium nicht mehr messbar. Stattdessen wurde bei dem Konstrukt, das in der Guanin-Variante des SNPs vorliegt, eine signifikante Zunahme der

Relativen Luciferase-Aktivität (RLA) beobachtet, während beim pGL3-KPNA3-A Konstrukt (SNP= A) eine Tendenz zu einer Abnahme gemessen wurde. Hierbei könnte Divalproex Natrium möglicherweise einen Transkriptionsfaktor wie das C/EBPalpha in seiner Aktivität beeinflussen, das nur am SNP bindet, wenn hier ein Adenin vorliegt (Wanner 2021). Dies könnte zu einer verminderten Andockung des Transkriptionsfaktors an den Promotor und zu einer verminderten Transkription des *KPNA3* Gens führen. Aus therapeutischer Sicht könnte Divalproex Natrium so zu geringeren Spiegeln an KPNA3 Protein führen, wodurch das Ataxin-3 vermehrt im Zytoplasma verbleiben könnte, anstatt in den Zellkern befördert zu werden. Da die zuvor beobachteten Effekte zwischen den Genexpressionen des pGL3-KPNA3-A (SNP= A) und pGL3-KPNA3-G (SNP= G) Konstruktes nach der Zugabe von Divalproex Natrium nicht mehr messbar wurden, könnte Divalproex Natrium des Weiteren wirken, indem es den Transkriptionsfaktor FOXP3 binden und beeinflussen könnte, der sowohl an der Guanin- als auch an der Adenin-Variante des SNPs bindet (Wanner 2021). In der Literatur finden sich bereits zahlreiche Untersuchungen zu der Beeinflussung von FOXP3 durch Histon-Deacetylasen (Li et al. 2007, Katoh et al. 2013, Nagai et al. 2019) sowie dem Einsatz von HDACi zur Beeinflussung von FOXP3 Spiegeln (Fayyad-Kazan et al. 2010, Cao et al. 2018, Lin et al. 2021). Da FOXP3 auch im Kleinhirn exprimiert wird (Uhlen et al. 2015, Wanner 2021), wären weitere Analysen auf diesem Gebiet von großem Interesse.

Durch unsere Arbeit konnte außerdem erstmalig eine Tendenz einer Wirkung von Divalproex Natrium auf den *ATXN3* Promotor beobachtet werden, da man bisher in der Literatur nur eine Wirkung von Divalproex Natrium auf die Ataxin-3 mRNA oder das Ataxin-3 Protein findet (Wang 2015). Auch der HDACi Natriumbutyrate zeigte eine Tendenz einer Steigerung der Genexpression bei Verwendung des Konstruktes mit einem Fragment des *ATXN3* Promotors. Weitere Studien sind notwendig, um die hier gewonnenen Einblicke in den Wirkmechanismus von Divalproex Natrium als HDACi zu bestätigen. Zusammenfassend kann durch die bisher veröffentlichten Studien davon ausgegangen werden, dass Divalproex Natrium zum einen als HDACi eine positive Wirkung auf die transkriptionelle Dysfunktion ausüben kann, und zum anderen darüber

hinaus auch in den nukleären Transport eingreifen kann. Größere, randomisierte Studien an SCA3-Patienten sind notwendig, um zu beurteilen, ob Divalproex Natrium in der kausalen Therapie der SCA3 eine Option darstellen könnte.

Der Multikinase-Inhibitor Sorafenib Tosylate zeigte eine Tendenz zu einer Senkung der RLA, wenn der pGL3-KPNA3-G Vektor verwendet wurde, der ein Fragment des *KPNA3* Promotors enthält. Bei Verwendung eines PEST-Konstruktes, in das im Rahmen dieser Arbeit eine PEST-Sequenz zur Reduktion der HWZ der Luciferase erfolgreich kloniert wurde, wurde diese Abnahme der RLA allerdings nicht sichtbar. Da durch den Einsatz von PEST-Konstrukten Abnahmen der RLA nicht stärker sichtbar gemacht werden konnten, wurde durch Verwendung der PEST-Konstrukte kein vermehrter Nutzen für das Medikamenten-Screening beobachtet. Sorafenib Tosylate als Multikinase-Inhibitor könnte möglicherweise wirken, indem es einen Transkriptionsfaktor beeinflusst. Des Weiteren bewirkten sowohl Sorafenib Tosylate als auch Benserazid HCl und Artemether eine tendenzielle Zunahme der *ATXN3* Promotoraktivität. Wie diese Beobachtungen genau zu werten sind, sollte Gegenstand weiterer Forschung sein. Unsere Ergebnisse könnten aber dazu beitragen, bisher noch nicht bekannte Wirkmechanismen der Wirkstoffe etwas zu entschlüsseln. Weitere Studien sind notwendig, die den Fokus auf noch weitere Signalwege und Mechanismen richten, die in diesem Zusammenhang wichtig sein könnten. Hierbei sollte die Wirksamkeit der Wirkstoffe weiter eruiert werden, um zu sehen, ob die Wirkstoffe in der Behandlung von SCA3-Patienten eine Therapieoption darstellen könnten.

## **5. Zusammenfassung**

Die Spinozerebelläre Ataxie Typ 3 (SCA3), auch als Machado-Joseph Erkrankung (MJD) bekannt, ist eine neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Form einer autosomal-dominant vererbten Ataxie weltweit. Die Krankheitsursache liegt in einer erhöhten CAG-Wiederholung im *Ataxin-3* Gen (*ATXN3*), die ihrerseits im Ataxin-3 Protein zu einer polyQ-Expansion führt, wodurch die Aggregation des primär zytoplasmatischen Proteins begünstigt wird. Diese Aggregate werden hauptsächlich im Zellkern in Form von intranukleären Inklusionen beobachtet, die durch eine Dysregulation der Transkription und Zellhomöostase zur Neurodegeneration und Apoptose der Zelle beitragen. In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass das Transportprotein Karyopherin  $\alpha$ -3 (*KPNA3*) eine wichtige Rolle beim Transport des mutierten Ataxin-3 Proteins in den Nukleus zu spielen scheint. Da es bisher noch keine kausale Therapie für die SCA3 gibt, könnte eine medikamentöse Herunterregulierung des *KPNA3* in dem Sinne positive Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf und die Symptome von SCA3-Patienten haben, als dass sich das expandierte Ataxin-3 wieder vermehrt im Zytoplasma befinden würde. Das Ziel dieser Arbeit war es somit, die *KPNA3* Promotorregion näher zu analysieren und die Wirkung von vielversprechenden Wirkstoffen auf diesen potenziellen therapeutischen Ansatzpunkt zu beurteilen.

In diesem Zusammenhang haben wir im Rahmen dieser Arbeit ein funktionierendes Reportergen Assay in Form eines Luciferase Assay etabliert, optimiert und validiert, mit dessen Hilfe man die *KPNA3* Promotoraktivität erfolgreich messen kann. Es konnte gezeigt werden, dass der Einzelnukleotidpolymorphismus (SNP) rs11618521 innerhalb des *KPNA3* Promotors die Promotoraktivität von *KPNA3* maßgeblich beeinflusst. Hierbei kam es zu einer höheren Genexpression, wenn an der Stelle des SNPs ein Adenin vorlag und die 5' UTR vorhanden war. Da bereits eine Korrelation zwischen dem SNP und dem Erkrankungsalter beobachtet wurde, sind weitere Analysen notwendig, um zu beurteilen, ob der SNP hilfreich bei der Bestimmung des Erkrankungsalters von SCA3-Patienten sein könnte.

Im Rahmen des Medikamenten-Screenings konnten erfolgreich Dosis-Wirkungs-Kurven generiert werden, wodurch von einer zuverlässigen Methodik ausgegangen werden kann. Der Histon-Deacetylase Inhibitor Divalproex Natrium zeigte eine Modulation der *KPNA3* Promotoraktivität, die abhängig von der jeweiligen Variante des SNPs rs11618521 war. Außerdem wurde eine Tendenz einer Wirkung von Divalproex Natrium auf den *ATXN3* Promotor beobachtet, die so noch nicht beschrieben wurde. Die bisher veröffentlichten Studien sowie die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass Divalproex Natrium als Histon-Deacetylase Inhibitor zum einen eine positive Wirkung auf die transkriptionelle Dysfunktion ausübt, und zum anderen auch in den nukleären Transport von expandiertem Ataxin-3 eingreifen kann. Größere, randomisierte Studien sind notwendig, um die Wirksamkeit und Effizienz einer Behandlung von SCA3-Patienten mit Divalproex Natrium im Sinne einer kausalen Therapie zu eruieren.

Unsere Arbeit stellt zusammenfassend eine erstmalige Untersuchung des *KPNA3* Promotors in dieser Art und Weise dar und bietet einen Ansatz für weitere Untersuchungen. Da das *KPNA3* auch in anderen Erkrankungen wie der Schizophrenie, bipolaren Störung und der Opiat- und Alkoholabhängigkeit eine Rolle zu spielen scheint, kann unser etabliertes und validiertes Assay auch über die SCA3 hinaus eingesetzt werden, um Erkenntnisse über die Promotoraktivität von *KPNA3* im Rahmen anderer Erkrankungen zu gewinnen.

## **6. Englische Zusammenfassung**

Spinocerebellar Ataxia Type 3 (SCA3), also known as Machado-Joseph disease (MJD), is a neurodegenerative disease and the most common form of autosomal dominant inherited ataxias worldwide. SCA3 is caused by a CAG repeat expansion in the *ataxin-3* gene (*ATXN3*) leading to a polyglutamine expansion in the ataxin-3 protein. Due to the expanded polyglutamine tract, the ataxin-3 protein is more prone to misfolding and aggregation. While normal ataxin-3 is primarily located in the cytoplasm, aggregates of mutant ataxin-3 are especially found in the nucleus where nuclear inclusions are formed. These nuclear inclusions lead to a dysregulated transcription and cell homeostasis ending in the neurodegeneration and apoptosis of the cell. In this context, it has been recently shown that the transport protein karyopherin  $\alpha$ -3 (*KPNA3*) plays a key role in the translocation of ataxin-3 into the nucleus. As no causal therapy for SCA3 can be offered so far, the therapeutically induced downregulation of *KPNA3* might lead to beneficial effects for SCA3 patients and offer a good drug target, since the expanded ataxin-3 would be located again mostly in the cytoplasm. Therefore, the main focus of this study was the further analysis of the *KPNA3* promoter region, as well as the evaluation of promising candidate compounds' effects on this potential therapeutic target.

In this context, we have successfully established, optimized and validated a reporter gene assay in form of a luciferase assay to reliably measure the *KPNA3* promoter activity. We could show that the single nucleotide polymorphism (SNP) rs11618521, that is located on the *KPNA3* promoter, regulates significantly the promoter activity. Higher expression levels were observed when the adenine variant of the SNP and the 5' UTR were present. Of note, a correlation between the SNP and the age of onset of SCA3 in patients has already been reported. Further investigations are necessary to see if the SNP could serve as a prediction marker for the age at onset of SCA3 patients. Employing the established luciferase assay to assess the effect of various different compounds on the *KPNA3* promoter activity, we could produce dose-response curves showing that the measured effects were reliable. It was found,

that the histone deacetylase inhibitor divalproex sodium modulates the *KPNA3* promoter activity, which interestingly seems to be connected to the specific variant of the SNP rs11618521. In addition, divalproex sodium tended to have an effect on the *ATXN3* promoter- a discovery that has not been mentioned in literature before. Our results support the findings of previously published data, suggesting that divalproex sodium as a histone deacetylase inhibitor has positive effects on the transcriptional dysfunction, and can further interfere with the nuclear transport of ataxin-3. Larger and randomised studies are necessary to assess the efficacy and suitability of divalproex sodium as a potential drug in the causal therapy of SCA3 patients.

In conclusion, our study represents an analysis of the *KPNA3* promoter that has not been reported in this way before. The established and validated luciferase assay can now serve as a tool for further investigations of the *KPNA3* gene promoter activity. As *KPNA3* plays also a role in other diseases as schizophrenia, bipolar disorder, opiate and alcohol dependence, this assay could be helpful to gain new insights into the *KPNA3* promoter activity beyond SCA3.

## **7. Literaturverzeichnis**

- Alam J and Cook JL (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188: 245-254.
- Aldieri E, Atragene D, Bergandi L, Riganti C, Costamagna C, Bosia A and Ghigo D (2003) Artemisinin inhibits inducible nitric oxide synthase and nuclear factor NF- $\kappa$ B activation. *FEBS Lett* 552: 141-144.
- Almeida-Silva UC, Hallak JEC, Júnior WM and Osório FdL (2013) Association between spinocerebellar ataxias caused by glutamine expansion and psychiatric and neuro- psychological signals—A literature review. *Am J Neurodegener Dis* 2: 57-69.
- Alves S, Nascimento-Ferreira I, Auregan G, Hassig R, Dufour N, Brouillet E, Pedroso de Lima MC, Hantraye P, de Almeida LP and Déglon N (2008) Allele- specific RNA silencing of mutant ataxin-3 mediates neuroprotection in a rat model of Machado-Joseph disease. *PLoS ONE* 3, e3341. doi: 10.1371/journal.pone.0003341.
- Antony PMA, Mäntele S, Mollenkopf P, Boy J, Kehlenbach RH, Riess O and Schmidt T (2009) Identification and functional dissection of localization signals within ataxin-3. *Neurobiol Dis* 36: 280-292.
- Araujo J, Breuer P, Dieringer S, Krauss S, Dorn S, Zimmermann K, Pfeifer A, Klockgether T, Wuellner U and Evert BO (2011) FOXO4- dependent upregulation of superoxide dismutase-2 in response to oxidative stress is impaired in spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 20: 2928-2941.
- Armbrecht M (2013) Detektion von Kontaminationen in DNA und Protein-Proben durch photometrische Messungen. Application Note Nr. 279, Eppendorf AG, Hamburg, Germany.
- Ashkenazi A, Bento CF, Ricketts T, Vicinanza M, Siddiqi F, Pavel M, Squitieri F, Hardenberg MC, Imarisio S, Menzies FM and Rubinsztein DC (2017) Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy. *Nature* 545: 108-111.
- Badner JA and Gershon ES (2002) Meta-analysis of whole-genome linkage scans of bipolar disorder and schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7: 405-411.
- Bailey KR and Crawley JN (2009) Anxiety-related behaviors in mice. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd Edition. Chapter 5. Editor: Buccafusco JJ. CRC Press/Taylor & Francis (Boca Raton, Florida).
- Bannister AJ, Miska EA, Görlich D and Kouzarides T (2000) Acetylation of importin-alpha nuclear import factors by CBP/p300. *Curr Biol* 10: 467-470.
- Bareford MD, Hamed HA, Tang Y, Cruickshanks N, Burow ME, Fisher PB, Moran RG, Nephew KP, Grant S and Dent P (2011) Sorafenib enhances pemetrexed cytotoxicity through an autophagy-dependent mechanism in cancer cells. *Autophagy* 7: 1261-1262.
- Bates EA, Victor M, Jones AK, Shi Y and Hart AC (2006) Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to huntingtin polyglutamine toxicity. *J Neurosci* 26: 2830-2838.
- Baumeister W, Walz J, Zühl F and Seemüller E (1998) The proteasome:

- paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92: 367–380.
- Berthold Technologies (2000) Manual MicroLumat *Plus* LB 96V,  $\mu$ p-Version 2.0. Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, D.
- Bettencourt C, Santos C, Kay T, Vasconcelos J and Lima M (2008). Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees. *J Hum Genet* 53: 920–923.
- Bettencourt C, Santos C, Montiel R, do Carmo Costa M, Cruz-Morales P, Ribeiro Santos L, Simoes N, Kay T, Vasconcelos J, Maciel P and Lima M (2010) Increased transcript diversity: novel splicing variants of Machado-Joseph disease gene (ATXN3). *Neurogenetics* 11: 193-202.
- Bichelmeier U, Schmidt T, Hübener J, Boy J, Rüttiger L, Häbig K, Poths S, Bonin M, Knipper M, Schmidt WJ, Wilbertz J, Wolburg H, Laccone F and Riess O (2007) Nuclear localization of ataxin- 3 is required for the manifestation of symptoms in SCA3: in vivo vivo evidence. *J Neurosci* 27: 7418-7428.
- Bies J, Markus J and Wolff L (2002) Covalent attachment of the SUMO-1 protein to the negative regulatory domain of the c-Myb transcription factor modifies its stability and transactivation capacity. *J Biol Chem* 277: 8999-9009.
- Bilen J and Bonini NM (2007) Genome-wide screen for modifiers of ataxin-3 neurodegeneration in *Drosophila*. *PLoS genet* 3, e177. doi: 10.1371/journal.pgen.0030177.
- Bonanomi M, Natalello A, Visentin C, Pastori V, Penco A, Cornelli G, Colombo G, Malabarba MG, Doglia SM, Relini A, Regonesi ME and Tortora P (2014) Epigallocatechin- 3-gallate and tetracycline differently affect ataxin-3 fibrillogenesis and reduce toxicity in spinocerebellar ataxia type 3 model. *Hum Mol Genet* 23: 6542-6552.
- Borrmann S, Straimer J, Mwai L, Abdi A, Rippert A, Okombo J, Muriithi S, Sasi P, Kortok MM, Lowe B, Campino S, Assefa S, Auburn S, Manske M, Maslen G, Peshu N, Kwiatkowski DP, Marsh K, Nzila A and Clark TG (2013) Genome-wide screen identifies new candidate genes associated with artemisinin susceptibility in *Plasmodium falciparum* in Kenya. *Sci Rep* 3: 3318.
- Boy J, Schmidt T, Wolburg H, Mack A, Nuber S, Böttcher M, Schmitt I, Holzmann C, Zimmermann F, Servadio A und Riess O (2009) Reversibility of symptoms in a conditional mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Hum Mol Genet* 18: 4282-4295.
- Boy J, Schmidt T, Schumann U, Grasshoff U, Unser S, Holzmann C, Schmitt I, Karl T, Laccone F, Wolburg H, Ibrahim S and Riess O (2010) A transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia type 3 re-sembling late disease onset and gender-specific instability of CAG repeats. *Neurobiol Dis* 37: 284-293.
- Bugaut A and Balasubramanian S (2012) 5'-UTR RNA G-quadruplexes: translation regulation and targeting. *Nucleic Acids Res* 40: 4727-4741.
- Buhmann C, Bussopulos A and Oechsner M (2003) Dopaminergic response in Parkinsonian phenotype of Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 18: 219-221.
- Burnett B, Li F and Pittman RN (2003) The polyglutamine neurodegenerative

- protein ataxin-3 binds polyubiquitylated proteins and has ubiquitin protease activity. *Hum Mol Genet* 12: 3195-3205.
- Burnett BG and Pittman RN (2005) The polyglutamine neurodegenerative protein ataxin 3 regulates aggresome formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 4330-4335.
- Bürk K, Abele M, Fetter M, Dichgans J, Skalej M, Laccone F, Didierjean O, Brice A and Klockgether T (1996) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I clinical features and MRI in families with SCA1, SCA2 and SCA3. *Brain* 119: 1497-1505.
- Butler R and Bates GP (2006) Histone deacetylase inhibitors as therapeutics for polyglutamine disorders. *Nat Rev Neurosci* 7: 784-796.
- Camandola S and Mattson MP (2007) NF-kappa B as a therapeutic target in neurodegenerative diseases. *Expert Opin Ther Targets* 11: 123-132.
- Camp NJ, Neuhausen SL, Tiobech J, Polloi A, Coon H and Myles-Worsley M (2001) Genomewide Multipoint Linkage Analysis of Seven Extended Palauan Pedigrees with Schizophrenia, by a Markov-Chain Monte Carlo Method. *Am J Hum Genet* 69: 1278-1289.
- Cancel G, Abbas N, Stevanin G, Dürr A, Chneiweiss H, Néri C, Duyckaerts C, Penet C, Cann HM, Agid Y and Brice A (1995) Marked phenotypic heterogeneity associated with expansion of a CAG repeat sequence at the spinocerebellar ataxia 3/ Machado-Joseph disease locus. *Am J Hum Genet* 57: 809-816.
- Cancel G, Dürr A, Didierjean O, Imbert G, Bürk K, Lezin A, Belal S, Benomar A, Abada-Bendib M, Vial C, Guimarães J, Chneiweiss H, Stevanin G, Yvert G, Abbas N, Saudou F, Lebre A, Yahyaoui M, Hentati F, Vernant J, Klockgether T, Mandel J, Agid Y and Brice A (1997) Molecular and Clinical Correlations in Spinocerebellar Ataxia 2: A Study of 32 Families. *Hum Mol Genet* 6: 709-715.
- Cao T, Zhang X, Chen D, Zhang P, Li Q and Muhammad A (2018) The epigenetic modification during the induction of Foxp3 with sodium butyrate. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 40: 309-318.
- Carmona V, Cunha-Santos J, Onofre I, Simoes AT, Vijayakumar U, Davidson BL and de Almeida LP (2017) Unravelling endogenous MicroRNA system dysfunction as a new pathophysiological mechanism in machado-Joseph disease. *Mol Ther* 25: 1038-1055.
- Carvalho DR, La Rocque-Ferreira A, Rizzo IM, Imamura EU and Speck-Martins CE (2008) Homozygosity Enhances Severity in Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Pediatr Neurol* 38: 296-299.
- Carvalho AL, Silva A and Macedo-Ribeiro S (2018) Polyglutamine- independent features in ataxin-3 aggregation and pathogenesis of Machado-Joseph disease. *Adv Exp Med Biol* 1049: 275-288.
- Chai Y, Koppenhafer SL, Bonini NM and Paulson HL (1999) Analysis of the role of heat shock protein (Hsp) molecular chaperones in polyglutamine disease. *J Neurosci* 19: 10338-10347.
- Chatterjee A, Saha S, Chakraborty A, Silva-Fernandes A, Mandal SM, Nerves-Carvalho A, Liu Y, Pandita RK, Hegde ML, Hegde PM, Boldogh I, Ashizawa T, Koeppen AH, Pandita TK, Maciel P, Sarkar PS and Hazar TK (2015) The role of the mammalian DNA end-processing enzyme

- polynucleotide kinase 30-phosphatase in spinocerebellar ataxia type 3 pathogenesis. *PLoS Genet* 11: e1004749. doi: 10.1371/journal.pgen.1004749.
- Chaturvedi D, Goswami A, Saikia PP, Barua NC and Rao PG (2010) Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents. *Chem Soc Rev* 39: 435-454.
- Chen CM, Weng YT, Chen WL, Lin TH, Chao CY, Lin CH, Chen IC, Lee LC, Lin HY, Wu YR, Chen YC, Chang KH, Tang HY, Cheng ML, Lee-Chen GJ and Lin JY (2014) Aqueous extract of *Glycyrrhiza inflata* inhibits aggregation by upregulating PPARGC1A and NFE2L2-ARE pathways in cell models of spinocerebellar ataxia 3. *Free Radic Biol Med* 71: 339-350.
- Chen EY and Clarke DM (2002) The PEST sequence does not contribute to the stability of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *BMC Biochem* 3: 29.
- Chen K, Shou LM, Lin F, Duan WM, Wu MY, Xie X, Xie YF, Li W and Tao M (2014) Artesunate induces G2/M cell cycle arrest through autophagy induction in breast cancer cells. *Anticancer Drugs* 25: 652-662.
- Chen X, Tang TS, Tu H, Nelson O, Pook M, Hammer R, Nukina N and Bezprozvanny I (2008) Deranged calcium signaling and neurodegeneration in spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 28: 12713-12724.
- Chou AH, Chen SY, Yeh TH, Weng YH and Wang HL (2011) HDAC inhibitor sodium butyrate reverses transcriptional downregulation and ameliorates ataxic symptoms in a transgenic mouse model of SCA3. *Neurobiol Dis* 41: 481-488.
- Chou AH, Chen YL, Hu SH, Chang YM and Wang HL (2014) Polyglutamine-expanded ataxin-3 impairs long-term depression in Purkinje neurons of SCA3 transgenic mouse by inhibiting HAT and impairing histone acetylation. *Brain Res* 1583: 220-229.
- Chou AH, Chen YL, Chiu CC, Yuan SJ, Weng YH, Yeh TH, Lin YL, Fang JM and Wang HL (2015) T1-11 and JMF1907 ameliorate polyglutamine-expanded ataxin-3-induced neurodegeneration, transcriptional dysregulation and ataxic symptom in the SCA3 transgenic mouse. *Neuropharmacology* 99: 308-317.
- Collins FS, Brooks LD and Chakravarti A (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res* 8: 1229-1231.
- Conceicao M, Mendonca L, Nobrega C, Gomes C, Costa P, Hirai H, Moreira JN, Lima MC, Manjunath N and de Almeida LP (2016) Intravenous administration of brain-targeted stable nucleic acid lipid particles alleviates Machado-Joseph disease neurological phenotype. *Biomaterials* 82: 124-137.
- Cortes CJ and La Spada AR (2015) Autophagy in polyglutamine disease: Imposing order on disorder or contributing to the chaos? *Mol. Cell Neurosci* 66: 53-61.
- Coutinho P and Andrade C (1978) Autosomal dominant system degeneration in Portuguese families of the Azores Islands. A new genetic disorder

- involving cerebellar, pyramidal, extrapyramidal and spinal cord motor functions. *Neurology* 28: 703-709.
- Crespo-Ortiz MP and Wei MQ (2012) Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug. *J Biomed Biotechnol* 2012: Article ID 247597. doi: 10.1155/2012/247597.
- Cummings CJ, Mancini MA, Antalffy B, DeFranco DB, Orr HT and Zoghbi HY (1998) Chaperone suppression of aggregation and altered subcellular proteasome localization imply protein misfolding in SCA1. *Nat Genet* 19: 148-154.
- Cunha-Santos J, Duarte-Neves J, Carmona V, Guarente L, de Almeida LP and Cavadas C (2016) Caloric restriction blocks neuropathology and motor deficits in Machado-Joseph disease mouse models through SIRT1 pathway. *Nat Commun* 7: 11445.
- Das AK (2015) Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds. *Ann Med Health Sci Res* 5: 93-102.
- Deng G, Song X and Greene MI (2020) FoxP3 in Treg cell biology: a molecular and structural perspective. *Clin Exp Immunol* 199: 255-262.
- De Wet JR, Wood KV, Helinski DR and DeLuca M (1985) Cloning of firefly luciferase cDNA and the expression of active luciferase in *Escherichia coli*. *PNAS* 82: 7870-7873.
- D'Abreu A, França MC, Paulson HL and Lopes-Cendes I (2010) Caring for Machado-Joseph disease: current understanding and how to help patients. *Parkinsonism Relat Disord* 16: 2-7.
- Davis LI (1995) The nuclear pore complex. *Annu Rev Biochem* 64: 865-896.
- Dieterle MC (2019) Untersuchung des Einflusses von Polymorphismen als modifizierender Faktor der Spinocerebellären Ataxie Typ 3. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- Do Carmo Costa M and Paulson HL (2012) Toward understanding Machado Joseph disease. *Prog Neurobiol* 97: 239-257.
- Do Carmo Costa M, Ashraf NS, Fischer S, Yang Y, Schapka E, Joshi G, McQuade TJ, Dharia RM, Dulchavsky M, Ouyang M, Cook D, Sun D, Larsen MJ, Gestwicki JE, Todi SV, Ivanova MI and Paulson HL (2016) Unbiased screen identifies aripiprazole as a modulator of abundance of the polyglutamine disease protein, ataxin-3. *Brain* 139: 2891-2908.
- Don RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K and Mattick JS (1991) 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Res* 19: 4008.
- Duarte-Neves J, Goncalves N, Cunha-Santos J, Simoes AT, den Dunnen WF, Hirai H, Kügler S, Cavadas C and de Almeida LP (2015) Neuropeptide Y mitigates neuropathology and motor deficits in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 24: 5451-5463.
- Duarte-Neves J, de Almeida LP and Cavadas C (2016) Neuropeptide Y (NPY) as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurobiol Dis* 95: 210-224.
- Duarte-Silva S, Neves-Carvalho A, Soares-Cunha C, Silva JM, Teixeira-Castro A, Vieira R, Silva-Fernandes A and Maciel P (2018) Neuroprotective effects of creatine in the CMVMJD135 mouse model of spinocerebellar

- ataxia type 3. *Mov Disord* 33: 815-826.
- Durcan TM, Kontogiannina M, Thorarinsdottir T, Fallon L, Williams AJ, Djarmati A, Fantaneanu T, Paulson HL and Fon EA (2011) The Machado-Joseph disease-associated mutant form of ataxin-3 regulates parkin ubiquitination and stability. *Hum Mol Genet* 20: 141-154.
- Durr A, Stevanin G, Cancel G, Duyckaerts C, Abbas N, Didierjean O, Chneiweiss H, Benomar A, Lyon-Caen O, Julien J, Serdaru M, Penet C, Agid Y and Brice A (1996) Spinocerebellar ataxia 3 and Machado-Joseph disease: clinical, molecular, and neuropathological features. *Ann Neurol* 39: 490-499.
- Ebersbach G, Sojer M, Valldeoriola F, Wissel J, Müller J, Tolosa E and Poewe W (1999) Comparative analysis of gait in Parkinson's disease, cerebellar ataxia and subcortical arteriosclerotic encephalopathy. *Brain* 122:1349-1355.
- Efferth T (2006) Molecular pharmacology and pharmacogenomics of artemisinin and its derivatives in cancer cells. *Curr Drug Targets* 7: 407-421.
- Egorova P, Popugaeva E and Bezprozvanny I (2015) Disturbed calcium signaling in spinocerebellar ataxias and Alzheimer's disease. *Semin Cell Dev Biol* 40: 127-133.
- Esteves S, Duarte-Silva S, Naia L, Neves-Carvalho A, Teixeira-Castro A, Rego AC, Silva-Fernandes A and Maciel P (2015) Limited effect of chronic valproic acid treatment in a mouse model of machado-joseph disease. *PLoS ONE* 10: e0141610. doi:10.1371/journal.pone.0141610.
- European Medicines Agency, PubChem, National Library of Medicine (2015) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/14/1402-public-summary-opinion-orphan-designation-benserazide-hydrochloride-treatment-beta-thalassaemia\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/14/1402-public-summary-opinion-orphan-designation-benserazide-hydrochloride-treatment-beta-thalassaemia_en.pdf) [Zugriff: 20.06.2020].
- European Medicines Agency, PubChem, National Library of Medicine (2019) [https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/18/2125-public-summary-opinion-orphan-designation-benserazide-hydrochloride-treatment-sickle-cell\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/orphan-designation/eu/3/18/2125-public-summary-opinion-orphan-designation-benserazide-hydrochloride-treatment-sickle-cell_en.pdf) [Zugriff: 20.06.2020].
- Evers MM, Toonen LJA and van Roon-Mom WMC (2014) Ataxin-3 protein and RNA toxicity in spinocerebellar ataxia type 3: current insights and emerging therapeutic strategies. *Mol Neurobiol* 49: 1513-1531.
- Evert B, Vogt I, Kindermann C, Ozimek L, de Vos R, Brunt E, Schmitt I, Klockgether T and Wüllner U (2001) Inflammatory genes are upregulated in expanded ataxin-3-expressing cell lines and spinocerebellar ataxia type 3 brains. *J Neurosci* 21: 5389–5396.
- Evert B, Vogt I, Vieira-Saecker A, Ozimek L, de Vos R, Brunt E, Klockgether T and Wüllner U (2003) Gene expression profiling in ataxin-3 expressing cell lines reveals distinct effects of normal and mutant ataxin-3. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 1006-1018.
- Evert BO, Araujo J, Vieira-Saecker AM, de Vos RAI, Harendza S, Klockgether T and Wüllner U (2006) Ataxin-3 represses transcription via chromatin binding, interaction with histone deacetylase 3, and histone deacetylation. *J Neurosci* 26: 11474-11486.

- Fabre E and Hurt E (1997) Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet* 31: 277-313.
- Farr A and Roman A (1992) A pitfall of using a second plasmid to determine transfection efficiency. *Nucl Acids Res* 20: 920.
- Fayyad-Kazan H, Rouas R, Merimi M, Zein N, Lewalle P, Jebbawi F, Mourtada M, Badran H, Ezzeddine M, Salaun B, Romero P, Burny A, Martiat P and Badran B (2010) Valproate treatment of human cord blood CD4-positive effector T cells confers on them the molecular profile (microRNA signature and FOXP3 expression) of natural regulatory CD4- positive cells through inhibition of histone deacetylase. *J Biol Chem* 285: 20481-20491.
- Feldherr CM and Akin D. EM visualization of nucleocytoplasmic transport processes. *Electron Microsc Rev* 3: 73-86.
- Ferrante RJ, Kubilus JK, Lee J, Ryu H, Beesen A, Zucker B, Smith K, Kowall NW, Ratan RR, Luthi-Carter R and Hersch SM (2003) Histone deacetylase inhibition by sodium butyrate chemotherapy ameliorates the neurodegenerative phenotype in Huntington's disease mice. *J Neurosci* 23: 9418-9427.
- Fowler HL (1984) Machado-Joseph-Azorean disease. A ten-year study. *Arch Neurol* 41: 921-925.
- Frankenburg FR and Zanarini MC (2002) Divalproex sodium treatment of women with borderline personality disorder and bipolar II disorder: a double-blind placebo-controlled pilot study. *J Clin Psychiatry* 63: 442-446.
- Freeman W and Wszolek Z (2005) Botulinum toxin type A for treatment of spasticity in spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Mov Disord* 20: 644.
- Fukuda M, Asano S, Nakamura T, Adachi M, Yoshida M, Yanagida M and Nishida E (1997) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature* 390: 308-311.
- Furusho K, Yoshizawa T and Shoji S (2005) Ectoine alters subcellular localization of inclusions and reduces apoptotic cell death induced by the truncated Machado-Joseph disease gene product with an expanded polyglutamine stretch. *Neurobiol Dis* 20: 170-178.
- Gale GA, Kirtikara K, Pittayakhajonwut P, Sivichai S, Thebtaranonth Y, Thongpanchang C and Vichai V (2007) In search of cyclooxygenase inhibitors, anti-*Mycobacterium tuberculosis* and anti-malarial drugs from Thai flora and microbes. *Pharmacol Ther* 115: 307-351.
- Gao R, Liu Y, Silva-Fernandes A, Fang X, Paulucci-Holthausen A, Chatterjee A, Zhang HL, Matsuura T, Choudhary S, Ashizawa T, Koeppen AH, Maciel P, Hazra TK and Sarkar PS (2015) Inactivation of PNKP by mutant ATXN3 triggers apoptosis by activating the DNA damage-response pathway in SCA3. *PLoS Genet* 11: e1004834. doi: 10.1371/journal.pgen.1004834.
- Ghose R, Shekhtman A, Goger MJ, Ji H and Cowburn D (2001) A novel, specific interaction involving the Csk SH3 domain and its natural ligand. *Nat Struct Biol* 8: 998-1004.
- Gispert S, Twells R, Orozco G, Brice A, Weber J, Heredero L, Scheufler K,

- Riley B, Allotey R, Nothers C, Hillermann R, Lunkes A, Khati C, Stevanin G, Hernandez A, Magarino C, Klockgether T, Durr A, Chneiweiss H, Enczmann J, Farrall M, Beckmann J, Mullan M, Wernet P, Agid Y, Freund H-J, Williamson R, Auburger G and Chamberlain S (1993) Chromosomal assignment of the second locus for autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA2) to chromosome 12q23-24.1. *Nat Genet* 4: 295-299.
- Giunti P, Stevanin G, Worth PF, David G, Brice A and Wood NW (1999) Molecular and clinical study of 18 families with ADCA type II: evidence for genetic heterogeneity and de novo mutation. *Am J Hum Genet* 64: 1594–1603.
- Globas C, du Montcel ST, Baliko L, Boesch S, Depondt C, DiDonato S, Durr A, Filla A, Klockgether T, Mariotti C, Melegh B, Rakowicz M, Ribai P, Rola R, Schmitz-Hubsch T, Szymanski S, Timmann D, van de Warrenburg BP, Bauer P and Schols L (2008) Early symptoms in spinocerebellar ataxia type 1, 2, 3, and 6. *Mov Disord* 23: 2232– 2238.
- Gollob JA (2005) Sorafenib: scientific rationales for single-agent and combination therapy in clear-cell renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer* 4: 167-174.
- Goncalves N, Simoes AT, Cunha RA and de Almeida LP (2013) Caffeine and adenosine A(2A) receptor inactivation decrease striatal neuropathology in a lentiviral-based model of Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 73: 655-666.
- Goncalves N, Simoes AT, Prediger RS, Hirai H, Cunha RA and de Almeida LP (2017) Caffeine alleviates progressive motor deficits in a transgenic mouse model of spinocerebellar ataxia. *Ann Neurol* 81: 407-418.
- Goto J, Watanabe M, Ichikawa Y, Yee S-B, Ihara N, Endo K, Igarashi S, Takiyama Y, Gaspar C, Maciel P, Tsuji S, Rouleau GA and Kanazawa I (1997) Machado-Joseph disease gene products carrying different carboxyl termini. *Neurosci Res* 28: 373-377.
- Görlich D and Kutay U (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 607-660.
- Haacke A, Broadley SA, Boteva R, Tzvetkov N, Hartl FU and Breuer P (2006) Proteolytic cleavage of polyglutamine-expanded ataxin-3 is critical for aggregation and sequestration of non- expanded ataxin-3. *Hum Mol Genet* 15: 555-568.
- Haacke A, Hartl FU and Breuer P (2007) Calpain inhibition is sufficient to suppress aggregation of polyglutamine-expanded ataxin-3. *J Biol Chem* 282: 18851-18856.
- Hachigian LJ, Carmona V, Fenster RJ, Kulicke R, Heilbut A, Sittler A, Pereira de Almeida L, Mesirov JP, Gao F, Kolaczyk ED and Heiman M (2017) Control of Huntington's disease-associated phenotypes by the striatum-enriched transcription factor Foxp2. *Cell Rep* 21: 2688-2695.
- Hahnen E, Hauke J, Tränkle C, Eyüpoglu IY, Wirth B and Blümcke I (2008) Histone deacetylase inhibitors: possible implications for neurodegenerative disorders. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 169-184.

- Harding AE (1982) 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* 105: 1–28.
- Harris GM, Dodelzon K, Gong L, Gonzalez-Alegre P and Paulson HL (2010) Splice isoforms of the polyglutamine disease protein ataxin-3 exhibit similar enzymatic yet different aggregation properties. *PLoS ONE* 5: e13695. doi: 10.1371/journal.pone.0013695.
- Hayashi M, Kobayashi K and Furuta H (2003) Immunohistochemical study of neuronal intranuclear and cytoplasmic inclusions in Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 57: 205–213.
- Hebbes TR, Thorne AW and Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J* 7: 1395-1402.
- Hockly E, Richon VM, Woodman B, Smith DL, Zhou X, Rosa E, Sathasivam K, Ghazi-Noori S, Mahal A, Lowden PAS, Steffan JS, Marsh JL, Thompson LM, Lewis CM, Marks PA and Bates GP (2003) Suberoylanilide hydroxamic acid, a histone deacetylase inhibitor, ameliorates motor deficits in a mouse model of Huntington's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2041-2046.
- Holmes G (1939) The cerebellum of man. *Brain* 62: 1-30.
- Hori S, Nomura T and Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
- Huan J, Culbertson N, Spencer L, Bartholomew R, Burrows GG, Chou YK, Bourdette D, Ziegler SF, Offner H and Vandenbark AA (2005) Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res* 81: 45-52.
- Huang S, Zhu M, Wu W, Rashid A, Liang Y, Hou L, Ning Q and Luo X (2014) Valproate pretreatment protects pancreatic  $\beta$ -cells from palmitate-induced ER stress and apoptosis by inhibiting glycogen synthase kinase-3 $\beta$ . *J Biomed Sci* 21: Article-ID 38. doi: 10.1186/1423-0127-21-38.
- Hunt P, Afonso A, Creasey A, Culleton R, Sidhu AB, Logan J, Valderramos SG, McNae I, Cheesman S, do Rosario V, Carter R, Fidock DA and Cravo P (2007) Gene encoding a deubiquitinating enzyme is mutated in artesunate- and chloroquine-resistant rodent malaria parasites. *Mol Microbiol* 65: 27-40.
- Huntington's Disease Collaborative Research Group (HDCRG) (1993) A novel gene containing a trinucleotide repeat that is expanded and unstable on Huntington's disease chromosomes. *Cell* 72 : 971-983.
- Hübener J, Weber JJ, Richter C, Honold L, Weiss A, Murad F, Breuer P, Wüllner U, Bellstedt P, Paquet-Durand F, Takano J, Saido TC, Riess O and Nguyen HP (2013) Calpain-mediated ataxin-3 cleavage in the molecular pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 (SCA3). *Hum Mol Gen* 22: 508–518.
- Ichikawa Y, Goto J, Hattori M, Toyoda A, Ishii K, Jeong SY, Hashida H, Masuda N, Ogata K, Kasai F, Hirai M, Maciel P, Rouleau GA, Sakaki Y and Kanazawa I (2001) The genomic structure and expression of MJD, the Machado-Joseph disease gene. *J Hum Genet* 46: 413-422.
- Iwata A, Christianson JC, Bucci M, Ellerby LM, Nukina N, Forno LS and Kopito

- RR (2005) Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 13135-13140.
- Iwata A, Nagashima Y, Matsumoto L, Suzuki T, Yamanaka T, Date H, Deoka K, Nukina N and Tsuji S (2009) Intranuclear degradation of polyglutamine aggregates by the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem* 284: 9796-9803.
- Jana NR, Dikshit P, Goswami A, Kotliarova S, Murata S, Tanaka K and Nukina N (2005) Co-chaperone CHIP associates with expanded polyglutamine protein and promotes their degradation by proteasomes. *J Biol Chem* 280: 11635-11640.
- Jardim LB, Silveira I, Pereira ML, Ferro A, Alonso I, do Céu Moreira M, Mendonça P, Ferreirinha F, Sequeiros J and Giugliani R (2001) A survey of spinocerebellar ataxia in South Brazil - 66 new cases with Machado-Joseph disease, SCA7, SCA8, or unidentified disease-causing mutations. *J Neurol* 248: 870-876.
- Jiang H, Tang BS, Xu B, Zhao GH, Shen L, Tang JG, Li QH and Xia K (2005) Frequency analysis of autosomal dominant spinocerebellar ataxias in mainland Chinese patients and clinical and molecular characterization of spinocerebellar ataxia type 6. *Chin Med J (Engl)* 118: 837-843.
- Jung J and Bonini N (2007) CREB-binding protein modulates repeat instability in a *Drosophila* model for polyQ disease. *Science* 315: 1857-1859.
- Kakkar V, Mansson C, de Mattos EP, Bergink S, van der Zwaag M, van Waarde MA, Kloosterhuis NJ, Melki R, van Cruchten RT, Al-Karadaghi S, Arosio P, Dobson CM, Knowles TP, Bates GP, van Deursen JM, Linse S, van de Sluis B, Emanuelsson C and Kampinga HH (2016) The S/T-Rich motif in the DNAJB6 chaperone delays polyglutamine aggregation and the onset of disease in a mouse model. *Mol Cell* 62: 272-283.
- Kampinga HH and Bergink S (2016) Heat shock proteins as potential targets for protective strategies in neurodegeneration. *Lancet Neurol* 15: 748-759.
- Kanazawa I (1999) Molecular pathology of dentatorubral-pallidoluysian atrophy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:1069-1074.
- Kapinos LE, Huang B, Rencurel C and Lim RYH (2017) Karyopherins regulate nuclear pore complex barrier and transport function. *J Cell Biol* 216: 3609-3624.
- Karanikas V, Speletas M, Zamanakou M, Kalala F, Loules G, Kerenidi T, Barde AK, Gourgoulialis KI and Germenis AE (2008) Foxp3 expression in human cancer cells. *J Transl Med* 6: 1-8.
- Katoh H, Zheng P and Liu Y (2013) FOXP3: genetic and epigenetic implications for autoimmunity. *J Autoimmun* 41: 72-78.
- Kawaguchi Y, Okamoto T, Taniwaki M, Aizawa M, Inoue M, Katayama S, Kawakami H, Nakamura S, Nishimura M, Akiguchi I, Kimura J, Narumiya S and Kakizuka A (1994) CAG expansions in a novel gene for Machado-Joseph disease at chromosome 14q32.1. *Nat Genet* 8: 221-228.
- Keating GM and Santoro A (2009) Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. *Drugs* 69: 223-240.
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM and Haussler D (2002) The human genome browser at UCSC. *Genome*

- Res 12: 996-1006.
- Khosravi B, Hartmann H, May S, Möhl C, Ederle H, Michaelsen M, Schludi MH, Dormann D and Edbauer D (2017) Cytoplasmic poly-GA aggregates impair nuclear import of TDP-43 in C9orf72 ALS/FTLD. *Hum Mol Genet* 26: 790-800.
- Kieling C, Prestes PR, Saraiva-Pereira ML and Jardim LB (2007) Survival estimates for patients with Machado-Joseph disease (SCA3). *Clin Genet* 72: 543–545.
- Klockgether T et al. (2018) Ataxien des Erwachsenenalters, S1-Leitlinie. In: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Online: [www.dgn.org/leitlinien](http://www.dgn.org/leitlinien) (abgerufen am 20.07.2021).
- Klockgether T, Mariotti C and Paulson HL (2019) Spinocerebellar ataxia. *Nat Rev Dis Primers* 5:24.
- Kodiha M, Chu A, Matusiewicz N and Stochaj U (2004) Multiple mechanisms promote the inhibition of classical nuclear import upon exposure to severe oxidative stress. *Cell Death Differ* 11: 862-874.
- Kodiha M, Tran D, Qian C, Morogan A, Presley JF, Brown CM and Stochaj U (2008) Oxidative stress mislocalizes and retains transport factor importin- $\alpha$  and nucleoporins Nup153 and Nup88 in nuclei where they generate high molecular mass complexes. *Biochim Biophys Acta* 1783: 405-418.
- Koide R, Kobayashi S, Shimohata T, Ikeuchi T, Maruyama M, Saito M, Yamada M, Takahashi H and Tsuji S (1999) A neurological disease caused by an expanded CAG trinucleotide repeat in the TATA-binding protein gene: a new polyglutamine disease? *Hum Mol Genet* 8: 2047-2053.
- Kraft S, Furtado S, Ranawaya R, Parboosingh J, Bleoo S, McElligott K, Bridge P, Spacey S, Das S and Suchowersky O (2005) Adult onset spinocerebellar ataxia in a Canadian movement disorders clinic. *Can J Neurol Sci* 32: 450–458.
- La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE and Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79.
- Leclerc GM, Boockfor FR, Faught WJ and Frawley LS (2000) Development of a destabilized firefly luciferase enzyme for measurement of gene expression. *Biotechniques* 29: 590-601.
- Lee DY, Hayes JJ, Pruss D and Wolffe AP (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell* 72: 73-84.
- Lei LF, Yang GP, Wang JL, Chuang DM, Song WH, Tang BS and Jiang H (2016) Safety and efficacy of valproic acid treatment in SCA3/MJD patients. *Parkinsonism Relat Disord* 26: 55-61.
- Li F, Macfarlan T, Pittman RN and Chakravarti D (2002) Ataxin-3 is a histone-binding protein with two independent transcriptional corepressor activities. *J Biol Chem* 277: 45004-45012.
- Li B, Samanta A, Song X, Iacono KT, Brennan P, Chatila TA, Roncador G, Banham AH, Riley JL, Wang Q, Shen Y, Saouaf SJ and Greene MI (2007) FOXP3 is a homo-oligomer and a component of a supramolecular regulatory complex disabled in the human XLAAD/IPEX autoimmune

- disease. *Int Immunol* 19: 825-835.
- Li LB, Yu Z, Teng X and Bonini NM (2008) RNA toxicity is a component of ataxin-3 degeneration in *Drosophila*. *Nature* 453: 1107-1111.
- Lilyestrom W, Klein MG, Zhang R, Joachimiak A and Chen XS (2006) Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor. *Genes Dev* 20: 2373-2382.
- Lin XP, Feng L, Xie CG, Chen DB, Pei Z, Liang XL, Xie QY, Li XH and Pan SY (2014) Valproic acid attenuates the suppression of acetyl histone H3 and CREB activity in an inducible cell model of Machado-Joseph disease. *Int J Dev Neurosci* 38: 17-22.
- Lin JR, Huang SH, Wu CH, Chen YW, Hong ZJ, Cheng CP, Sytwu HK and Lin GJ (2021) Valproic acid suppresses autoimmune recurrence and allograft rejection in Islet transplantation through induction of the differentiation of regulatory T cells and can be used in cell therapy for type 1 diabetes. *Pharmaceuticals* 14: 475.
- Lin YC, Boone M, Meuris L, Lemmens I, Van Roy N, Soete A, Reumers J, Moisse M, Plaisance S, Drmanac R, Chen J, Speleman F, Lambrechts D, Van de Peer Y, Tavernier J and Callewaert N (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5: 4767.
- Li Y, Yokota T, Gama V, Yoshida T, Gomez JA, Ishikawa K, Sasaguri H, Cohen HY, Sinclair DA, Mizusawa H and Matsuyama S (2007) Bax-inhibiting peptide protects cells from polyglutamine toxicity caused by Ku70 acetylation. *Cell Death Differ* 14: 2058-2067.
- Lima L and Coutinho P (1980) Clinical criteria for diagnosis of Machado-Joseph disease: report of a non-Azorena Portuguese family. *Neurology* 30: 319-322.
- Liu H, Li X, Ning G, Zhu S, Ma X, Liu X, Liu C, Huang M, Schmitt I, Wüllner U, Niu Y, Guo C, Wang Q and Tang TS (2016) The Machado-Joseph disease deubiquitinase ataxin-3 regulates the stability and apoptotic function of p53. *PLoS Biol* 14: e2000733. doi:10.1371/journal.pbio.2000733.
- Liu T, Han Z, Li H, Zhu Y, Sun Z and Zhu A (2018) LncRNA DLEU1 contributes to colorectal cancer progression via activation of KPNA3. *Mol Cancer* 17: 118.
- Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D and Bruix J (2008) SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359: 378-390.
- Lott K and Cingolani G (2011) The importin  $\beta$  binding domain as a master regulator of nucleocytoplasmic transport. *Biochim Biophys Acta* 1813: 1578-1592.
- Löffler G und Petrides PE (2003) *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg: S. 298. ISBN 978-3-662-06059-9.

- Lu CS, Chang HC, Kuo PC, Liu YL, Wu WS, Weng YH, Yen TC and Chou Y-HW (2004) The parkinsonian phenotype of spinocerebellar ataxia type 3 in a Taiwanese family. *Parkinsonism Relat Disord* 10: 369-373.
- Macedo-Ribeiro S, Cortes L, Maciel P and Carvalho AL (2009) Nucleocytoplasmic shuttling activity of ataxin-3. *PLoS ONE* 4: e5834. doi: 10.1371/journal.pone.0005834.
- Maciel P, Gaspar C, DeStefano AL, Silveira I, Coutinho P, Radvany J, Dawson DM, Sudarsky L, Guimaraes J, Loureiro JEL, Nezarati MM, Corwin LI, Lopes-Cendes I, Rooke K, Rosenberg R, MacLeod P, Farrer LA, Sequeiros J and Rouleau GA (1995) Correlation between CAG repeat length and clinical features in Machado- Joseph disease. *Am J Hum Genet* 57: 54-61.
- Maciel P, do Carmo Costa M, Ferro A, Rousseau M, Santos CS, Gaspar C, Barros J, Rouleau GA, Coutinho P and Sequeiros J (2001) Improvement in the molecular diagnosis of machado-joseph disease. *Arch Neurol* 58: 1821-1827.
- Mao Y, Senic-Matuglia F, Di Fiore PP, Polo S, Hodsdon ME and De Camilli P (2005) Deubiquitinating function of ataxin-3: insights from the solution structure of the Josephin domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12700-12705.
- Martens S, Jeong M, Tonnus W, Feldmann F, Hofmans S, Goossens V, Takahashi N, Bräsen JH, Lee EW, Van der Veken P, Joossens J, Augustyns K, Fulda S, Linkermann A, Song J and Vandenabeele P (2017) Sorafenib tosylate inhibits directly necrosome complex formation and protects in mouse models of inflammation and tissue injury. *Cell Death Dis* 8: e2904. doi: 10.1038/cddis.2017.298
- Martí E (2016) RNA toxicity induced by expanded CAG repeats in Huntington's disease. *Brain Pathol* 26: 779–786.
- Martin F, Ladoire S, Mignot G, Apetoh L and Ghiringhelli F (2010) Human FOXP3 and cancer. *Oncogene* 29: 4121-4129.
- Maruyama H, Izumi Y, Morino H, Oda M, Toji H, Nakamura S and Kawakami H (2002) Difference in disease-free survival curve and regional distribution according to subtype of spinocerebellar ataxia: a study of 1,286 Japanese patients. *Am J Med Genet* 114: 578-583.
- Matos CA, de Macedo-Ribeiro S and Carvalho AL (2011) Polyglutamine diseases: the special case of ataxin-3 and Machado-Joseph disease. *Prog Neurobiol* 95: 26–48.
- Matos CA, de Almeida LP and Nobrega C (2017) Proteolytic cleavage of polyglutamine disease-causing proteins: revisiting the toxic fragment hypothesis. *Curr Pharm Des* 23: 753-775.
- Matos CA, de Almeida LP and Nóbrega C (2019) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3: lessons from disease pathogenesis and clues into therapy. *JNC* 148: 8-28.
- Matsumoto M, Yada M, Hatakeyama S, Ishimoto H, Tanimura T, Tsuji S, Kakizuka A, Kitagawa M and Nakayama KI (2004) Molecular clearance of ataxin-3 is regulated by a mammalian E4. *EMBO J* 23: 659-669.
- Matsumura R, Takayanagi T, Fujimoto Y, Murata K, Mano Y, Horikawa H and Chuma T (1996) The relationship between trinucleotide repeat length

- and phenotypic variation in Machado-Joseph disease. *J Neurol Sci* 139: 52-57.
- Matthews JC, Hori K and Cormier MJ (1977) Purification and properties of *Renilla reniformis* luciferase. *Biochemistry* 16: 85-91.
- Maxwell IH and Maxwell F (1988) Electroporation of mammalian cells with a firefly luciferase expression plasmid: kinetics of transient expression differ markedly among cell types. *DNA* 7: 557-562.
- Maytin EV and Habener JF (1998) Transcription factors C/EBP $\alpha$ , C/EBP $\beta$ , and CHOP (Gadd153) expressed during the differentiation program of keratinocytes in vitro and in vivo. *J Invest Dermatol* 110: 238-246.
- Mazzucchelli S, De Palma A, Riva M, D'Urzo A, Pozzi C, Pastori V, Comelli F, Fusi P, Vanoni M, Tortora P, Mauri P and Regonesi ME (2009) Proteomic and biochemical analyses unveil tight interaction of ataxin-3 with tubulin. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 2485–2492.
- McCampbell A, Taye AA, Whitty L, Penney E, Steffan JS and Fischbeck KH (2001) Histone deacetylase inhibitors reduce polyglutamine toxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 15179-15184.
- McMurtray AM, Clark DG, Flood MK, Perlman S and Mendez MF (2006) Depressive and memory symptoms as presenting features of spinocerebellar ataxia. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 18: 420-422.
- Mendonca LS, Nóbrega C, Hirai H, Kaspar BK and de Almeida LP (2015) Transplantation of cerebellar neural stem cells improves motor coordination and neuropathology in Machado-Joseph disease mice. *Brain* 138: 320-335.
- Menzies FM, Huebener J, Renna M, Bonin M, Riess O and Rubinsztein DC (2010) Autophagy induction reduces mutant ataxin-3 levels and toxicity in a mouse model of spinocerebellar ataxia type 3. *Brain* 133: 93-104.
- Mertens D, Wolf S, Schroeter P, Schaffner C, Dohner H, Stilgenbauer S and Lichter P (2002) Down-regulation of candidate tumor suppressor genes within chromosome band 13q14.3 is independent of the DNA methylation pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 99: 4116-4121.
- Michalík A, Del-Favero J, Mauger C, Löfgren A and Van Broeckhoven C (1999) Genomic organisation of the spinocerebellar ataxia type 7 (SCA7) gene responsible for autosomal dominant cerebellar ataxia with retinal degeneration. *Hum Genet* 105: 410-417.
- Mielcarek M, Benn CL, Franklin SA, Smith DL, Woodman B, Marks PA and Bates GP (2011) SAHA decreases HDAC 2 and 4 levels in vivo and improves molecular phenotypes in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *PLoS ONE* 6: e27746. doi: 10.1371/journal.pone.0027746.
- Miller SG, De Vos P, Guerre-Millo M, Wong K, Hermann T, Staels B, Briggs MR and Auwerx J (1996) The adipocyte specific transcription factor C/EBP $\alpha$  modulates human ob gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5507-5511.
- Minamiyama M, Katsuno M, Adachi H, Waza M, Sang C, Kobayashi Y, Tanaka F, Doyu M, Inukai A and Sobue G (2004) Sodium butyrate ameliorates phenotypic expression in a transgenic mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 13: 1183-1192.

- Moore LR, Rajpal G, Dillingham IT, Qutob M, Blumenstein KG, Gattis D, Hung G, Kordasiewicz HB, Paulson HL and McLoughlin HS (2017) Evaluation of antisense oligonucleotides targeting ATXN3 in SCA3 mouse models. *Mol Ther Nucleic Acids* 7: 200-210.
- Morris CP, Baune BT, Domschke K, Arolt V, Swagell CD, Hughes IP, Lawford BR, Young RM and Voisey J (2012) KPNA3 variation is associated with schizophrenia, major depression, opiate dependence and alcohol dependence. *Dis Markers* 33: 163-170.
- Moseley ML, Benzow KA, Schut LJ, Bird TD, Gomez CM, Barkhaus PE, Blindauer KA, Labuda M, Pandolfo M, Koob MD, Ranum LPW (1998) Incidence of dominant spinocerebellar and Friedreich triplet repeats among 361 ataxia families. *Neurology* 51: 1666-1671.
- Mueller T, Breuer P, Schmitt I, Walter J, Evert BO and Wullner U (2009) CK2-dependent phosphorylation determines cellular localization and stability of ataxin-3. *Hum Mol Genet* 18: 3334-3343.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G and Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Mülhardt C (2013) *Der Experimentator. Molekularbiologie. Genomics.* 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-642-34635-4.
- Myers R, Airey D, Manier D, Shelton R and Sanders-Bush E (2007) Polymorphisms in the regulatory region of the human serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene (HTR2A) influence gene expression. *Biol Psychiatry* 61: 167-173.
- Nachury MV and Weis K (1999) The direction of transport through the nuclear pore can be inverted. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9622-9627.
- Nagai Y, Lam L, Greene MI and Zhang H (2019) FOXP3 and its cofactors as targets of immunotherapies. *Engineering* 5: 115-121.
- Nandagopal R and Moorthy SG (2004) Dramatic levodopa responsiveness of dystonia in a sporadic case of spinocerebellar ataxia type 3. *Postgrad Med J* 80: 363-365.
- Nascimento-Ferreira I, Santos-Ferreira T, Sousa-Ferreira L, Auregan G, Onofre I, Alves S, Dufour N, Colomer Gould VF, Koeppen A, Déglon N and de Almeida LP (2011) Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 and alleviates Machado-Joseph disease. *Brain* 134: 1400-1415.
- Nascimento-Ferreira I, Nobrega C, Vasconcelos-Ferreira A, Onofre I, Albuquerque D, Aveleira C, Hirai H, Deglon N and de Almeida LP (2013) Beclin 1 mitigates motor and neuropathological deficits in genetic mouse models of Machado-Joseph disease. *Brain* 136: 2173-2188.
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> [Zugriff: 22.04.2020].
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> [Zugriff: 10.05.2020].
- Nicastro G, Menon RP, Masino L, Knowles PP, McDonald NQ and Pastore A (2005) The solution structure of the Josephin domain of ataxin-3: structural determinants for molecular recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10493-10498.

- Nicastro G, Todi SV, Karaca E, Bonvin AMJJ, Paulson HL and Pastore A (2010) Understanding the role of the Josephin domain in the PolyUb binding and cleavage properties of ataxin-3. *PLoS ONE* 5: e12430. doi: 10.1371/journal.pone.0012430.
- Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Hirai H, Deglon N and de Almeida LP (2013a) Silencing mutant ataxin-3 rescues motor deficits and neuropathology in Machado-Joseph disease transgenic mice. *PLoS ONE* 8, e52396. doi: 10.1371/journal.pone.0052396.
- Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Conceicao M, Deglon N and de Almeida LP (2013b) Overexpression of mutant ataxin-3 in mouse cerebellum induces ataxia and cerebellar neuropathology. *Cerebellum* 12: 441-455.
- Nobrega C, Nascimento-Ferreira I, Onofre I, Albuquerque D, Deglon N and de Almeida LP (2014) RNA interference mitigates motor and neuropathological deficits in a cerebellar mouse model of Machado-Joseph disease. *PLoS ONE* 9, e100086. doi: 10.1371/journal.pone.0100086.
- Onodera O, Idezuka J, Igarashi S, Takiyama Y, Endo K, Takano H, Oyake M, Tanaka H, Inuzuka T, Hayashi T, Yuasa T, Ito J, Miyatake T and Tsuji S (1998) Progressive atrophy of cerebellum and brainstem as a function of age and the size of the expanded CAG repeats in the MJD1 gene in Machado-Joseph disease. *Ann Neurol* 43: 288-296.
- Onofre I, Mendonca N, Lopes S, Nobre R, de Melo JB, Carreira IM, Januario C, Goncalves AF and de Almeida LP (2016) Fibroblasts of Machado Joseph Disease patients reveal autophagy impairment. *Sci Rep* 6: 28220.
- Orr HT, Chung MY, Banfi S, Kwiatkowski Jr TJ, Servadio A, Beaudet AL, McCall AE, Duvick LA, Ranum LPW and Zoghbi HY (1993) Expansion of an unstable trinucleotide CAG repeat in spinocerebellar ataxia type 1. *Nat Genet* 4: 221-226.
- Padiath QS, Srivastava AK, Roy S, Jain S and Brahmachari SK (2005) Identification of a novel 45 repeat unstable allele associated with a disease phenotype at the MJD1/SCA3 locus. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 133B: 124-126.
- Palliyath S, Hallett M, Thomas SL and Lebedowska MK (1998) Gait in patients with cerebellar ataxia. *Mov Disord* 13: 958-964.
- Panté N and Aebi U (1996) Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31: 153-199.
- Paulson HL, Das SS, Crino PB, Perez MK, Patel SC, Gotsdiner D, Fischbeck KH and Pittman RN (1997a) Machado-Joseph disease gene product is a cytoplasmic protein widely expressed in brain. *Ann Neurol* 41: 453-462.
- Paulson HL, Perez MK, Trottier Y, Trojanowski JQ, Subramony SH, Das SS, Vig P, Mandel JL, Fischbeck KH and Pittman RN (1997b) Intranuclear inclusions of expanded polyglutamine protein in spinocerebellar ataxia type 3. *Neuron* 19: 333-344.
- Paulson H (2012) Machado-Joseph disease/spinocerebellar ataxia type 3. *Handb Clin Neurol* 103: 437-449.
- Paulson HL, Shakkottai VG, Clark HB and Orr HT (2017) Polyglutamine spinocerebellar ataxias – from genes to potential treatments. *Nat Rev*

- Neurosci 18: 613-626.
- Pedersen AG, Baldi P, Chauvin Y and Brunak S (1999) The biology of eukaryotic promoter prediction - a review. *Comput Chem* 23: 191-207.
- Pemberton LF and Paschal BM (2005) Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* 6: 187-198.
- Penas C, Verdu E, Asensio-Pinilla E, Guzman-Lenis MS, Herrando-Grabulosa M, Navarro X and Casas C (2011) Valproate reduces CHOP levels and preserves oligodendrocytes and axons after spinal cord injury. *Neuroscience* 178: 33-44.
- Perez MK, Paulson HL, Pendse SJ, Saionz SJ, Bonini NM and Pittman RN (1998) Recruitment and the role of nuclear localization in polyglutamine-mediated aggregation. *J Cell Biol* 143: 1457-1470.
- Pogoda A, Chmielewska N, Maciejak P and Szyndler J (2021) Transcriptional dysregulation in Huntington's Disease. The role in pathogenesis and potency for pharmacological targeting. *Curr Med Chem* 28: 2783-2806.
- Poon IK and Jans DA (2005) Regulation of nuclear transport: central role in development and transformation? *Traffic* 6: 173-186.
- Pozzi C, Valtorta M, Tedeschi G, Galbusera E, Pastori V, Bigi A, Nonnis S, Grassi E and Fusi P (2008) Study of subcellular localization and proteolysis of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 30: 190-200.
- Promega (2001) pRL-CMV Vector. Technical bulletin TB237. Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA.
- Promega (2015) Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System. Technical manual TM058. Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA.
- PubChem, U.S. National Library of Medicine, National Institutes of Health (NIH): <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> [Zugriff: 07.06.2020].
- Ranum LP, Lundgren JK, Schut LJ, Ahrens MJ, Perlman S, Aita J, Bird TD, Gomez C and Orr HT (1995) Spinocerebellar ataxia type 1 and Machado-Joseph disease: incidence of CAG expansions among adult-onset ataxia patients from 311 families with dominant, recessive, or sporadic ataxia. *Am J Hum Genet* 57: 603-608.
- Rao JS, Bazinet RP, Rapoport SI and Lee HJ (2007) Chronic treatment of rats with sodium valproate downregulates frontal cortex NF- $\kappa$ B DNA binding activity and COX-2 mRNA 1. *Bipolar Disord* 9: 513-520.
- Ravikumar B, Duden R and Rubinsztein DC (2002) Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet* 11: 1107-1117.
- Rechsteiner M, Rogers S and Rote K (1987) Protein-structure and intracellular stability. *Trends Biochem Sci* 12: 390-394.
- Rechsteiner M and Rogers SW (1996) PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci* 21: 267-271.
- Rehm H und Letzel T (2016) *Der Experimentator. Proteinbiochemie. Proteomics*. 7. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN 978-3-662-48850-8.
- Reina CP, Zhong X and Pittman RN (2010) Proteotoxic stress increases nuclear localization of ataxin-3. *Hum Mol Genet* 19: 235-249.
- Ren J, Liu Y, Wang S, Wang Y, Li W, Chen S, Cui D, Yang S, Li MY, Feng B, Lai PBS and Chen GC (2020) The FKH domain in FOXP3 mRNA

- frequently contains mutations in hepatocellular carcinoma that influence the subcellular localization and functions of FOXP3. *J Biol Chem* 295: 5484-5495.
- Riess O, Schmidt T and Ludger S (2001) Autosomal dominant vererbte spinocerebellare Ataxien: Klinik, Genetik und Pathogenese. *Dtsch Arztebl* 98: 1546-1558.
- Riess O, Rüb U, Pastore A, Bauer P and Schöls L (2008) SCA3: neurological features, pathogenesis and animal models. *Cerebellum* 7: 125-137.
- Riley BE and Orr HT (2006) Polyglutamine neurodegenerative diseases and regulation of transcription: assembling the puzzle. *Genes Dev* 20: 2183-2192.
- Rini BI (2006) Sorafenib. *Expert Opin Pharmacother* 7: 453-461.
- Rodrigues AJ, do Carmo Costa M, Silva TL, Ferreira D, Bajanca F, Logarinho E and Maciel P (2010) Absence of ataxin-3 leads to cytoskeletal disorganization and increased cell death. *Biochim Biophys Acta* 1803: 1154-1163.
- Rogers S, Wells R and Rechsteiner M (1986) Amino-acid-sequences common to rapidly degraded proteins – the pest hypothesis. *Science* 234: 364-368.
- Romano S, Coarelli G, Marcotulli C, Leonardi L, Piccolo F, Spadaro M, Frontali M, Ferraldeschi M, Vulpiani MC, Ponzelli F, Salvetti M, Orzi F, Petrucci A, Vanacore N, Casali C and Ristori G (2015) Riluzole in patients with hereditary cerebellar ataxia: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Neurol* 14: 985-991.
- Rosenberg RN (1992) Machado-Joseph disease: An autosomal dominant motor system degeneration. *Mov Disord* 7: 193-203.
- Ross CA and Poirier MA (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 10: 10-17.
- Rudra D, deRoos P, Chaudhry A, Niec RE, Arvey A, Samstein RM, Leslie C, Shaffer SA, Goodlett DR and Rudensky AY (2012) Transcription factor Foxp3 and its protein partners form a complex regulatory network. *Nat Immunol* 13: 1010-1019.
- Rundlett SE, Carmen AA, Kobayashi R, Bavykin S, Turner BM and Grunstein M (1996) HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14503-14508.
- Rüb U, Brunt ER and Deller T (2008) New insights into the pathoanatomy of spinocerebellar ataxia type 3 (Machado-Joseph disease). *Curr Opin Neurol* 21: 111–116.
- Ryan CM, Harries JC, Kindle KB, Collins HM and Heery DM (2006) Functional interaction of CREB binding protein (CBP) with nuclear transport proteins and modulation by HDAC inhibitors. *Cell Cycle* 5: 2146-2152.
- Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T and Nomura T (2006) Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 212: 8-27.
- Saute JA, de Castilhos RM, Monte TL, Schumacher-Schuh AF, Donis KC, D'Avila R, Souza GN, Russo AD, Furtado GV, Gheno TC, de Souza DO,

- Portela LV, Saraiva-Pereira ML, Camey SA, Torman VB, de Mello Rieder CR and Jardim LB (2014) A randomized, phase 2 clinical trial of lithium carbonate in Machado-Joseph disease. *Mov Disord* 29: 568-573.
- Saute JAM and Jardim LB (2015) Machado Joseph disease: clinical and genetic aspects, and current treatment. *Expert Opin Orphan Drugs* 3: 517-535.
- Schaaf CP und Zschocke J (2013) *Basiswissen Humangenetik*. 2. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. ISBN-13 978-3-642-28906-4.
- Scherzed W, Brunt ER, Heinsen H, de Vos RA, Seidel K, Bürk K, Schöls L, Auburger G, Del Turco D, Deller T, Korf HW, den Dunnen WF and Rüb U (2012) Pathoanatomy of cerebellar degeneration in spinocerebellar ataxia type 2 (SCA2) and type 3 (SCA3). *Cerebellum* 11: 749–760.
- Schmidt J, Schmidt T, Golla M, Lehmann L, Weber JJ, Hubener-Schmid J and Riess O (2016) In vivo assessment of riluzole as a potential therapeutic drug for spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurochem* 138: 150-162.
- Schmidt T, Landwehrmeyer GB, Schmitt I, Trottier Y, Auburger G, Laccone F, Klockgether T, Völpel M, Epplen JT, Schöls L and Riess O (1998) An isoform of ataxin-3 accumulates in the nucleus of neuronal cells in affected brain regions of SCA3 patients. *Brain Pathol* 8: 669-679.
- Schmidt T, Lindenberg KS, Krebs A, Schöls L, Laccone F, Herms J, Rechsteiner M, Riess O and Landwehrmeyer B (2002) Protein surveillance machinery in brains with spinocerebellar ataxia type 3: Redistribution and differential recruitment of 26S proteasome subunits and chaperones to neuronal intranuclear inclusions. *Ann Neurol* 51: 302-310.
- Schmitt I, Evert BO, Khazneh H, Klockgether T and Wuellner U (2003) The human *MJD* gene: genomic structure and functional characterization of the promoter region. *Gene* 314: 81-88.
- Schmitz S (2011) *Der Experimentator. Zellkultur*. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg. ISBN 978-3-8274-2572-0.
- Schöls L, Amoiridis G, Epplen JT, Langkafel M, Przuntek H and Riess O (1996) Relations between genotype and phenotype in German patients with the Machado-Joseph disease mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 61: 466-470.
- Schöls L, Amoiridis G, Büttner T, Przuntek H, Epplen JT and Riess O (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia: Phenotypic differences in genetically defined subtypes? *Ann Neurol* 42: 924-932.
- Schöls L, Bauer P, Schmidt T, Schulte T and Riess O (2004) Autosomal dominant cerebellar ataxias: clinical features, genetics, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 3: 291-304.
- Schwamborn K, Albig W and Doenecke D (1998) The histone H1(0) contains multiple sequence elements for nuclear targeting. *Exp Cell Res* 244: 206-217.
- Seidel K, den Dunnen WFA, Schultz C, Paulson H, Frank S, de Vos RA, Brunt ER, Deller T, Kampinga HH and Rüb U (2010) Axonal inclusions in Spinocerebellar ataxia type 3. *Acta Neuropathol* 120: 449-460.
- Selden RF, Howie KB, Rowe ME, Goodman HM and Moore DD (1986) Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing

- transient gene expression. *Mol Cell Biol* 6: 3173-3179.
- Sequeiros J and Coutinho P (1993) Epidemiology and clinical aspects of Machado-Joseph disease. *Adv Neurol* 61: 139-153.
- Serrao M, Pierelli F, Ranavolo A, Draicchio F, Conte C, Don R, Di Fabio R, LeRose M, Padua L, Sandrini G and Casali C (2012) Gait pattern in inherited cerebellar ataxias. *Cerebellum* 11: 194-211.
- Shakkottai VG, do Carmo Costa M, Dell'Orco JM, Sankaranarayanan A, Wulff H and Paulson HL (2011) Early changes in cerebellar physiology accompany motor dysfunction in the polyglutamine disease spinocerebellar ataxia type 3. *J Neurosci* 31: 13002-13014.
- Shaw G, Morse S, Ararat M and Graham FL (2002) Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J* 16: 869-871.
- Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, Baker J, Phan L, Smigielski EM and Sirotkin K (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res* 29: 308-311.
- Shibata-Hamaguchi A, Ishida C, Iwasa K and Yamada M (2009) Prevalence of spinocerebellar degenerations in the Hokuriku district in Japan. *Neuroepidemiology* 32: 176-183.
- Shuhua X, Tanner M, N'Goran EK, Utzinger J, Chollet J, Bergquist R, Minggang C and Jiang Z (2002) Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Trop* 82: 175-181.
- Siebzehnrübl FA, Raber KA, Urbach YK, Schulze-Krebs A, Canneva F, Mocerri S, Habermeyer J, Achoui D, Gupta B, Steindler DA, Stephan M, Nguyen HP, Bonin M, Riess O, Bauer A, Aigner L, Couillard-Despres S, Paucar MA, Svenningsson P, Osmand A, Andrew A, Zabel C, Weiss A, Kuhn R, Moussaoui S, Blockx I, Van der Linden A, Cheong RY, Roybon L, Petersén A, and von Hörsten S (2018) Early postnatal behavioral, cellular, and molecular changes in models of Huntington disease are reversible by HDAC inhibition. *PNAS* 115: E8765-E8774.
- Silva A, de Almeida AV and Macedo-Ribeiro S (2017) Polyglutamine expansion diseases: more than simple repeats. *J Struct Biol* 201: 139-154.
- Silveira I, Coutinho P, Maciel P, Gaspar C, Hayes S, Dias A, Guimarães J, Loureiro L, Sequeiros J and Rouleau GA (1998) Analysis of SCA1, DRPLA, MJD, SCA2, and SCA6 CAG repeats in 48 Portuguese ataxia families. *Am J Med Genet* 81: 134-138.
- Simoës AT, Goncalves N, Koeppen A, Déglon N, Kügler S, Duarte CB, de Almeida LP (2012) Calpastatin-mediated inhibition of calpains in the mouse brain prevents mutant ataxin 3 proteolysis, nuclear localization and aggregation, relieving Machado-Joseph disease. *Brain* 135: 2428-2439.
- Simoës AT, Goncalves N, Nobre RJ, Duarte CB and de Almeida LP (2014) Calpain inhibition reduces ataxin-3 cleavage alleviating neuropathology and motor impairments in mouse models of Machado-Joseph disease. *Hum Mol Genet* 23: 4932-4944.
- Soloviev MM (2000) Detection of a surface-exposed PEST like sequence in the metabotropic glutamate receptor mGluR1 alpha. *Bioinformatics* 16: 837-

- 838.
- Sowa AS, Martin E, Martins IM, Schmidt J, Depping R, Weber JJ, Rother F, Hartmann E, Bader M, Riess O, Tricoire H and Schmidt T (2018) Karyopherin  $\alpha$ -3 is a key protein in the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 3 controlling the nuclear localization of ataxin-3. *Proc Natl Acad Sci USA* 115: 2624-2633.
- Steffan JS, Kazantsev A, Spasic-Boskovic O, Greenwald M, Zhu YZ, Gohler H, Wanker EE, Bates GP, Housman DE and Thompson LM (2000) The Huntington's disease protein interacts with p53 and CREB-binding protein and represses transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6763-6768.
- Steffan JS, Bodai L, Pallos J, Poelman M, McCampbell A, Apostol BL, Kazantsev A, Schmidt E, Zhu YZ, Greenwald M, Kurokawa R, Housman DE, Jackson GR, Marsh JL and Thompson LM (2001) Histone deacetylase inhibitors arrest polyglutamine-dependent neurodegeneration in *Drosophila*. *Nature* 413: 739-743.
- Stoffler D, Fahrenkrog B and Aebi U (1999) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 11: 391-401.
- Strumberg D (2005) Preclinical and clinical development of the oral multikinase inhibitor sorafenib in cancer treatment. *Drugs Today (Barc)* 41: 773-784. doi: 10.1358/dot.2005.41.12.937959.
- Subramony SH (2007) SARA - a new clinical scale for the assessment and rating of ataxia. *Nat Rev Neurol* 3: 136-137.
- Sudarsky L, Corwin L and Dawson DM (1992) Machado-Joseph disease in New England: clinical description and distinction from the olivopontocerebellar atrophies. *Mov Disord* 7: 204-208.
- Sudarsky L and Coutinho P (1995) Machado-Joseph disease. *Clin Neurosci* 3: 17-22.
- Sun J, Xu H, Negi S, Subramony SH and Hebert MD (2007) Differential effects of polyglutamine proteins on nuclear organization and artificial reporter splicing. *J Neurosci Res* 85: 2306-2317.
- Sun YM, Lu C und Wu ZY (2016) Spinocerebellar ataxia: relationship between phenotype and genotype - a review. *Clin Genet* 90: 305-314.
- Sutton JR, Blount JR, Libohova K, Tsou WL, Joshi GS, Paulson HL, do Carmo Costa M, Scaglione KM and Todi SV (2017) Interaction of the polyglutamine protein ataxin-3 with Rad23 regulates toxicity in *Drosophila* models of Spinocerebellar Ataxia Type 3. *Hum Mol Genet* 26: 1419-1431.
- Tait D, Riccio M, Sittler A, Scherzinger E, Santi S, Ognibene A, Maraldi NM, Lehrach H and Wanker EE (1998) Ataxin-3 is transported into the nucleus and associates with the nuclear matrix. *Hum Mol Genet* 7: 991-997.
- Takahashi T, Katada S and Onodera O (2010) Polyglutamine diseases: Where does toxicity come from? What is toxicity? Where are we going? *J Mol Cell Biol* 2: 180-191.
- Takeda S, Fujiwara T, Shimizu F, Kawai A, Shinomiya K, Okuno S, Ozaki K, Katagiri T, Shimada Y, Nagata M, Watanabe T, Takaichi A, Kuga Y,

- Suzuki M, Hishigaki H, Takahashi E, Shin S, Nakamura Y and Hirai Y (1997) Isolation and mapping of karyopherin  $\alpha 3$  (KPNA3), a human gene that is highly homologous to genes encoding *Xenopus* importin, yeast SRP1 and human RCH1. *Cytogenet Cell Genet* 76: 87–93.
- Takei A, Honma S, Kawashima A, Yabe I, Fukazawa T, Hamada K, Hamada T and Tashiro K (2002) Beneficial effects of tandospirone on ataxia of a patient with Machado-Joseph disease. *Psychiatry Clin Neurosci* 56: 181-185.
- Takei A, Fukazawa T, Hamada T, Sohma H, Yabe I, Sasaki H and Tashiro K (2004) Effects of tandospirone on “5-HT<sub>1A</sub> receptor-associated symptoms” in patients with Machado-Joseph disease: an open-label study. *Clin Neuropharmacol* 27: 9-13.
- Takei A, Hamada S, Homma S, Hamada K, Tashiro K and Hamada T (2010) Difference in the effects of tandospirone on ataxia in various types of spinocerebellar degeneration: an open-label study. *Cerebellum* 9: 567-570.
- Takei H and Kobayashi SS (2019) Targeting transcription factors in acute myeloid leukemia. *Int J Hematol* 109: 28-34.
- Takiyama Y, Nishizawa M, Tanaka H, Kawashima S, Sakamoto H, Karube Y, Shimazaki H, Soutome M, Endo K, Ohta S, Kagawa Y, Kanazawa I, Mizuno Y, Yoshida M, Yuasa T, Horikawa Y, Oyanagi K, Nagai H, Kondo T, Inuzuka T, Onodera O and Tsuji S (1993) The gene for Machado-Joseph disease maps to human chromosome 14q. *Nat Genet* 4: 300-304.
- Tang B, Liu C, Shen L, Dai H, Pan Q, Jing L, Ouyang S and Xia J (2000) Frequency of SCA1, SCA2, SCA3/MJD, SCA6, SCA7, and DRPLA CAG trinucleotide repeat expansion in patients with hereditary spinocerebellar ataxia from Chinese kindreds. *Arch Neurol* 57: 540-544.
- Tao RS, Fei EK, Ying Z, Wang HF and Wang GH (2008) Casein kinase 2 interacts with and phosphorylates ataxin-3. *Neurosci Bull* 24: 271-277.
- Taupin P (2006) The therapeutic potential of adult neural stem cells. *Curr Opin Mol Ther* 8: 225-231.
- Teixeira-Castro A, Jalles A, Esteves S, Kang S, da Silva Santos L, Silva-Fernandes A, Neto MF, Brielmann RM, Bessa C, Duarte-Silva S, Miranda A, Oliveira S, Neves-Carvalho A, Bessa J, Summavielle T, Silverman RB, Oliveira P, Morimoto RI and Maciel P (2015) Serotonergic signalling suppresses ataxin 3 aggregation and neurotoxicity in animal models of Machado-Joseph disease. *Brain* 138: 3221-3237.
- Timm M, Saaby L, Moesby L and Hansen EW (2013) Considerations regarding use of solvents in in vitro cell based assays. *Cytotechnology* 65: 887-894.
- Titus ASCLS, Yusuff T, Cassar M, Thomas E, Kretzschmar D and D’Mello SR (2017) Reduced expression of Foxp1 as a contributing factor in Huntington's disease. *J Neurosci* 37: 6575-6587
- Todd PK, Oh SY, Krans A, He F, Sellier C, Frazer M, Renoux AJ, Chen KC, Scaglione KM, Basrur V, Elenitoba-Johnson K, Vonsattel JP, Louis ED, Sutton MA, Taylor JP, Mills RE, Charlet-Berguerand N and Paulson HL (2013) CGG repeat-associated translation mediates neurodegeneration

- in fragile X tremor ataxia syndrome. *Neuron* 78: 440-455.
- Todi SV, Laco MN, Winborn BJ, Travis SM, Wen HM and Paulson HL (2007) Cellular turnover of the polyglutamine disease protein ataxin-3 is regulated by its catalytic activity. *J Biol Chem* 282: 29348-29358.
- Todi SV, Scaglione KM, Blount JR, Basrur V, Conlon KP, Pastore A, Elenitoba-Johnson K and Paulson HL (2010) Activity and cellular functions of the deubiquitinating enzyme and polyglutamine disease protein ataxin-3 are regulated by ubiquitination at lysine 117. *J Biol Chem* 285: 39303-39313.
- Torashima T, Koyama C, Iizuka A, Mitsumura K, Takayama K, Yanagi S, Oue M, Yamaguchi H and Hirai H (2008) Lentivector-mediated rescue from cerebellar ataxia in a mouse model of spinocerebellar ataxia. *EMBO Rep* 9: 393-399.
- Trottier Y, Cancel G, An-Gourfinkel I, Lutz Y, Weber C, Brice A, Hirsch E and Mandel JL (1998) Heterogeneous intracellular localization and expression of ataxin-3. *Neurobiol Dis* 5: 335-347.
- Tsou WL, Hosking RR, Burr AA, Sutton JR, Ouyang M, Du X, Gomez CM and Todi SV (2015) DnaJ-1 and karyopherin  $\alpha 3$  suppress degeneration in a new *Drosophila* model of spinocerebellar ataxia type 6. *Hum Mol Genet* 24: 4385-4396.
- Tu Y, Liu H, Zhu X, Shen H, Ma X, Wang F, Huang M, Gong J, Li X, Wang Y, Guo C and Tang TS (2017) Ataxin-3 promotes genome integrity by stabilizing Chk1. *Nucleic Acids Res* 45: 4532-4549.
- Tudini E, Burke LJ, Whiley PJ, Sevcik J, Spurdle AB and Brown MA (2019) Letter to the Editor. Caution: Plasmid DNA topology affects luciferase assay reproducibility and outcomes. *BioTechniques* 67: 94-96. doi: 10.2144/btn-2019-0060.
- Tuite PJ, Rogaeva EA, George-Hyslop PH and Lang AE (1995) Dopa-responsive parkinsonism phenotype of Machado-Joseph disease: Confirmation of 14q CAG expansion. *Ann Neurol* 38: 684-687.
- Uchihara T, Fujigasaki H, Koyano S, Nakamura A, Yagishita S and Iwabuchi K (2001) Non-expanded polyglutamine proteins in intranuclear inclusions of hereditary ataxias—triple-labeling immunofluorescence study. *Acta Neuropathol* 102: 149-152.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szegedy CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J and Ponten F (2015) Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347: 1260419.
- Ullén A, Farnebo M, Thyrell L, Mahmoudi S, Kharaziha P, Lennartsson L, Grandér D, Panaretakis T and Nilsson S (2010) Sorafenib induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells in vitro. *Int J Oncol* 37: 15-20.
- Vale J, Bugalho P, Silveira I, Sequeiros J, Guimaraes J and Coutinho P (2010) Autosomal dominant cerebellar ataxia: frequency analysis and clinical characterization of 45 families from Portugal. *Eur J Neurol* 17: 124-128.

- van de Peer Y, Tavernier J and Callewaert N (2014) Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations. *Nat Commun* 5: 4767.
- van de Warrenburg BP, Sinke RJ, Verschuuren-Bemelmans CC, Scheffer H, Brunt ER, Ippel PF, Maat-Kievit JA, Dooijes D, Notermans NC, Lindhout D, Knoers NV and Kremer HP (2002) Spinocerebellar ataxias in the Netherlands: prevalence and age at onset variance analysis. *Neurology* 58: 702-708.
- van der Velden AW and Thomas AA (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 87-106.
- van Schaik I, Jöbssis G, Vermeulen M, Keizers H, Bolhuis P, de Visser M (1997) Machado-Joseph disease presenting as severe asymmetric proximal neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63: 534-536.
- Voßfeldt H, Butzlaff M, Prüßing K, Ní Chárthaigh RA, Karsten P, Lankes A, Hamm S, Simons M, Adryan B, Schulz JB and Voigt A (2012) Large-scale screen for modifiers of ataxin-3-derived polyglutamine-induced toxicity in *Drosophila*. *PLoS ONE* 7, e47452. doi: 10.1371/journal.pone.0047452.
- Wang G, Ide K, Nukina N, Goto J, Ichikawa Y, Uchida K, Sakamoto T and Kanazawa I (1997) Machado-Joseph disease gene product identified in lymphocytes and brain. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 476-479.
- Wang H, Parry S, Macones G, Sammel MD, Ferrand PE, Kuivaniemi H, Tromp G, Halder I, Shriver MD, Romero R and Strauss JF (2004) Functionally significant SNP MMP8 promoter haplotypes and preterm premature rupture of membranes (PPROM). *Hum Mol Genet* 13: 2659-2669.
- Wang H, Jia N, Fei E, Wang Z, Liu C, Zhang T, Fan J, Wu M, Chen L, Nukina N, Zhou J and Wang G (2007) p45, an ATPase subunit of the 19S proteasome, targets the polyglutamine disease protein ataxin-3 to the proteasome. *J Neurochem* 101: 1651-1661.
- Wang H, Ying Z and Wang G (2012) Ataxin-3 regulates aggresome formation of copper-zinc superoxide dismutase (SOD1) by editing K63-linked polyubiquitin chains. *J Biol Chem* 287: 28576-28585.
- Wang HL, Hu SH, Chou AH, Wang SS, Weng YH and Yeh TH (2013) H1152 promotes the degradation of polyglutamine-expanded ataxin-3 or ataxin-7 independently of its ROCK-inhibiting effect and ameliorates mutant ataxin-3-induced neurodegeneration in the SCA3 transgenic mouse. *Neuropharmacology* 70: 1-11.
- Wang LC, Chen KY, Pan H, Wu CC, Chen PH, Liao YT, Li C, Huang ML and Hsiao KM (2011) Muscleblind participates in RNA toxicity of expanded CAG and CUG repeats in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 68, 1255-1267.
- Wang ND, Finegold MJ, Bradley A, Ou CN, Abdelsayed SV, Wilde MD, Taylor LR, Wilson DR and Darlington GJ (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* 269: 1108-1112.
- Wang YG, Du J, Wang JL, Chen J, Chen C, Luo YY, Xiao ZQ, Jiang H, Yan XX, Xia K, Pan Q, Tang BS and Shen L (2009) Six cases of SCA3/MJD patients that mimic hereditary spastic paraplegia in clinic. *J Neurol Sci*

- 285: 121-124.
- Wang Z (2015) Identification of compounds regulating the translocation of Ataxin-3 in SCA3. Wissenschaftliche Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- Wang Z (2018a) Experimental and clinical strategies for treating Spinocerebellar ataxia type 3. *Neuroscience* 371: 138-154.
- Wang ZJ, Hanet A, Weishäupl D, Martins IM, Sowa AS, Riess O and Schmidt T (2018b) Divalproex sodium modulates nuclear localization of ataxin-3 and prevents cellular toxicity caused by expanded ataxin-3. *CNS Neurosci Ther* 24: 404-411.
- Wang Z, He F, Abeditashi M and Schmidt T (2019) Divalproex sodium regulates ataxin-3 translocation likely by an importin  $\alpha$ 1-dependent pathway. *NeuroReport* 30: 760-764.
- Wanner MP (2021) Erzeugung eines Modells zur Quantifizierung der Promotoraktivität des KPNA3-Promotors. Medizinische Dissertationsschrift, Universität Tübingen.
- Warrick JM, Chan HYE, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL and Bonini NM (1999) Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in drosophila by the molecular chaperone HSP70. *Nature Genet* 23: 425-428.
- Warrick JM, Morabito LM, Bilen J, Gordesky-Gold B, Faust LZ, Paulson HL and Bonini NM (2005) Ataxin-3 suppresses polyglutamine neurodegeneration in Drosophila by a ubiquitin-associated mechanism. *Mol Cell* 18: 37-48.
- Watchon M, Yuan KC, Mackovski N, Svahn AJ, Cole NJ, Goldsbury C, Rinkwitz S, Becker TS, Nicholson GA and Laird AS (2017) Calpain inhibition is protective in Machado-Joseph disease zebrafish due to induction of autophagy. *J Neurosci* 37: 7782-7794.
- Watchon M, Robinson KJ, Luu L, Yuan KC, Lee A, Cheng F, Don EK, Nicholson GA and Laird AS (2021) Treatment with sodium butyrate has therapeutic benefits for Machado-Joseph disease through the induction of autophagy. *bioRxiv*.
- Weber JJ, Sowa AS, Binder T and Hübener J (2014) From pathways to targets: Understanding the mechanisms behind polyglutamine disease. *BioMed Res Int* vol. 2014: Article ID 701758. doi: 10.1155/2014/701758.
- Weber JJ, Golla M, Guaitoli G, Wanichawan P, Hayer SN, Hauser S, Krahl AC, Nagel M, Samer S, Aronica E, Carlson CR, Schöls L, Riess O, Gloeckner CJ, Nguyen HP and Hübener-Schmid J (2017) A combinatorial approach to identify calpain cleavage sites in the Machado-Joseph disease protein ataxin-3. *Brain* 140: 1280-1299.
- Wei J and Hemmings GP (2005) The KPNA3 gene may be a susceptibility candidate for schizophrenia. *Neurosci Res* 52: 342-346.
- Weishäupl D, Schneider J, Peixoto Pinheiro B, Ruess C, Dold SM, von Zweydorf F, Gloeckner CJ, Schmidt J, Riess O and Schmidt T (2019) Physiological and pathophysiological characteristics of ataxin-3 isoforms. *J Biol Chem* 294: 644-661.
- Wellington CL, Ellerby LM, Hackam AS, Margolis RL, Trifiro MA, Singaraja R, McCutcheon K, Salvesen GS, Propp SS, Bromm M, Rowland KJ, Zhang T, Rasper D, Roy S, Thornberry N, Pinsky L, Kakizuka A, Ross CA,

- Nicholson DW, Bredesen DE and Hayden MR (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* 273: 9158-9167.
- Whaley NR, Fujioka S and Wszolek ZK (2011) Autosomal dominant cerebellar ataxia type I: A review of the phenotypic and genotypic characteristics. *Orphanet J Rare Dis* 6: 33. doi: 10.1186/1750-1172-6-33.
- Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM and Lynch M (2008) Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7: 3129-3140.
- Williams AJ, Knutson TM, Colomer Gould VF and Paulson HL (2009) In vivo suppression of polyglutamine neurotoxicity by C-terminus of Hsp70-interacting protein (CHIP) supports an aggregation model of pathogenesis. *Neurobiol Dis* 33: 342-353.
- Winborn BJ, Travis SM, Todi SV, Scaglione KM, Xu P, Williams AJ, Cohen RE, Peng J and Paulson HL (2008) The deubiquitinating enzyme ataxin-3, a polyglutamine disease protein, edits Lys63 linkages in mixed linkage ubiquitin chains. *J Biol Chem* 283: 26436-26443.
- Wood KV, de Wet JR, Dewji N and DeLuca M (1984) Synthesis of active firefly luciferase by in vitro translation of RNA obtained from adult lanterns. *Biochem Biophys Res Comm* 124: 592-596.
- Wood JD, Nucifora FC Jr, Duan K, Zhang C, Wang J, Kim Y, Schilling G, Sacchi N, Liu JM and Ross CA (2000) Atrophin-1, the dentato-rubral and pallido-luysian atrophy gene product, interacts with ETO/MTG8 in the nuclear matrix and represses transcription. *J Cell Biol* 150: 939-948.
- Wu C, Chen DB, Feng L, Zhou XX, Zhang JW, You HJ, Liang XL, Pei Z and Li XH (2017) Oculomotor deficits in spinocerebellar ataxia type 3: Potential biomarkers of preclinical detection and disease progression. *CNS Neurosci Ther* 23: 321-328.
- Wu ZP, Gao CW, Wu YG, Zhu QS, Yan Chen, Xin Liu and Chuen Liu (2009) Inhibitive effect of artemether on tumor growth and angiogenesis in the rat C6 orthotopic brain gliomas model. *Integr Cancer Ther* 8: 88-92.
- Xu YZ, Kanagaratham C, Jancik S and Radzioch D (2013) Promoter deletion analysis using a dual-luciferase reporter system. *Methods Mol Biol* 977: 79-93.
- Yamada M, Sato T, Tsuji S and Takahashi H (2008) CAG repeat disorder models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol* 115: 71-86.
- Yi J, Zhang L, Tang B, Han W, Zhou Y, Chen Z, Jia D and Jiang H (2013) Sodium valproate alleviates neurodegeneration in SCA3/MJD via suppressing apoptosis and rescuing the hypoacetylation levels of histone H3 and H4. *PLoS ONE* 8: e54792. doi: 10.1371/journal.pone.0054792.
- Young RL and Korsmeyer SJ (1993) A negative regulatory element in the bcl-2 5'-untranslated region inhibits expression from an upstream promoter. *Mol Cell Biol* 13: 3686-3697.
- Zhang H, Ju G, Wei J, Hu Y, Liu L, Xu Q, Chen Y, Sun Z, Liu S, Yu Y, Guo Y and Shen Y (2006) A combined effect of the KPNA3 and KPNB3

- genes on susceptibility to schizophrenia. *Neurosci Lett* 402: 173-175.
- Zhao Y, Tan EK, Law HY, Yoon CS, Wong MC and Ng I (2002) Prevalence and ethnic differences of autosomal-dominant cerebellar ataxia in Singapore. *Clin Genet* 62: 478-481.
- Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA and Rudensky AY (2007) Genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445: 936-940.
- Zhong X and Pittman RN (2006) Ataxin-3 binds VCP/p97 and regulates retrotranslocation of ERAD substrates. *Hum Mol Genet* 15: 2409-2420.
- Zhu Z, Liu J, Li K, Zheng J and Xiong Z (2018) KPNB1 inhibition disrupts proteostasis and triggers unfolded protein response-mediated apoptosis in glioblastoma cells. *Oncogene* 37: 2936–2952.
- Zhuchenko O, Bailey J, Bonnen P, Ashizawa T, Stockton DW, Amos C, Dobyns WB, Subramony SH, Zoghbi HY and Lee CC (1997) Autosomal dominant cerebellar ataxia (SCA6) associated with small polyglutamine expansions in the alpha 1A-voltage-dependent calcium channel. *Nat Genet* 15: 62-69.
- Zijlstra MP, Rujano MA, Van Waarde MA, Vis E, Brunt ER and Kampinga HH (2010) Levels of DNAJB family members (HSP40) correlate with disease onset in patients with spinocerebellar ataxia type 3. *Eur J Neurosci* 32: 760-770.

## **8. Erklärung zum Eigenanteil**

Die hier vorliegende Arbeit wurde am Institut für Medizinische Genetik und Angewandte Genomik der Universität Tübingen unter der Leitung von Prof. Dr. Olaf Rieß durchgeführt. Herr Dr. Thorsten Schmidt hat die Studie konzipiert, die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

Hiermit bestätige ich, dass es sich bei der eingereichten Dissertation um meine eigenständig erbrachte Leistung handelt. Sämtliche Versuche wurden eigenständig durchgeführt, wobei die getesteten Wirkstoffe zum Teil von Dr. Zijian Wang übernommen wurden. Einige der verwendeten Konstrukte wurden von Dr. Laura Dengler und Dr. Manuel Wanner bereitgestellt, und wurden in dieser Arbeit an passender Stelle kenntlich gemacht.

Für einige statistische Fragestellungen wurde die methodische Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie der Universität Tübingen in Anspruch genommen. Für die Unterstützung möchte ich mich bei Frau Lina María Serna Higueta recht herzlich bedanken.

Diese Arbeit ist nur mit den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt worden. Übernommene Inhalte aus anderen Werken habe ich als solche kenntlich gemacht. Für die Verwendung von Abb. 2 (s. 1.5.3, S. 14) liegt eine Lizenz von *John Wiley and Sons* vor, die unter folgendem Link einsehbar ist: <https://s100.copyright.com/CustomAdmin/PLF.jsp?ref=b8727210-a717-4770-897f-c1a25288794b>.

Ich kenne die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und habe mich dementsprechend verhalten.

Tübingen, den

Carolina Schröder

## **Danksagung**

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Olaf Rieß bin ich für die Möglichkeit, an seinem Institut zu promovieren, und für die herzliche Aufnahme und Großzügigkeit, die mir entgegen gebracht wurde, zu großem Dank verpflichtet. Meinem Betreuer Dr. rer. nat. Thorsten Schmidt gebührt mein großer Dank für die Überlassung und die Konzeption dieser Arbeit und der stetigen Anregung und Unterstützung. Ebenso möchte ich mich für die Durchsicht meiner Arbeit und den vielen Hinweisen bedanken, die für die Vollendung meiner Arbeit unabdingbar waren.

Ich möchte mich von Herzen bei der SCA3-Arbeitsgruppe mit Dr. Manuel Wanner, Dr. Jonasz Weber, Daniel Weishäupl, Priscila Sena, Mahkameh Abeditashi, Eva Haas, Dr. Jana Schmidt und Dr. Jeannette Hübener-Schmid bedanken, durch deren Ratschläge und Diskussionsbereitschaft mein Projekt bereichert wurde, und durch deren Anwesenheit im Labor ich jederzeit Ansprechpartner hatte, die mir hilfsbereit zur Seite standen. Auch möchte ich Ilnaz Sepahi, Dr. Zinah Wassouf, Dr. Libo Yu-Träger, Elisabeth Singer, Dr. Arianna Novati, Dr. Yogesh Singh, Dr. Rebecca Buchert-Lo und Dr. Nicolas Casadei danken, durch die ich viele weitere wissenschaftliche Impulse und Eindrücke gewinnen durfte. Besonders möchte ich den Studenten Galina Henz, Maria Kalimeri, Patrik Pelz und Cansu Önder danken, mit denen ich durch die gegenseitige Motivation und Freundschaft viele gemeinsame und unvergessliche Momente im Labor teilen durfte.

Meinen Nonni Licia und Bernhard, meinen Großeltern Sigrid und Karl-Eugen sowie meiner besten Freundin Yasmin Abele und meinen drei Schwestern Sophie, Beatrice und Friederike möchte ich für ihre Liebe, Fürsorge und Unterstützung danken, durch die ich immer aufgefangen werde und nie alleine bin. Zu guter Letzt möchte ich besonders meiner Mutter Alexandra und meinem Vater Stephen von Herzen und in großer Verbundenheit danken. Diese Arbeit ist ihnen gewidmet, denn ohne ihre Unterstützung, ihren Rückhalt, ihr Vorbild und ihre Liebe wäre ich nicht, wo ich jetzt bin. Durch sie habe ich gelernt, dass die Liebe alles Wesentliche formt.