

Aus der Abteilung Humangenetik
(Prof. Dr. med. W. Engel)
im Zentrum Hygiene und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Molekulare Charakterisierung von *ZFYVE27*
und Identifizierung von Deletionen in *SPG4***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Philip Lars Krawen
aus Bremerhaven

Göttingen 2009

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. J. Neesen

II. Berichterstatter/in: PD Dr. med. Schmidt

III. Berichterstatter/in: PD Dr. med, Dr. rer. nat. Crozier

Tag der mündlichen Prüfung: 05.05.2010

1.	Einleitung	3
1.1	Die hereditären spastischen Paraplegien	3
1.2	Klinisches Bild	4
1.3	Genetik der HSP	4
1.4	<i>ZFYVE27</i>	7
1.5	Ziele dieser Arbeit	7
2.	Material und Methoden	8
2.1	Material	8
2.1.1	Bakterienstämme	8
2.1.2	Oligonukleotide	8
2.1.2.1	<i>ZFYVE27</i> -Primer	8
2.1.2.2	<i>SPG4</i> -Primer	10
2.1.3	Antikörper	11
2.1.4	Vektoren	11
2.1.5	Chemikalien	11
2.1.6	Gebrauchswaren	13
2.1.7	Geräte	14
2.1.8	Gebrauchsfertige Reaktionssysteme	14
2.1.9	Puffer und Lösungen	15
2.1.10	Kulturmedien	16
2.1.11	Sterilisation	17
2.1.12	Datenbanken	17
2.1.13	Patientenproben	17

2.2	Methoden	18
2.2.1	Lagerung und Vermehrung von <i>E. coli</i>	18
2.2.2	Konzentrationsbestimmung	18
2.2.2.1	Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA mit dem FL-800 Mikroplate Fluoreszenz Reader	18
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA mit dem Eppendorf BioPhotometer	19
2.2.3	Nukleinsäurepräparation	19
2.2.3.1	Isolierung von RNA aus Blut mit dem PAXGene Blood RNA Kit	19
2.2.3.2	Isolierung von RNA aus EDTA-Blutproben nach abgeändertem Protokoll des Purescript Kits von Gentra	20
2.2.3.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im analytischen Maßstab (Methode nach Birnboim und Doly 1979)	20
2.2.3.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> im präparativen Maßstab	21
2.2.3.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	22
2.2.3.6	Aufreinigung von PCR-Produkten über Millipore-Säulen	23
2.2.3.7	Ethanol-fällung	23
2.2.4	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	23
2.2.4.1	Restriktionsenzymatische Spaltung	23
2.2.4.2	Ligation von DNA-Fragmenten	24
2.2.5	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	24
2.2.6	Methoden der Polymerase-Kettenreaktion	25
2.2.6.1	PCR an Plasmid-DNA	25
2.2.6.2	PCR an genomischer DNA	26
2.2.6.3	RT-PCR	26
2.2.6.4	„Nested“-PCR	27
2.2.6.5	„Long Range“-PCR	28
2.2.6.6	Sequenzanalyse	28
2.2.7	Standard-Agarosegelelektrophorese	29
2.2.8	Zellkulturtechniken	30

2.2.8.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	30
2.2.8.2	Transfektion von HeLa-Zellen	30
2.2.8.3	Analyse von Fusionsproteinen	31
2.2.8.4	Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen	32
2.2.9	Southernblot	32
2.2.10	Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	32
2.2.11	Deletionsdetektion mittels quantitativer Real-Time-PCR	33
3.	Ergebnisse	38
3.1	Sequenzierung von <i>ZFYVE27</i>	38
3.1.1	Identifizierung der Exon/Intron-Grenzen und Amplifikation der Exons	38
3.1.2	Sequenzveränderungen im <i>ZFYVE27</i> -Gen	39
3.2	Expression des <i>ZFYVE27</i>-Gens	41
3.2.1	Analyse der Expression des <i>ZFYVE27</i> -Gens auf RNA-Ebene beim Menschen	42
3.2.2	Klonierung der menschlichen <i>ZFYVE27</i> -cDNA	44
3.2.3	Analyse der Expression des <i>Zfyve27</i> -Gens auf RNA-Ebene bei der Maus	45
3.3	Co-Immunlokalisation	49
3.3.1	Immunfluoreszenz-Analyse von <i>ZFYVE27</i> in HeLa-Zellen	49
3.3.2	Generierung von <i>ZFYVE27</i> -cDNA(c.572G>T)	53
3.3.3	Immunfluoreszenz-Analyse von <i>ZFYVE27</i> (p.G191V) in HeLa-Zellen	54
3.4	Deletionssuche im <i>SPG4</i>-Gen mit Hilfe der Real-Time-PCR	56
3.4.1	Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchung	56
3.4.2	“Long-Range“-PCR	59
3.4.3	RT-PCR	60
3.4.4	Southernblot	61

4.	Diskussion	63
4.1	Problemstellung	63
4.2	<i>ZFYVE27</i>	64
4.2.1	FYVE-Finger-Proteinfamilie	64
4.2.1.1	EEA1	67
4.2.1.2	PIKfyve / Fab1p	68
4.2.1.3	Hrs/Vps27p	68
4.2.1.4	Frabin, Fgd1-3 / YOTB	69
4.2.1.5	SARA / Endofin	69
4.2.2	Eigenschaften von <i>ZFYVE27</i>	70
4.2.2.1	Expression in <i>Homo sapiens</i> und <i>Mus musculus</i>	70
4.2.2.2	Intrazelluläre Lokalisation	71
4.2.2.3	Struktureller Aufbau und Funktion	72
4.2.3	Mutationsanalyse von AD-HSP-Patienten	74
4.3	Deletionen in <i>SPG4</i>	79
5.	Zusammenfassung	82
6.	Literaturverzeichnis	83
7.	Anhang	91
7.1	cDNA, kodierende Sequenz und Aminosäuresequenz der menschlichen <i>ZFYVE27</i>-Spleißvarianten	91
7.1.1	Transcript Variante 1	91
7.1.2	Transcript Variante 2	93
7.1.3	Transcript Variante 3	95
7.1.4	Transcript Variante 4	97
7.2	cDNA, kodierende Sequenz und Aminosäuresequenz von <i>Zfyve27</i>	99
7.3	Ergebnisse der Real-Time-PCR-Messungen	102

Abkürzungen

A	Ampere
Abb	Abbildung
AD	autosomal-dominant
AR	autosomal-rezessiv
BLAST	engl.: basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
DEPC	Diethylenpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	et alii
EtOH	Ethanol
g	Gramm
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHSP	komplizierte hereditäre spastische Paraplegie
l	Liter
µmol	Mikromol
m	Meter, Milli (10^{-3})
M	Molar
µ	Mikro (10^{-6})
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid
NCBI	engl.: National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PHSP	reine hereditäre spastische Paraplegie
PI3P	Phosphoinositol-3-Phosphat
PI5P	Phosphoinositol-5-Phosphat

Abkürzungen

RNA	Ribonukleinsäure
T	Temperatur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	Untranslatierte Region
V	Volt
Vol	Volumen
XC	X-chromosomal

1. Einleitung

1.1 Die hereditären spastischen Paraplegien

Die hereditären spastischen Paraplegien (HSP) sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe erblicher neurodegenerativer Erkrankungen, welche durch eine progrediente spastische Paraparese und Hyperreflexie der unteren Extremitäten gekennzeichnet sind (Behan und Maia 1974). Die ersten Beschreibungen der Erkrankung wurden 1880 und 1893 vom Neurologen Adolf von Strümpell verfasst (Reid 1997), welcher in zwei Familien jeweils mehrere Mitglieder mit progredienter spastischer Paraparese und gesteigerten Muskeleigenreflexen ohne weitere neurologische Symptome gefunden hatte. Im Jahre 1898 stellte Lorrain in seiner Doktorarbeit drei weitere Fälle mit Symptomen der HSP dar, wobei hierbei zum ersten Mal ein Patient mit einer komplizierten Form beschrieben wurde (Bruyn und Scheltens 1991). Die Strümpell-Lorrainsche Erkrankung gilt heute als Synonym für die hereditäre spastische Paraplegie. Aufgrund der vielfältigen Symptome und der teilweise uneinheitlichen diagnostischen Kriterien schwankt die Prävalenz epidemiologischer Studien zu dem Thema zwischen 14/100000 (Skre 1974) und 0,9/100000 (Werdelin 1986) Einwohnern. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen und können in jedem Alter erkranken, wobei jedoch zwei Häufigkeitsgipfel auszumachen sind: Der erste findet sich vor dem sechsten Lebensjahr, der zweite zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahrzehnt. Auf pathologischer Ebene findet sich bei HSP-Erkrankten eine Degeneration der Pyramidenbahnen und der Hinterstränge. Besonders die langen Axone zeigen eine von kaudal aufsteigende Schädigung, während die neuronalen Zellkörper länger erhalten bleiben können (Fink et al. 1996). Da bisher noch keine kausale Therapie existiert, können HSP-Patienten momentan nur symptomatisch mit Physiotherapie und medikamentöser Einstellung der Spastik behandelt werden. Zusätzlich ist eine Versorgung der Patienten mit Hilfsmitteln wichtig, damit sie im Alltag besser zurechtkommen.

1.2 Klinisches Bild

Klinisch werden innerhalb der Gruppe der hereditären spastischen Paraplegien eine unkomplizierte, reine Form und eine komplizierte Form unterschieden. Bei der unkomplizierten Form kommt es typischerweise an den Beinen zu gesteigerten Muskeleigenreflexen und einer spastischen Tonuserhöhung. Diese tritt vor allem bei Flexion der Hüft-, Knie- und Sprunggelenke auf. Weiterhin finden sich an den Beinen häufig positive Pyramidenbahnzeichen, und es kann zu Muskelschwächen und Paresen kommen. Hierbei sind der M. iliopsoas und der M. tibialis am häufigsten betroffen. Die Störungen führen in vielen Fällen zu einem zirkumduzierenden Gangbild und können bis zur kompletten Immobilisierung fortschreiten. Neben den motorischen Auffälligkeiten kann es bei der reinen Form auch zu einer Störung der Pallästhesie und zu einer Urge-Inkontinenz kommen. Die komplizierte Form kann mit zusätzlichen neurologischen Symptomen wie Demenz, Epilepsie, Ataxie, Sehschwäche, Taubheit, Ichthyosis und mentaler Retardierung einhergehen.

1.3 Genetik der HSP

Nach genetischen Gesichtspunkten kann die HSP in autosomal-dominante, autosomal-rezessive und X-chromosomale Formen eingeteilt werden. Der größte Anteil mit 70 bis 80 Prozent der Erkrankungen wird autosomal-dominant vererbt, in 20 Prozent der Fälle liegt ein autosomal-rezessiver Erbgang vor, und in einzelnen Fällen ist eine X-chromosomale Vererbung gegeben. Über Kopplungsanalysen konnten bereits 41 Genloci, die mit der Entstehung der HSP assoziiert sind, identifiziert werden (Salinas et al. 2008). Die meisten der entsprechenden Genprodukte sind aber noch unbekannt. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die HSP-Loci.

	Locus	Vererbung	Genprodukt	Phänotyp
SPG1	Xq28	XC	L1-Cam	KHSP, Hydrozephalus
SPG2	Xq22	XC	PLP1	PHSP, KHSP
SPG3A	14q11-q21	AD	Atlastin	PHSP
SPG4	2p21-22	AD	Spastin	PHSP, KHSP
SPG5	8p12-q13	AR	CYP7B1	PHSP
SPG6	15q11.1	AD	NIPA1	PHSP
SPG7	16q24.3	AR	Paraplegin	PHSP, KHSP
SPG8	8q23-24	AD	Strumpellin	PHSP
SPG9	10q23.3-24.1	AD	-	KHSP
SPG10	12q13	AD	KIF5A	PHSP
SPG11	15q13-15	AR	Spatacsin	PHSP, KHSP
SPG12	19q13	AD	-	PHSP
SPG13	2q33.1	AD	HSP60	PHSP
SPG14	3q27-28	AR	-	KHSP
SPG15	14q22-24	AD	Spastizin	KHSP, Kjellin-Syndrom
SPG16	Xq11.2	XC	-	PHSP, KHSP
SPG17	11q12-14	AD	BSCL2	KHSP, Silver-Syndrom
SPG19	9q33-34	AD	-	PHSP
SPG20	13q22.31	AR	Spartin	KHSP, Troyer-Syndrom
SPG21	15q22.31	AR	Maspardin	KHSP
SPG23	1q24-32	AR	-	KHSP
SPG24	13q14	AR	-	PHSP
SPG25	6q23.3-24.1	AR	-	PHSP
SPG26	12p11.1-q14	AR	-	KHSP
SPG27	10q22.1-q24.1	AR	-	KHSP
SPG28	14q21.3-q22.3	AR	-	PHSP
SPG29	1p31-p21	AD	-	KHSP
SPG30	2q37	AR	-	PHSP
SPG31	2p12	AD	REEP1	PHSP
SPG32	14q12-q21	AR	-	KHSP
SPG35	16q21-q23	AR	-	KHSP
SPG36	12q23-q24	AD	-	-
SPG37	8p21.1-q13.3	AD	-	-
SPG38	4p16-p15	AD	-	KHSP, Silver-Syndrom
SPG39	19p13	AR	NTE	KHSP

Tabelle 1: bekannte Genloci der HSP

AD: autosomal-dominant

PHSP: Pure HSP

AR: autosomal-rezessiv

KHSP: komplizierte HSP

XC: X-chromosomal

1999 konnten Hazan et al. das dem *SPG4*-Locus entsprechende Gen identifizieren und Mutationen in diesem Gen bei Patienten mit autosomal-dominantem Erbgang der Erkrankung nachweisen. Seitdem wurden über 100 verschiedene Mutationen im *SPG4*-Gen gefunden, wobei diese Mutationen für ca. 40 Prozent der AD-HSP-Fälle verantwortlich sind.

SPG4 besteht aus 17 Exons und kodiert für Spastin, welches zur Familie der AAA-Proteine gehört. Die Proteine dieser Gruppe sind an einer Vielzahl von zellulären Funktionen beteiligt, darunter auch an der Bildung von Peroxisomen und an intrazellulären Transportvorgängen. Neben Spastin konnten u. a. die Genprodukte Atlastin (SPG3A), NIPA1 (SPG6), KIF5A (SPG10), HSP60 (SPG13), BSCL2 (SPG17) und REEP1 (SPG31) den für die AD-HSP verantwortlichen Loci zugeordnet werden.

Trotz der in den letzten Jahren bei der Identifizierung verantwortlicher Gene erzielten Fortschritte bleibt die Ursache der HSP-Erkrankung in ungefähr 50% der untersuchten Fälle noch immer ungeklärt. In unserer Arbeitsgruppe wurde mit Hilfe der Yeast-Two-Hybrid-Methode, in der weiteren Arbeit mit Y2H abgekürzt, nach Interaktionspartnern von Spastin gesucht. Es wurden hierbei 5 putative Interaktionspartner identifiziert, welche mit der genomischen Position bekannter Genloci der HSP übereinstimmen. Die gefundenen Gene *Reticulon1*, *Reticulon3*, *CRELD*, *COP55* und *ZFYVE27* könnten durch eine Wechselwirkung die Funktion von Spastin beeinflussen und so an der Entstehung der HSP beteiligt sein (Mannan et al. 2006) Das dem AD-HSP-Locus SPG9 entsprechende *ZFYVE27* sollte aus diesem Grund in dieser Arbeit untersucht werden.

1.4 *ZFYVE27*

Das *ZFYVE27*-Gen liegt an Position 10q24.2 des menschlichen Genoms und damit im Bereich des AD-HSP-Locus SPG9 (10q23.3–q24.2) (Lo Nigro et al. 2000). Es codiert für ein bisher unbekanntes, hypothetisches Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDA. Es besteht aus 13 Exons, die sich über einen genomischen Bereich von ungefähr 27 kb erstrecken. Im C-terminalen Bereich besitzt es eine putative Phosphoinositol-bindende Domäne, welche auch als FYVE-Domäne bezeichnet wird. Diese Bezeichnung setzt sich aus den Anfangsbuchstaben der vier Proteine Fab1p, YOTB, Vps27p und EEA1 zusammen, bei denen diese Domäne zuerst entdeckt wurde. Moleküle, welche diese strukturell einem Zink-Finger entsprechende Domäne enthalten, sind unter anderem an Membrantransportvorgängen und Signaltransduktionsvorgängen beteiligt (Stenmark et al. 2002).

1.5 Ziele dieser Arbeit

- Nachweis der Interaktion zwischen *ZFYVE27* und *SPG4*
- Untersuchungen zur Expression von *ZFYVE27* in humanen und murinen Geweben
- Untersuchung der intrazellulären Verteilung von *ZFYVE27* in HeLa-Zellen
- Analyse des *ZFYVE27*-Gens in HSP-Patienten
- Identifizierung von putativen Deletionen im *SPG4*-Gen mit Hilfe der Real-Time-PCR bei HSP-Patienten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente Zellen vom Stamm *E. coli* K12 DH5 α (Methode nach Hanahan 1985) von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe verwendet. Genotyp: [F⁻, end A1, hsdR 17, (r_k⁻m_k⁻), supE44, thi1, recA1, gyrA (Nal), relA1, Δ (lacZYA-argF)U169, ϕ 80 lacZ Δ M15].

2.1.2 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 100 pmol/ μ l bei -20°C gelagert. Die folgenden Primer wurden durch die Firmen Eurogentec (Köln) und Qiagen (Hilden) synthetisiert:

2.1.2.1 ZFYVE27-Primer

Name	Sequenz 5' – 3'
FL-1-F	GCA GGC GCA CTG CTG GCA AGG GTG CTT G
FL-1-R	GGA GCC CGT GAG GCT GGA CAG GGA AGG CCA T
FL-2-F	GCT CAC AGG TTT ACT GTT GGC ACC ACC TG
FL-2-R	GGA CAG CCC AGC CAC TGC CTA ATG GTC
FL-3-F	GAC CAT CCC TAG CCA ACT GTA CCT GCA AG
FL-3-R	GCT CTT CCC CTG AGG TAA GAG GGG CAG AG
FL-4-F	GAG CGG CTC TTG TCA GTT TAT TAA TGT GC
FL-4-R	CAG CAA ACT GAT GAT TAG CTG TAG AGA C

FL-5-F	GCT CAG AGT TAG GAG GGT GAC TCT TTC
FL-5-R	GGC CTG GGA AAT AGC AGG AAC TAC AAC AGA
FL-6-F	GCC ATT TCG TGG TGT TTT GGG TAG CCT GG
FL-6-R	GGC ACT CTT TCA ACC AGT GAG TTC TAG C
FL-7-F	GGC TGA ACC GGC TGC TGC CAC ACC TCG T
FL-7-R	CCC ACA GTT CTG AGA CTC TGC CCC TGT GG
FL-8/9-F	CTG GCC TTG CTC CCT GGC TCA CTG TGT CC
FL-8/9-R	GGA GGA AAC GTT CCC GTA GGC CTG ACT AC
FL-10-F	CGG GCA GGC TAG CAA GCT GGG CAG GGA G
FL-10-R	CAG CTC CAG AAT CCA GCT GGA GAG AGT
FL-A-F	CCG TCT GTG CTG CCT GGT CTC CCC TCC CCA
FL-A-R	TAG GGT GGG GCT GCA TCC AGG TGT TCT TCC
FL-B-R	GAG GAA CAA GCA GTG GGC GTC TGG GTG GGC
FL-B-R	GCC TAA TAT GAT GTC GAG CAC ACA AAG CTA G
FL-C-F	CTT GGT CTT CCA AAG TGT TAG GAT TAC AAG
FLJ-ORF-F	ATG CAG ACA TCA GAA CGT GAG GGG AGT GGG
FLJ-ORF-R	CTT GCT CAA GGT CTG GTT ACA CGA GGC AC
FL-Nested-F	ACC CTG CCG CCT CCC TCA CGG AGC CAG CGG
FL-Nested-R	ACT TGC TCA AGG TCT GGT TAC ACG AGG CAC
FLJ-RT Ex4-R	AAG AAC TCC ACA TCC CCA GAA AGA GCG TGC
FLJ-RT Ex6-F	CTC ACA CCG GGC AGC GTG GAG GAG GCT GAG
FLJ-RT Ex8-R	GAG AAG GTG GCC GAG CAG CCC GTG CAG TTC
FL-M-RT F1	GAC CGC TCC GGG GCT TGG TGG CCC TTC TGT
FL-M-RT F2	TCG GGA CCT GAG TGG GCC GGA GGC GAG CCC
FL-M-RT F3	GGA TGC AGG GGA CGG TGT TCG ATA CTT GCT
FLJ-M-RT-R1	CCC CGG CAC ACC TCC TGA AGG TTA GCC CAG T
FLJ-M-RT-R2	TTT GCT CAG GGT CTG ATT GCT GGA GGC GCA C
FLJ-M-RT-R3	ACA GGC CTC AGA GGC CCA GAG TTG GGA CAG
FLJ Ex4 MUT F	TCT ATG GGG CTC TTC TGG TCA CAG TCT GCA
SB-Sonde F	TTT ATG AAC AGT GTG AAG TAG AAA CTG AGT
SB-Sonde R	GAA AAT AAT TTG CTG TTT CAG CTG GGT GCG

2.1.2.2 SPG4-Primer

Name	Sequenz 5' – 3'
SPG4- RNA F	GTG GCT CGA GAA CTT CAA CCT TCT
SPG4 RNA F2	CAG TGA GAG CTG TGA ATG AAT TCT CC
SPG4 RNA R2	GCC GAT GAC GTT CAT TGA AGA TCT TG
SPG4_RNA_F3	GTG AAT GAA TTC TCC GGG TGG ACG AGG GA
SPG4_RNA_R3	CCA GTA AAC TAA GGG CAA ATA TCT
SPG4-RNA- F4	CAA GTC ACA AAC GGC AGT CTA TAA TGA CA
SPG4-RNA-R4	AGA AGG TTG AAG TTC TCG AGC CAC
SPG4-RNA-R5	AGT ACT GTC ATT ATA GAC GTC CGT TTG TG
SPG4 Taq Ex1-F	GTC CGA GTC TTC CAC AAA CAG
SPG4 Taq Ex1-R	CCC CCT AGT TAC CTT TCT CAT C
SPG4 EX 2 R1	GTA ACA GAG GAA AGA CCC TGT CTC
SPG4 Taq Ex2-R	GGT AAC AGA GGA AAG ACC CTG TCT CAA
SPG4 EX3 F1	GTA TAA AGA CTG TGA CTC CCC ATG
SPG4 EX3 R1	CAC ACA TT CCA ATA CAT CCC ACA TC
SPG4 Taq Ex4-F II	AGA AGA TGC AAC CAG TTT TGC CAT TTT C
SPG4 Taq Ex4-R	TTA ACC TAA ACC CAC CTG ACT GGA
SPG4 EX 5 F1 N	CAC CCC TAT GAA GAT CCT GGT AC
SPG4 Taq Ex5-R	ATT AAA GTT ACT GTC CCA GAA TAC C
SPG4 Taq Ex8-F II	TTG TTC ACA GGG CTT AGA GCT CCT GCC A
SPG4 Taq Ex8-R II	ACT CAA ATT TGA AGA GAA CCC TTA CCA G
SPG4 Taq Ex9-F	AAA CTC TTG GCC TCA AGT GAT
SPG4 EX 9 R1	CTG ATG TTT AAG CCA GCC AGT TTA CGG
SPG4 EX 10-12 F1	GGG ACG GTT AGT AGT ACT CTC CCC
SPG4 EX 10R	GAT AGT CTT TAA GCT TGC CCT TCT TT
SPG4 EX 13 F1	CAG ATT CAA GAA GAC AGA TCT AC
SPG4 Taq Ex13-R	AAA ATT CAA ACA CAG ATA CAT ACC TCC TCA
SPG4 EX 14 F1	GGG TAA CAG CAC AAG ACC CTG TC
SPG4 EX 14 R1	CGT CTT GCA AAG GAC ATA GCC AGT G
SPG4 Taq Ex15-F	TGC TGT TTC TTC CTT CCC TTC C
SPG4 Taq Ex15-R	TGC AGT GAA CTA TGA TTG TGC C
SPG4 Taq Ex16-F	GCC CTT CAA CAA TTT CAA CTG CAA A
SPG4 Taq Ex16-R	AAA AAA AAA ACC ACA CAC ACA CAC ATT C
SPG4 Taq Ex17-F II	CTA GAT GAG AAA TAT TCG ATT ATC TGA
SPG4 Taq Ex17-R	GTC TGT TTT CTG GTT CAT CTT

2.1.3 Antikörper

Monoklonal anti-EEA1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
Monoklonal anti-E2-tag	Abcam, Cambridge
Polyklonal anti-c-Myc	Dunn Labortechnik GmbH, Asbach

2.1.4 Vektoren

Klonierungen von PCR-Produkten wurden mit dem Plasmid pGem®-Teasy-Kit (Promega GmbH, Mannheim) durchgeführt. Der pGem®-Teasy-Vektor besitzt ein Ampicillinresistenz-Gen und bietet durch das lac-Operon die Möglichkeit einer Blau-Weiß-Selektion auf IPTG/ X-βGal-Medium.

pGem®-Teasy	Promega GmbH, Mannheim
pEGFP-C1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pQM-Ntag/A	Abcam, Cambridge

2.1.5 Chemikalien

Nicht gesondert aufgeführte Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) in p.A.-Qualität bezogen.

[α- ³² P]dCTP	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
1kb DNA ladder	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Agar	Fluka-Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Blocking Reagenz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BSA (Faktor V)	Biomol, Hamburg

Buffer AE Elution Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
Buffer EL Erythrocyte Lysis Buffer	QIAGEN GmbH, Hilden
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DEPC	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
DMEM	Gibco/BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTP	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DPBS	PAN Biotech GmbH
DTT	Biomol GmbH, Hamburg
EDTA	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
FKS	Gibco/BRL, Karlsruhe
Formamid	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Glycerin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
HotStarTaq™	QIAGEN GmbH, Hilden
IPTG	Biomol GmbH, Hamburg
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Methanol	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phenol	Biomol GmbH, Hamburg
Phosphorsäure	Fluka-Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Proteinase K	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim
Rapid-hyb buffer	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Restriktionsendonukleasen	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
RNase A	Gibco/BRL, Karlsruhe
RNase freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden
RNase Inhibitor	QIAGEN GmbH, Hilden
SDS	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege

SYBR Green Mix	Abgene, Hamburg
SYBR Green Mix	QIAGEN GmbH, Hilden
T4-DNA-Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Taq-DNA-Polymerase	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
TRI Reagent®-RNA/DNA/Protein	Molecular Research Center Inc., Cincinnati
Tris	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
X-βGal	Biomol GmbH, Hamburg

2.1.6 Gebrauchswaren

Nicht gesondert aufgeführte Gebrauchswaren stammten von den Firmen Krannich GmbH & Co. KG (Göttingen) und Schütt Labortechnik GmbH (Göttingen).

Blottingpapier GB001-004	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Centrisart I-Zentrifugationsröhrchen	Sartorius AG, Göttingen
Hybond TM -XL-Nitrocellulosemembran	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
MicroSpin TM S-200 H	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Montage®PCR filter devices	Millipore GmbH, Schwalbach
Nunclon® delta Surface	NUNC®, Roskilde
Plastikwaren	Greiner, Solingen und Falcon, Heidelberg
Quarz-Küvette	Hellma, Mühlheim
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilm Hyperfilm TM MP	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

2.1.7 Geräte

Entwicklungsgerät Gevamic110U	Agfa Gevaert, München
Kühlzentrifuge, 5417R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Schütt Labortechnik, Göttingen
Megafuge1.0 R	Heraeus GmbH, Hanau
Mikroskop BX60	Olympus, München
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler Perkin Elmer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Thermocycler Primus	MWG-Biotech, Ebersberg
Transilluminator, UVT-28M	Herolab GmbH, Wiesloch
TurboBlotter™	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Mischer	Bender & Hobein AG, Zürich
Waagen	Sartorius, Göttingen

2.1.8 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Hexalabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Lipofectamin2000™ Transfection Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGEM®-T easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
PAXGene Blood RNA Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAEX® II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAprep® Spin miniprep Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
ROCHE® One Step RT-PCR Kit	Boehringer GmbH, Mannheim
ROCHE® Expand Long Template PCR S.	Boehringer GmbH, Mannheim
Taq DNA Polymerase	Amersham Biociences, Freiburg

2.1.9 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, je nach Bedarf mit deionisiertem Wasser (dH₂O) oder Ampuwa (pyrogenfreies Wasser für molekularbiologisches Arbeiten) hergestellt.

Denaturierungslösung	0,5 M NaOH 1,5 M NaCl DEPC-H ₂ O.
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP.
10 x MOPS-Puffer	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA in DEPC-H ₂ O.
Neutralisationslösung	0.5 M Tris/HCl pH 7,0 1,5 M NaCl.
10 x PBS-Puffer	1,3 M NaCl 70 mM Na ₂ HPO ₄ 30 mM NaH ₂ PO ₄ pH 7,4.
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0.
5 x TBE Puffer	445 mM Tris 445 mM Borsäure pH 8,0

10 mM EDTA.

Upper Tris-Puffer 0,5 M Tris/ HCl, pH 6,4
0,4 % (w/v) SDS.

2.1.10 Kulturmedien

LB-Medium 1 % (w/v) Pepton
0,5 % (w/v) Hefe Extrakt
0,5 % (w/v) NaCl
pH 7,0.
in dH₂O angesetzt und autoklaviert

LB-Platten 1,5 % (w/v) Agar - Agar
in LB-Medium.

Ampicillin-Medium 0,1 mg/ml Ampicillin
in LB-Medium.

Kanamycin-Medium 25 mg/ml Kanamycin
in LB-Medium.

IPTG / X-βGal-Platten 1,5 % (w/v) Agar - Agar
100 μM IPTG
0,4 % (w/v) X-βGal
in Ampicillin-LB-Medium.

Festes LB-Medium enthielt einen Zusatz von 1,5 % (w/v) Agar. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf ca. 60°C konnten den Medien Antibiotika und sonstige Zusätze aus sterilen Stammlösungen in den entsprechenden Konzentrationen zur selektiven Anzucht zugegeben werden.

2.1.11 Sterilisation

Die Sterilisation von Lösungen erfolgte für 20 min bei 10^5 Pa im Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) oder durch Sterilfiltration (Sterilfilter mit Porengröße 0,2-0,45 μm). Gebrauchswaren wurden entweder autoklaviert oder für 8-12 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert.

2.1.12 Datenbanken

Nukleotid- und Proteinsequenzen wurden mit der Sequenzdatenbank Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul et al. 1990) analysiert.

2.1.13 Patientenproben

Die untersuchten 93 DNA-Proben stammten aus einem Kollektiv von Patienten mit Verdacht auf eine autosomal-dominant vererbte spastische Spinalparalyse. Das Institut für Humangenetik Göttingen war mit der molekulargenetischen Untersuchung der DNA-Proben beauftragt worden. Im Rahmen einer differentialdiagnostischen Abklärung der Erkrankung waren zunächst die kodierenden Bereiche der Gene *SPG3* und *SPG4* durch eine Sequenzanalyse untersucht worden. Da hierbei keine Mutation detektiert werden konnte, wurde eine Deletionanalyse im *SPG4*-Gen sowie eine Sequenzanalyse der kodierenden Bereiche des *ZFYVE27*-Gens angeschlossen.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung von genomischer DNA mit dem Eppendorf BioPhotometer

Zur genauen Bestimmung der Konzentration von DNA-Lösungen wurden 2 µl der Probe mit 398 µl destilliertem Wasser verdünnt. Die Probe wurde dann in eine Küvette (Präzisions-Küvette aus Quarzglas SUPRASIL®, 10 mm - Hellma) pipettiert und die Konzentration per Extinktionsmessung mit dem Photometer bei 260 nm bestimmt.

2.2.3 Nukleinsäurepräparation

2.2.3.1 Isolierung von RNA aus Blut mit dem PAXGene Blood RNA Kit

Die Gesamtblutproben wurden für 30 min bei 4000 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, 5 ml DEPC-Wasser hinzugefügt und das Pellet vollständig resuspendiert. Die Probe wurde erneut für 30 min bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand wurde wieder verworfen. Das Pellet wurde in 360 µl Resuspensionpuffer (PAXGene BR1-Puffer) gelöst und die Lösung in ein RNA-Eppendorfcup überführt. 300 µl Bindungspuffer (PAXGene BR2-Puffer) und 40 µl Proteinase K wurden hinzugefügt. Die Probe wurde gründlich vermischt und dann unter ständigem Mischen für 10 min bei 55° C inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 5 min mit 4000 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues RNA-Eppendorfcup überführt. Nach Zugabe von 350 µl Ethanol wurde das Cup kurz zentrifugiert, der Überstand auf eine PAXGene Blood RNA Spin-Säule gegeben und diese für 1 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend in ein neues RNA-Eppendorfcup gesteckt, einmal mit 700 µl Waschpuffer 1 (PAXGene BR3-Puffer) und zweimal mit jeweils 500 µl Waschpuffer 2 (PAXGene BR4-Puffer) gewaschen. Anschließend wurde die Säule in ein Elutions-Gefäß gesteckt und zweimal mit jeweils 40 µl Elutionspuffer (PAXGene BR5-Puffer) gewaschen, um die RNA vom Filter zu lösen.

2.2.3.2 Isolierung von RNA aus EDTA-Blutproben nach abgeändertem Protokoll des Purescript Kits von Gentra

Es wurde 1 ml Blutprobe mit 2 ml Erythrozyten-Lysis-Puffer vermischt und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Sedimentation der verbliebenen Blutzellen durch einminütige Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µl TRI Reagent gelöst. Der Ansatz wurde 5 min lang auf Eis inkubiert und anschließend, nach Zugabe von 100 µl Chloroform, für 15 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues RNA-Eppendorfcup überführt. Es wurden 200 µl Isopropanol hinzugefügt. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 10 min bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und 200 µl 70%-Ethanol hinzugefügt. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 x g wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 20-30 µl DEPC-Wasser gelöst.

EL-Puffer	10 mM KHCO ₃
	150 mM NH ₄ Cl
	0,1 mM EDTA
	pH 8,0.

2.2.3.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* im analytischen Maßstab (Methode nach Birnboim und Doly 1979)

Zur schnellen Präparation geringer Mengen von Plasmid-DNA für Restriktionsanalysen und Sequenzierungen wurden 5 ml mit Antibiotika versetztes LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. Diese Übernachtskultur wurde für 10 min mit 5500 x g bei Raumtemperatur sedimentiert. Das Pellet wurde in 200 µl P1-Puffer resuspendiert und gemischt. Nach Zugabe von 200 µl P2-Lösung wurde der Ansatz vorsichtig geschwenkt und 5 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 200 µl Neutralisationslösung (P3) gestoppt und weitere 5 min bei RT inkubiert. Durch eine 20minütige Zentrifugation bei RT und 15000 x g wurden ausgefallene Proteine und genomische DNA vom plasmidhaltigen Überstand abgetrennt. Zur Fällung der DNA wurden 500 µl kaltes Isopropanol hinzugegeben und 20 min bei

4°C und 15000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 200 µl 70%-Ethanol gewaschen, das Pellet nach dem Trocknen in 20 µl Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

P1-Puffer	100 µg/ml RNase A 50 mM Tris/HCl pH 8,0 10 mM EDTA.
P2-Lösung	200 mM NaOH 1% (w/v) SDS.
P3-Lösung	2,55 M Kaliumacetat, pH 4,8

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

Zur Präparation großer Mengen Plasmid-DNA wurde das „Midi-Kit“ der Firma Qiagen aus Hilden eingesetzt. Die Methode beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Aufreinigung der Plasmid-DNA über eine Anionenaustauscher-Säule. Eine Bakterienkolonie wurde in 200 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden für 20 min bei 5000 x g und 4°C abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml P1-Puffer vollständig resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml P2-Lösung wurden die Zellen lysiert. Das Zell-Lysat wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zugabe von 4 ml P3-Lösung neutralisiert. Anschließend wurde die Probe für 20 min auf Eis inkubiert und dann für 20 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wurde durch einen Filter auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte Anionenaustauscher-Säule geladen und diese 2-mal mit 10 ml QC-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde mit 5 ml QF-Puffer eluiert, durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol gefällt und für 20 min bei 10000 x g und 4°C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen und erneut bei 10000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 200 µl Wasser aufgenommen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

QBT-Puffer	750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % (v/v) Ethanol 0,15 % (v/v) Triton X-100.
QC-Puffer	50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Ethanol.
QF-Puffer	1.25 M NaCl 50 mM MOPS, pH 8,2 15 % (v/v) Ethanol.

2.2.3.5 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (2.2.7, S. 29) für Klonierungsexperimente erfolgte mit dem QIAEX® II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Die DNA wurde aus dem Agarosegel gelöst und an eine Silikatsuspension adsorbiert. Durch Absenken der Salzkonzentration wurde die DNA wieder eluiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA im Agarosegel wurde das zu isolierende DNA-Fragment mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Pro 100 mg wurden 300 µl QX1-Puffer eingesetzt. Zur Auflösung der Agarose und Bindung der DNA an die Silikatpartikel wurde der Ansatz für 10 min bei 50°C geschüttelt. Die Partikel mit der anhaftenden DNA wurden bei 10000 x g für 30 Sekunden abzentrifugiert und das Pellet in 500 µl QX1-Puffer resuspendiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl ethanolhaltigem PE-Puffer. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet, in 20 µl Wasser aufgenommen und die DNA für 5 min bei RT eluiert. Der Ansatz wurde bei 10000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert und der Überstand mit der DNA in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.2.3.6 Aufreinigung von PCR-Produkten über Millipore-Säulen

Um PCR-Produkte von Salzen, Enzymen oder anderen Verunreinigungen zu befreien, wurden diese über eine Millipore-Säule aufgereinigt. Hierzu wurde der Ansatz mit der DNA auf die Membran der Säule gegeben und das Volumen mit dH₂O auf 500 µl aufgefüllt. Die Säule wurde für 30 Sekunden bei 10000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde sie gewendet und die DNA in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge dH₂O eluiert.

2.2.3.7 Ethanolfällung

Durch die Ethanolfällung kann die DNA von Kontaminationen mit Proteinen, Salzen und freien Nukleotiden befreit werden. Die Präzipitation von DNA in wässriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol 3 M Natriumacetat (pH 4,5) und 2,5 Vol reinem Ethanol und einer anschließenden Inkubation bei -80°C für 20 min oder bei -20°C für 2 Stunden. Das Gemisch wurde dann für 10 min bei 12000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 2,5 Vol 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in einer dem Ausgangsvolumen entsprechenden Menge dH₂O gelöst.

2.2.4 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.4.1 Restriktionsenzymatische Spaltung

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an sequenzspezifischen Stellen spalten können. Für eine Restriktion wurden 2-5 U pro µg DNA eingesetzt, wobei das Enzymvolumen 10 % des Gesamtvolumens nicht überschreiten sollte. Restriktionen von genomischer DNA erfolgten über Nacht, die von Plasmid-DNA für 2 Stunden bei der für die Reaktion optimalen Temperatur. Die Restriktion wurde anschließend auf einem Agarosegel (2.2.7, S. 29) überprüft.

2.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Um PCR-Produkte in einen Vektor zu integrieren, wurde das pGem®-Teasy-Vektorsystem verwendet. Der artifizielle 3'-Thymidinüberhang dieses Vektors ist komplementär zum 3'-Desoxyadenosin, das den PCR-Produkten durch die meisten Polymerasen angehängt wird. Dazu wurden in einem 10 µl Reaktionsansatz 50 ng des linearen Vektors mit dem Insert in 3-5 fachem molarem Überschuss, 5 U T4-DNA-Ligase und 1 µl des 10 x Ligationspuffers gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.5 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren mit [α -³²P] wurde nach dem Protokoll des Hexalabel™ DNA Labeling Kit durchgeführt. Das Verfahren beruht auf dem Prinzip des „random priming“ nach Feinberg und Vogelstein. Hierbei dienen Hexanukleotide einer Polymerase als Primer. Nach der Denaturierung der Nukleinsäuresonde binden die Hexanukleotide an der Nukleinsäure und bilden somit den Ausgangspunkt für die Nukleinsäuresynthese. Es wurden etwa 20-50 ng DNA und 10 µl Hexanukleotidgemisch in 5 x Puffer mit dH₂O auf ein Volumen von 40 µl gebracht. Anschließend wurde die DNA für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Hinzu kamen 3 µl Mix C (dNTPs ohne dCTP), 4 µl [α -³²P] dCTP und 1 µl Klenow-Fragment. Der Ansatz wurde nun für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl dNTP-Mix wurde die Synthese für weitere 5 min fortgesetzt. Um die Reaktion zu beenden, wurden dem Ansatz 150 µl dH₂O zugefügt. Das gesamte Reaktionsvolumen wurde auf eine vorbereitete MicroSpin™-Aufreinigungssäule aufgetragen und für 2 min bei 800 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde 10 min bei 95°C denaturiert, 3 min auf Eis abgekühlt und konnte anschließend direkt für eine Hybridisierung (2.2.10, S. 32) verwendet werden.

2.2.6 Methoden der Polymerase-Kettenreaktion

Die PCR (Methode nach Saiki 1985) dient der Amplifikation kleinster Mengen genetischen Materials *in vitro*. Nach der Denaturierung der DNA binden sequenzspezifische synthetische Primer, an denen die hitzestabile Taq-Polymerase des Archaeobakteriums *Thermus aquaticus* einen komplementären Strang bilden kann. Bei jedem Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung erfolgt eine Verdopplung der durch die Primer eingegrenzten Sequenz, sodass eine exponentielle Vervielfältigung des genetischen Materials erreicht wird.

2.2.6.1 PCR an Plasmid-DNA

Um DNA-Fragmente aus Plasmiden zu amplifizieren, wurden sequenzspezifische Primer verwendet. Dabei wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

5 ng	Plasmid-DNA
25 µl	Hotstart Taq-Polymerase Mix
10 pmol	Primer f
10 pmol	Primer r
ad 50 µl	dH ₂ O.

Nach 15 min initialer Denaturierung bei 96°C erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion mit 35 Zyklen im Thermocycler vom Model Primus (MWG-Biotech AG) nach folgendem Programm:

40 Sekunden	94°C	Denaturierung
50 Sekunden	50-65°C	Anlagerung
60-90 Sekunden	72°C	Verlängerung.

Zum Abschluss des letzten Elongationsschrittes wurde die Reaktion für weitere 10 min bei 72°C fortgesetzt. Die Temperatur für eine optimale Anlagerung der Primer musste experimentell ermittelt werden.

2.2.6.2 PCR an genomischer DNA

Zur Sequenzierung der exonischen Bereiche des *ZFYVE27*-Gens wurde vor der eigentlichen Sequenzanalyse (2.2.6.6, S. 28) eine PCR mit zwei Primern durchgeführt. Folgendes Reaktionsschema wurde verwendet:

500 ng	genomische DNA
25 µl	25 µl Hotstart Taq-Polymerase Mix
10 pmol	Primer A
10 pmol	Primer B
ad 50 µl	dH ₂ O.

Nach 15 min initialer Denaturierung bei 96°C erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion mit 32 Zyklen im Thermocycler Perkin Elmer (Applied Biosystems) mit einer Anlagerungstemperatur von 60°C.

2.2.6.3 RT-PCR

In der RT-PCR (Methode nach Kogan 1987) dient mRNA als Matrize für die reverse Transkriptase, die eine der RNA komplementäre cDNA bildet. In einer anschließenden PCR wird mit Hilfe von sequenzspezifischen Primern ein DNA-Fragment amplifiziert. Die RT-PCR wurde mit dem ROCHE® Titan OneStep RT-PCR Kit durchgeführt:

1 µg	Gesamt-RNA
10 µl	5 x ROCHE® Titan OneStep RT-PCR Puffer
10 pmol	Primer A
10 pmol	Primer B
1 µl	dNTP-Mix
1 µl	ROCHE® Titan OneStep RT-PCR DTT
1 µl	ROCHE® Titan OneStep RT-PCR Enzym-Mix
ad 50 µl	DEPC dH ₂ O (RNase frei).

Die RT-PCR startete mit der reversen Transkription bei 50°C für 30 min, wodurch ein einzelsträngiges cDNA-Molekül erhalten wurde. Es folgte die Aktivierung der Polymerase bei 94°C für 2 min. Für den Ablauf der Polymerase-Kettenreaktion wurden 35 Zyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

10 Sekunden	94°C	Denaturierung
30 Sekunden	60°C	Anlagerung
60 Sekunden	68°C	Verlängerung.

Bei den letzten 25 Zyklen wurde bei jedem Zyklus der Verlängerungs-Schritt jeweils um 5 Sekunden erweitert, um den Wirkungsverlust der Polymerase auszugleichen. Um die Vervollständigung aller Fragmente zu gewährleisten, erfolgte der letzte Verlängerungsschritt für 10 min bei 68°C.

2.2.6.4 „Nested“-PCR

Um mit einer sehr geringer Menge an genetischem Material eine ausreichende Amplifikation nach Polymerase-Kettenreaktion zu erhalten, kann man die Anzahl der Zyklen steigern, wodurch sich aber die Wahrscheinlichkeit für Fehlhybridisierungen erhöht. Soll die Spezifität der Amplifikation erhalten bleiben, wird in einem solchen Fall mit dem Produkt der ersten PCR eine zweite, verschachtelte PCR durchgeführt. Die Primer für diese so genannte „Nested“-PCR werden innerhalb des Fragments der ersten PCR gewählt.

5 µl PCR Produkt
0,5 µl 10 pmol Primer A
0,5 µl 10 pmol Primer B
25 µl Hotstart Taq-Polymerase Mix
ad 50 µl dH₂O.

Nach 15 min initialer Denaturierung der Nukleinsäuren und Enzymaktivierung bei 96°C erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion mit 20-30 Zyklen im Thermocycler Primus (MWG-Biotech AG).

2.2.6.5 „Long Range“-PCR

Bei der „Long Range“-PCR wurde das ROCHE® Expand Long Template PCR System verwendet. Es wurde eine PCR an genomischer DNA durchgeführt, wobei Bereiche von 5 bis 10 kb amplifiziert wurden.

500 ng	genomische DNA
0,75 µl	ROCHE® Enzym Mix
10 pmol	Primer A
10 pmol	Primer B
5 µl	ROCHE® 10x PCR-Puffer 2
7 µl	dNTP-Mix
ad 50 µl	dH ₂ O.

Nach 2 min initialer Denaturierung bei 94°C erfolgte die Polymerase-Kettenreaktion mit 32 Zyklen im Thermocycler Perkin Elmer (Applied Biosystems).

15 Sekunden	94°C	Denaturierung
30 Sekunden	62,5°C	Anlagerung
5-10 min	68°C	Verlängerung.

Um die Vervollständigung aller Fragmente zu gewährleisten, erfolgte der letzte Verlängerungsschritt für 7 min bei 68°C.

2.2.6.6 Sequenzanalyse

Die Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren (Methode nach Sanger 1977) durchgeführt. Wie bei einer PCR bindet ein sequenzspezifischer Primer an die denaturierte DNA, sodass eine DNA-Polymerase einen komplementären Nukleinsäurestrang generieren kann. Im Unterschied zur PCR werden jedoch nicht nur dNTPs (Desoxynukleosidtriphosphate) verwendet, sondern auch vier unterschiedliche ddNTPs (Didesoxynukleosidtriphosphate), die mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Werden die ddNTP's

eingebaut, kommt es zu einem Abbruch in der Strangsynthese. Dies führt zu unterschiedlich großen DNA-Fragmenten. Nach einer elektrophoretischen Auftrennung können durch Fluorographie die Positionen des Kettenabbruches sichtbar gemacht werden, wodurch auf die Sequenz geschlossen werden kann.

Um eine Sequenzanalyse durchzuführen, wurden 1 µg DNA, 10 pmol eines Primers und 4 µl DYEnamic ET-Terminator-Mix mit dH₂O auf ein Reaktionsvolumen von 10 µl verdünnt. Die Reaktion erfolgte nach 40 Sekunden Denaturierung bei 95°C mit 25 Zyklen in einem Thermocycler vom Typ Primus (MWG-Biotech AG):

20 Sekunden	95°C	Denaturierung
15 Sekunden	50°C	Anlagerung
60 Sekunden	60°C	Verlängerung.

Die DNA-Fragmente wurden in einer Sephadex-Säule aufgereinigt und über einen automatischen Sequenzierer vom Modell MegaBace1000 (Amersham Bioscience, Freiburg) ausgewertet. Im Fall, dass eine Veränderung in der Sequenz gefunden wurde, wurde der entsprechende Bereich erneut amplifiziert und ein zweites Mal sequenziert, um auszuschließen, dass der Basenaustausch durch einen Fehler in der PCR entstanden war.

2.2.7 Standard-Agarosegelelektrophorese

Um die Nukleinsäuren elektrophoretisch aufzutrennen, wurden Agarosegele in einer horizontalen Kammer verwendet. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden Gele mit 0,6-1,5 % (w/v) Agaroseanteil verwendet. 100 ml 0,5 x TBE Puffer wurden mit der Agarose in einer Mikrowelle aufgeköcht, mit 10 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) gemischt und im Gelträger ausgehärtet. Die Gelkammer wurde mit 0,5 x TBE Puffer gefüllt und der Gelträger eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 1/3 Vol Probenpuffer versetzt und in die Geltaschen an der Kathode aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V bis eine klare Auftrennung der Fragmente zu sehen war. Eine Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte durch den Vergleich mit dem

Längenstandard. Die Kontrolle der Auftrennung und die fotografische Dokumentation der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele erfolgten mittels UV-Anregung auf einem Transilluminator.

Probenpuffer	70 % (v/v) Glycerin
	0,01 % (w/v) Bromphenolblau
	0,01 % (w/v) Xylencyanol FF.

2.2.8 Zellkulturtechniken

2.2.8.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Für die Transfektionen wurden kultivierte HeLa-Zellen verwendet. Die gesamten Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer Umluft-Sterilbank der Firma Heraeus mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten durchgeführt. Bei HeLa-Zellen handelt es sich um etablierte Zervix-Karzinom-Zellen, die in Gewebekulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium (2.1.10, S. 16) und 5 % CO₂ - Begasung bei feuchter Atmosphäre im 37°C warmen Brutschrank kultiviert wurden. In der Regel wurden die proliferierenden Zellen alle 3 Tage geteilt und in neue Kulturflaschen überführt. Dazu wurden nach Entnahme des verbrauchten Mediums die auf dem Boden der Flasche haftenden Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 1,5 ml Trypsin/EDTA - Gemisch abgelöst. Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden dann in neue Kulturflaschen überführt und mit 10 ml Medium aufgefüllt, sowie nach vorsichtigem Schwenken zur Verteilung in der Flasche im Brutschrank unter obigen Bedingungen kultiviert.

2.2.8.2 Transfektion von HeLa-Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen von Fremd-DNA in Zellkulturzellen bezeichnet. Hierzu wurde die Methode der Lipofektion gewählt. Dabei werden die Plasmide mittels Liposomen in die Zielzelle gebracht. Vorteil dieser auch als transiente Transfektion bezeichneten Methode, bei der die Plasmid-DNA nicht in das Genom integriert wird, ist ein Vorliegen dieser in hoher Kopienzahl, was zu

einer hohen Proteinexpression führt. Die vorgesehenen Zellen wurden wie in 2.2.8.1 beschrieben solange kultiviert, bis sie eine konfluente, zusammenhängende Schicht von etwa 80% der Fläche der Kulturflasche gebildet hatten. Für die folgende Transfektion wurde Lipofectamin 2000 Transfection-Reagenz von Invitrogen benutzt. Es wurden zwei Ansätze vorbereitet: Der erste enthielt 10 µl Lipofectamin und wurde mit OptiMEM-1 Medium auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der zweite enthielt 3 µg Plasmid-DNA und wurde ebenfalls mit OptiMEM-1 auf 100 µl aufgefüllt. Nach separater Inkubation beider Ansätze für 5 min bei RT wurden diese zügig in einem der Reaktionsgefäße vermischt und noch einmal für 20 min bei RT inkubiert. Während dieser Phase wurden die in DMEM kultivierten HeLa-Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und nach Entfernung des PBS mit 1 ml OptiMEM-1 Medium bedeckt. Nach Ablauf der 20minütigen Inkubationsphase wurde das Transfektionsgemisch Tropfen für Tropfen auf die Zellen in den Flaschen gegeben. Es folgte eine Inkubationsphase bei 37°C im Brutschrank von 3 – 4 Std.. Nach dieser Zeit wurde das Transfektionsgemisch in der Kulturflasche gegen DMEM Medium, das FKS und Antibiotika enthielt, ausgetauscht. Im Anschluss an eine erneute Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 24 – 48 Std. konnten die transfizierten Zellen zur Isolierung der exprimierten Proteine herangezogen werden.

2.2.8.3 Analyse von Fusionsproteinen

Zuvor mit Fusionsproteinen transfizierte Zellen wurden für 48 Std. bei 37°C kultiviert. Statt Zellkulturflaschen wurden Vierkammerobjektträger verwendet. Nach 10 min Fixierung auf dem Objektträger mittels Methanol wurden diese für 5 min in PBT inkubiert und nach Beträufeln mit DAPI, welches an DNA bindet und somit den Zellkern fluoreszieren lässt, enthaltendem Vectashield Mounting® Medium mit einem Deckgläschen abgedeckt. Die Ergebnisse der Transfektion konnten dann unter dem Mikroskop mit UV-Licht (Olympus BX60) sichtbar gemacht und über eine angeschlossene Digitalkamera mit entsprechender bildbearbeitender Software (SIS) archiviert werden.

2.2.8.4 Immunfluoreszenzfärbung von HeLa-Zellen

Die über Nacht auf Vierkammerobjektträgern gewachsenen Zellen wurden für 10 min bei RT durch eine eiskalte Methanol/Acetonmischung (Verhältnis 1:1) fixiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation in Blocking-Lösung abgedeckt. Anschließend wurde der erste in PBS dilutierte Antikörper über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer hinzugefügt. Nach 4 x Waschen mit PBS/0.2 % Tween-20 konnte mit dem zweiten Antikörper für 1 Stunde bei RT inkubiert werden. Nach 3 x Waschen mit PBS/0.2 % Tween-20 wurde ein Tropfen DAPI enthaltendes Mounting Medium auf die Objektträger gegeben und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Analog zur Analyse von Fusionsproteinen konnten die Ergebnisse mit einem Olympus BX60 Mikroskop sichtbar gemacht und über digitale Bildverarbeitung archiviert werden.

Blocking-Lösung: PBS mit
 5 % Ziegen-Serum
 3 % BSA
 1 x Roti-Block-Lösung.

2.2.9 Southernblot

Um DNA aus einem Agarosegel auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren, wurde ein Southernblot durchgeführt (Methode nach Southern 1975). Das Agarosegel wurde 2 x 20 min in Denaturierungslösung und anschließend 2 x 20 min in Neutralisationlösung geschwenkt. Der Transfer auf die HybondTM-C Nitrocellulosemembran erfolgte über Nacht in einem TurboBlotterTM gemäß Herstellerangaben mit 20 x SSC als Transferflüssigkeit. Zur kovalenten Fixierung der DNA wurde die Membran dann 2 Stunden bei 80°C inkubiert.

(Qiagen, Hilden) enthalten. Er bindet alle doppelsträngigen DNA-Moleküle und emittiert während des Bindungsvorgangs ein Fluoreszenzsignal. Aufgrund dessen ist es möglich, verschiedene Zielbereiche zu quantifizieren und dabei auf den Einsatz von sequenz-spezifischen Fluoreszenz-Sonden zu verzichten. Das Exzitationsmaximum des Farbstoffs liegt bei 494 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 521 nm.

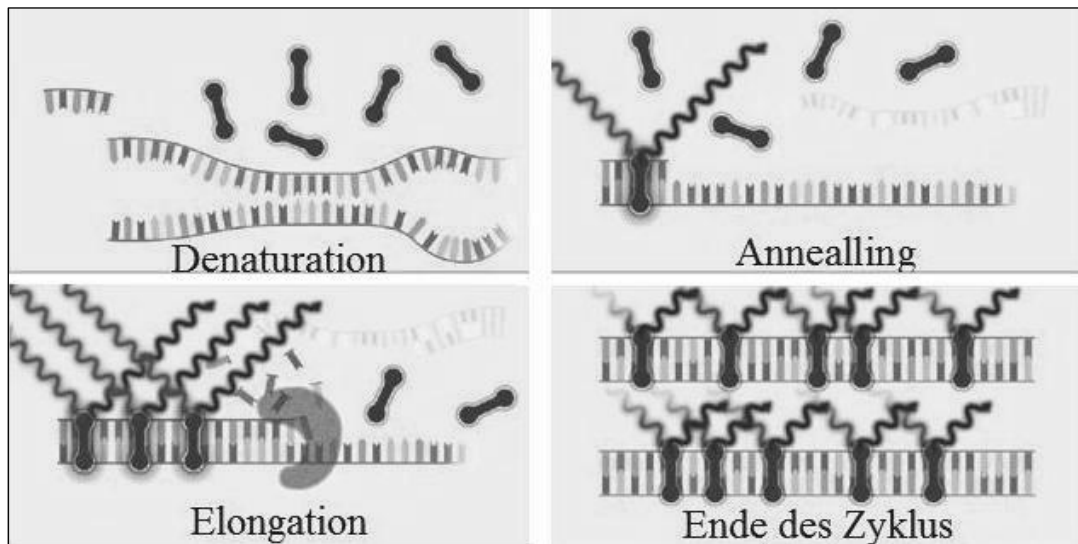


Abbildung 1: Wirkungsweise des SYBR-Green-I-Farbstoffs.

Beim Denaturierungsschritt ist es für den SYBR-Green-I-Farbstoff unmöglich, sich an die DNA anzulagern, da die DNA einzelsträngig ist. Beim Annealingsvorgang lagern sich die Primer an die einzelsträngige DNA an und bilden somit kurze, doppelsträngige Bereiche. An ihnen können wenige SYBR-Green-I-Farbstoff-Moleküle binden. Je weiter die Elongation voranschreitet, desto länger wird der doppelsträngige Bereich, und entsprechend mehr SYBR-Green-I-Farbstoffmoleküle können sich anlagern und Fluoreszenz emittieren.

Eine 384-Proben-Hochdurchsatz-Analyse wurde mit dem ABI Prism 7900 Sequence Detection System auf weißen 384-Loch-Platten für eine 3fache Verstärkung der Fluoreszenzsignale durchgeführt. Dieses System arbeitet mit einem Temperatur-Cycler und einem Laser, der zu jedem der 384 Reaktionsansätze gelenkt wird und diese anregt. Die Fluoreszenz-Emission jeder Probe, die durch Interkalation des SYBR Green I Fluoreszenz-Farbstoffes an doppelsträngige DNA entsteht, wird mittels einer ladungsempfindlichen Vorrichtung gebündelt und gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe der Sequenz-Detektionssystem-Software (SDS Version 2.1, PE Applied Biosystems) quantifiziert und ausgewertet.

Die Reaktions-Ansätze enthielten 0,25 pMol eines jeden Oligonukleotids und 5µl 2x QuantiTect™ SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen, Hilden). Letzterer enthält die HotStarTaq™ DNA-Polymerase in einem optimierten Puffer, dNTP Mix (mit dUTP-Additiv), den SYBR®Green-I-Fluoreszenz-Farbstoff und ROX Farbstoff als passive Referenz.

Um das Auftreten von unspezifischen Produkten auszuschließen, wurde nach Abschluß der Amplifikation routinemäßig eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz (F) bei steigender Temperatur (T) gemessen und die Steigung dF/dT (1. Ableitung) errechnet. Diese wurde gegen die Temperatur aufgetragen und damit die Maxima bei den primerspezifischen Schmelztemperaturen aufgezeigt. Zusätzliche Maxima verrieten unspezifische Produkte, z.B. Primer-Dimere.

50 °C	2 min	
95 °C	15 min	
94 °C	15 sec	
60 °C	30 sec	40 Zyklen
72 °C	1min	
94 °C	30 sec	
60 °C	30 sec	
60 °C-95 °C	2 °C/min.	

Die Kontroll-DNA wurde zur Erstellung einer Standard-Kurve genutzt. Die Anzahl an Zyklen, bei der die Menge des amplifizierten Zielbereichs einen bestimmten Schwellenwert erreicht, ist der sog. Wert C_t . Dieser C_t -Wert korreliert mit der Anzahl der Kopien zum Startpunkt. Eine höhere oder niedrigere Start-Kopiezahl resultiert in einem signifikant früheren oder späteren Anstieg der Fluoreszenz-Emission (Abb. 2).

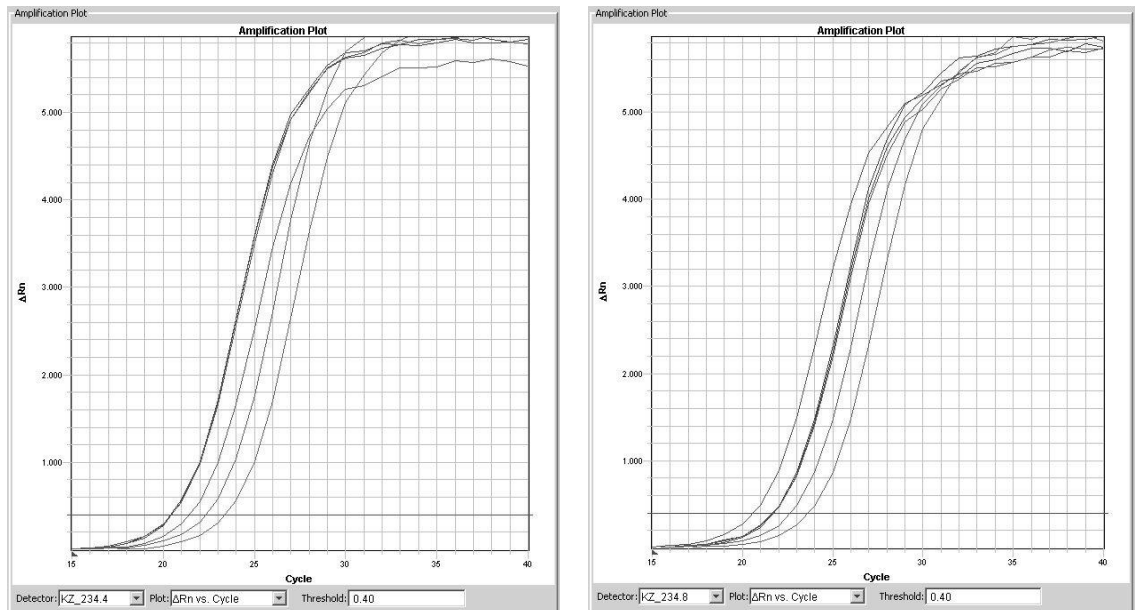


Abbildung 2: lineare Darstellung der Standardkurven

Mit Konzentrationen: 5,0 ng/μl, 2,5 ng/μl, 1,25 ng/μl und 0,625 ng/μl. Die probenspezifische Kurve (fett) rechts zeigt einen im Vergleich zu links signifikant späteren Anstieg und damit eine (in diesem Fall) um die Hälfte verminderte Konzentration an.

Die absolute Quantifizierung des Zielamplikons in unbekanntem Proben wird ermöglicht durch die Messung des C_T -Wertes und durch lineare Interpolation in der entsprechenden halblogarithmischen Darstellung ($c_t/\log(c_0)$) (Abb. 3).

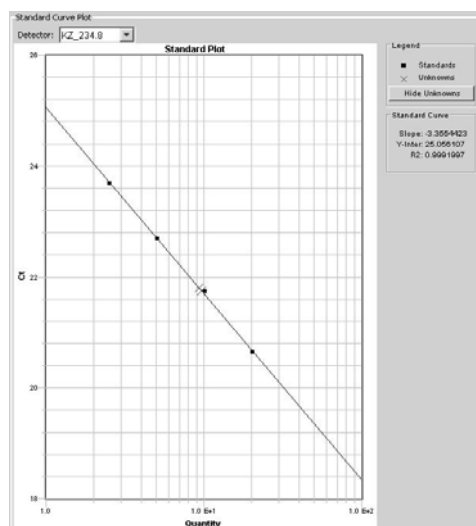


Abbildung 3: Halblogarithmische Darstellung: Standardkurve.

Aufgetragen ist der C_T -Wert gegen die logarithmierte Konzentration der DNA ($c_t/\log(c_0)$). Die halblogarithmische Darstellung ermöglicht die absolute Quantifizierung des Zielamplikons durch lineare Interpolation. Die vier schwarzen Punkte stellen die Konzentrationen der Referenz-DNA in den Konzentrationen 20 ng/μl, 10 ng/μl, 5 ng/μl und 2,5 ng/μl dar. Die dünne schwarze Linie kennzeichnet die aus den Standardkonzentrationen interpolierte, logarithmierte Konzentration.

Die absoluten Daten wurden exportiert, in Excel importiert und gegen das homozygote Referenz-Amplikon durch Berechnung des Verhältnisses $c_{\text{Testamplikon}}/c_{\text{Referenzamplikon}}$ normalisiert. Durch diese Methode werden die Menge und die Qualität genomischer DNA für jede Probe normalisiert (Boehm et al. 2004).

3. Ergebnisse

Die hereditäre spastische Paraplegie ist eine Erbkrankheit, die durch eine progressive Parese und Spastik der unteren Extremität charakterisiert ist. Sie wird autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal rezessiv vererbt. Der größte Anteil mit circa 70 bis 80% der Fälle folgt dabei dem autosomal-dominanten Erbgang. Bei 40 bis 50% der Patienten mit autosomal-dominantem Erbgang wird die Erkrankung durch Mutationen im *SPG4*- und *SPG3*-Gen verursacht, so dass in mehr als der Hälfte der Fälle Mutationen in anderen Genen als Ursache der Erkrankung angenommen werden können. In vorhergehenden Arbeiten war das *ZFYVE27*-Gen als möglicher Interaktionspartner des *SPG4*-Gens identifiziert worden. Zudem schien der chromosomale Locus des Gens dem AD-HSP-Locus SPG9 zu entsprechen (Lo Nigro et al. 2000). Daher wurde das *ZFYVE27*-Gen als ein Kandidatengen für die HSP angesehen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNA-Proben von 43 HSP-Patienten mit autosomal-dominantem Erbgang, bei denen Mutationen in den Genen *SPG3* und *SPG4* ausgeschlossen worden waren, auf Mutationen im *ZFYVE27*-Gen untersucht.

3.1 Sequenzierung von *ZFYVE27*

3.1.1 Identifizierung der Exon/Intron-Grenzen und Amplifikation der Exons

Die als Interaktionspartner von *SPG4* identifizierte 2746 bp große cDNA von *ZFYVE27* (Genbank Nummer AK097945) wurde mit Hilfe des NCBI-Programms <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> für Homologievergleiche auf genomischer Ebene verwendet, um die Lage der Exons und die Übergänge von exonischen und intronischen Bereichen zu bestimmen. Es wurde festgestellt, dass sich das *ZFYVE27*-Gen aus dreizehn Exons zusammensetzt. Das ATG-Start-Codon ist im zweiten und das TGA-Stop-Codon im letzten Exon lokalisiert. Zur Amplifikation wurden spezifische, die Exons flankierende Primer generiert, so dass bei der

anschließenden Sequenzierung auch die Analyse der Exon/Intron-Grenzen möglich war. Diese Primer wurden sowohl für die Amplifikation (2.2.6.2, S. 25), als auch für die Sequenzierung (2.2.6.6, S. 28) der amplifizierten Fragmente verwendet.

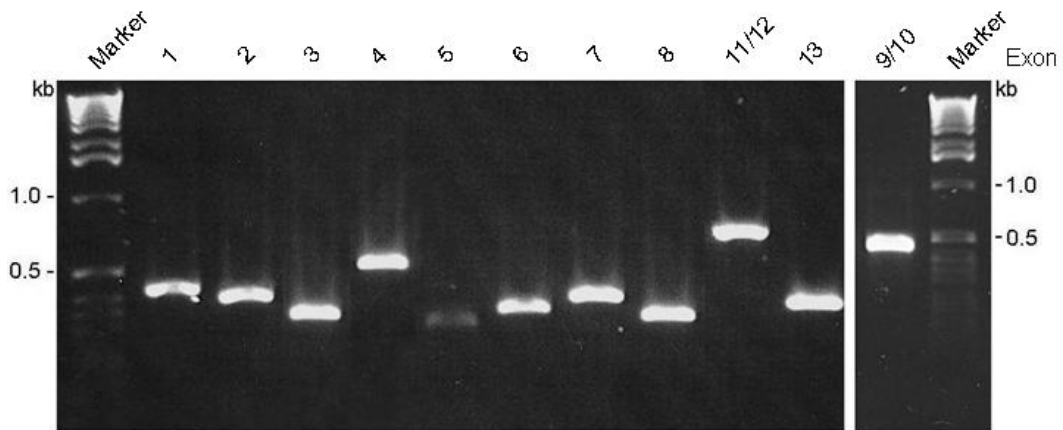


Abbildung 4: PCR-Produkte der 13 Exons von *ZFYVE27*

Agarosegel mit den Amplifikaten der exonischen Bereiche des *ZFYVE27*-Gens. Die Exons 9 und 10, als auch die Exons 11 und 12 wurden gemeinsam amplifiziert, da sie auf genomischer Ebene durch kleine Introns getrennt sind. Entsprechend der Beschriftung über den Spuren wurden neben dem Größenstandard (Marker) links und rechts aussen die Proben aufgetragen. Die Ziffern bezeichnen die amplifizierten Fragmente der Exons 1-13.

3.1.2 Sequenzveränderungen im *ZFYVE27*-Gen

Bei der Sequenzierung (2.2.6.6, S. 28) der exonischen Bereiche des *ZFYVE27*-Gens von 43 HSP-Patienten konnten bei 4 Patienten insgesamt 5 Veränderungen auf genomischer Ebene nachgewiesen werden. Die gefundenen Veränderungen betreffen sowohl nicht-translatierte Bereiche (5'UTR-187T>A, 5'UTR-117C>T), als auch kodierende Sequenzen (c.127C>T, c.572G>T) und intronische Regionen (IVS+57T>C). Die Nummerierungen beziehen sich auf Variante 4 der *ZFYVE27*-cDNA. Die Veränderungen c.127C>T und c.572G>T wurden bei demselben Patienten nachgewiesen. Der Basenaustausch von Guanin durch Thymin an Position 572 der kodierenden Sequenz von *ZFYVE27* bewirkt einen Austausch der Aminosäure Glycin durch Valin (p.G191V).

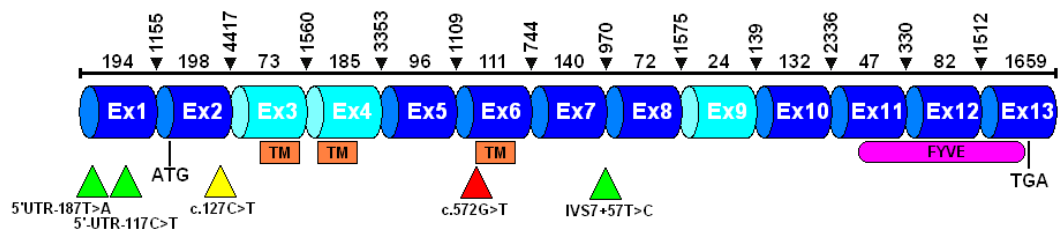


Abbildung 5: Genomische Struktur des *ZFYVE27*-Gens

Die Abbildung zeigt den Aufbau des *ZFYVE27*-Gens. Die Exons sind jeweils mit Ex1 bis Ex13 beschriftet. Dunkelblau dargestellte Exons finden sich in allen bisher analysierten Transkripten, wohingegen hellblaue Bereiche nur in einzelnen Transkripten auftreten. Die Größe der Exons und Introns ist in Basenpaaren über dem jeweiligen Bereich angegeben. Unter der cDNA befinden sich in orange drei Transmembrandomänen und die FYVE-Domäne in pink. Weiterhin sind 5 Veränderungen und ihre ungefähre Lage in Form von Dreiecken dargestellt. Die grünen Markierungen stellen Veränderungen dar, welche in untranslatierten Bereichen der cDNA bzw. im Intron liegen. Die gelbe Markierung stellt eine Veränderung dar, welche im translatierten Bereich der cDNA liegt, aber keinen Aminosäureaustausch bewirkt. Die rote Markierung entspricht der Veränderung, die einen Aminosäureaustausch bewirkt. Die Lokalisation der Veränderungen ist unter den Dreiecken angegeben.

Um auszuschließen, dass die Veränderung *c.572G>T* ein Polymorphismus ist, wurde das Exon 6 von 50 DNA-Kontrollproben sequenziert. In keiner von diesen und auch in keiner weiteren der 43 Patientenproben konnte diese Veränderung nachgewiesen werden.

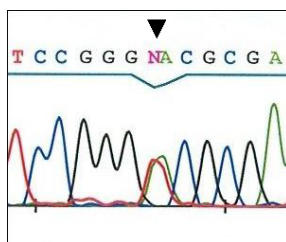


Abbildung 6: 5'UTR-187T>A

Darstellung des Sequenzausschnitts mit der Veränderung 5'UTR-187T>A, die im 5'-untranslatierten-Bereich an Position -187 der cDNA liegt. Das schwarze Dreieck markiert die übereinander gelagerten Signale, welche durch den heterozygoten Austausch von Adenosin durch Thyminid entsteht.

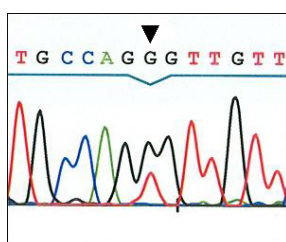


Abbildung 7: 5'UTR-117C>T

Ausschnitt aus der Sequenz des ersten Exons. Das schwarze Dreieck ist über dem Basenaustausch 5'UTR-117C>T positioniert, der im 5'-untranslatierten-Bereich an Position -117 der cDNA liegt.

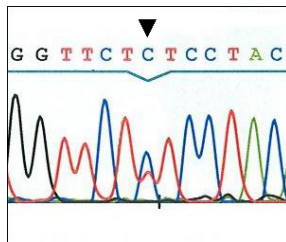


Abbildung 8: c.127C>T,

Der dargestellte Abschnitt der DNA-Sequenz enthält die Veränderung c.127C>T. Der Basenaustausch im zweiten Exon ist durch das schwarze Dreieck markiert.

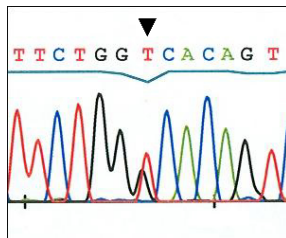


Abbildung 9: c.572G>T

Grafische Darstellung des Ausschnitts der Sequenz, der die putative Mutation c.572G>T enthält. Das schwarze Dreieck ist über der im Exon 6 liegenden Veränderung positioniert.

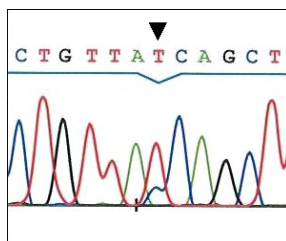


Abbildung 10: IVS+57T>C

Darstellung des intronischen DNA-Abschnitts zwischen Exon 7 und 8, welcher den heterozygoten Austausch von Thymin durch Cytosin enthält (IVS7+57T>C). Das schwarze Dreieck markiert den Basenaustausch.

3.2 Expression des *ZFYVE27*-Gens

Zu Beginn dieser Arbeit lagen keine detaillierten Informationen über die Expression des *ZFYVE27*-Gens vor, deswegen wurde im Rahmen dieser Arbeit sowohl die Gesamt-RNA aus verschiedenen menschlichen und murinen Geweben als auch aus verschiedenen Zelllinien mit Hilfe der RT-PCR (2.2.6.3, S. 26) auf eine Expression des *ZFYVE27*-Gens hin untersucht.

Zunächst wurde das NCBI-Programm <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> verwendet, um mögliche Transkriptvarianten des *ZFYVE27*-Gens zu identifizieren. Die Sequenz von *ZFYVE27* wurde mit dem menschlichen Genom und der vorliegenden EST-Datenbank verglichen. Hierdurch konnten vier putative Spleißvarianten identifiziert werden.

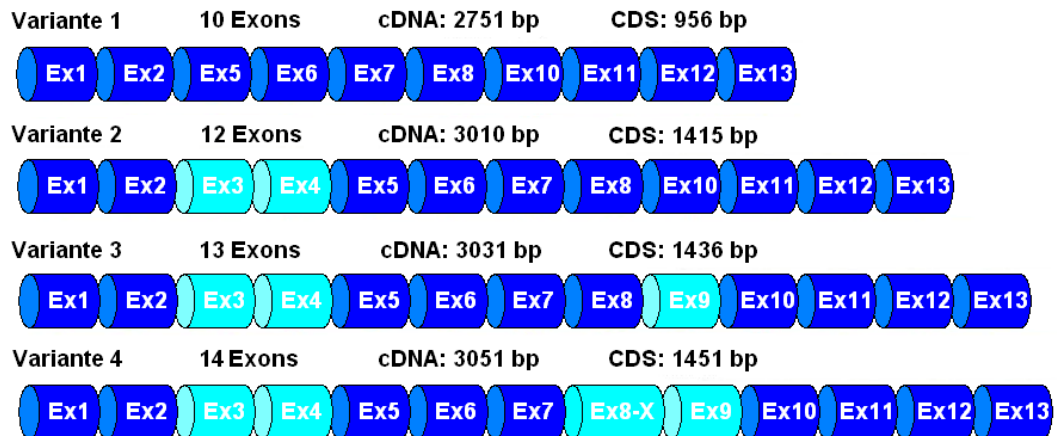


Abbildung 11: putative Spleißvarianten von *ZFYVE27*

Die unterschiedlichen Spleißvarianten der *ZFYVE27*-cDNAs sind in der schematischen Darstellung mit Variante 1 bis Variante 4 bezeichnet. Über jeder Variante ist jeweils die Länge der cDNA und der kodierenden Sequenz (CDS) in Basenpaaren (bp) und die Anzahl der Exons angegeben. Die Exons sind jeweils mit Ex1 bis Ex13 beschriftet. Die dunkelblauen Exons sind in jeder Spleißvariante vorhanden. Die drei hellblauen finden sich nur in einzelnen Varianten. Das Exon 8-X unterscheidet sich von Exon 8 durch 15 Basen, die an seinem Anfang zusätzlich vorhanden sind.

3.2.1 Analyse der Expression des *ZFYVE27*-Gens auf RNA-Ebene beim Menschen

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, in welchen Geweben des Menschen die einzelnen Transkriptvarianten des *ZFYVE27*-Gens exprimiert werden. Hierzu wurden RT-PCR-Analysen (2.2.6.3, S. 26) mit RNA aus Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Trachea, Testis und Leber durchgeführt. Zuerst wurden die Primer FLJ-Nested-F und FLJ-Nested-R verwendet, die den kodierenden Bereich der *ZFYVE27*-cDNA flankieren. Die Reaktionen mit diesem Primerpaar lieferten nicht genügend Produkt, so dass das Experiment mit den Primern FLJ-ORF-F und FLJ-RT Ex-4-R, die nur den Bereich der Exons 2 bis 6 eingrenzen, wiederholt wurde. Die Lage dieser Primer im zweiten und sechsten Exon könnte bei Vorliegen der Variante 1 von *ZFYVE27* zu einem 401 bp großen Produkt und bei Expression der Varianten 2, 3 und 4 zu einem 663 bp großen Amplifikat führen (s. Abb. 9).

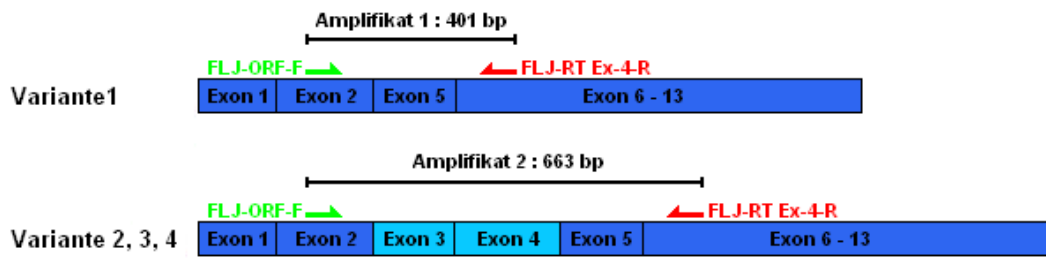


Abbildung 12: Parameter der RT-PCR Exon 2-6

Schematische Darstellung der bei der RT-PCR verwendeten Primer im Bezug zur *ZFYVE27*-cDNA. Der „forward“-Primer FLJ-ORF-F ist grün und der „reverse“-Primer FLJ-RT-4-R rot über der blauen cDNA dargestellt.

Als Kontrolle wurde jeweils eine zusätzliche Reaktion ohne RNA mitgeführt, um durch Kontaminationen entstandene Produkte ausschließen zu können. Diese Kontrolle wurde als „0-Kontrolle“ bezeichnet.

Die gelelektrophoretische Auftrennung (2.2.7.1, S. 29) der Produkte und ihre Darstellung mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht-Anregung zeigten bei der RT-PCR mit RNA aus dem Gehirn eine deutliche, ungefähr 400 bp große, Bande. In den anderen Proben ließen sich spezifische Produkte nicht eindeutig nachweisen. Eine schwache, ungefähr 600-700 bp große Bande konnte in den RT-PCRs mit RNA aus Nebenniere und Testis dargestellt werden. In den Geweben Herz, Niere, Trachea und Leber konnte kein Produkt nachgewiesen werden. Auf eine GAPDH-Kontrolle in den gleichen Reaktionsansätzen wurde aufgrund der ähnlichen Größe der entstehenden Produkte verzichtet.

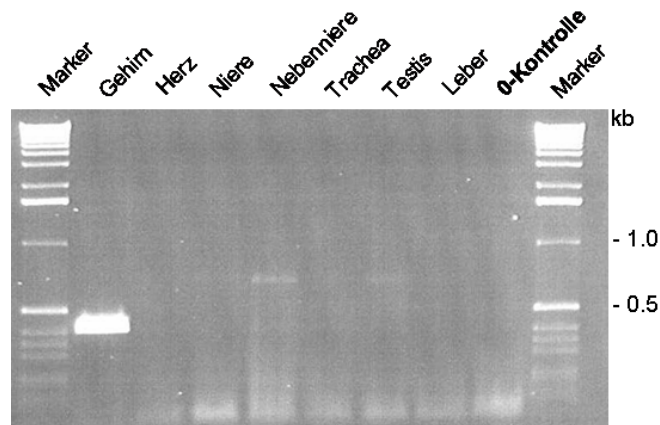


Abbildung 13: RT-PCR – *ZFYVE27* Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Trachea, Testis, Leber
Agarosegel mit den Produkten der RT-PCRs, die mit den Primern FLJ-ORF-F und FLJ-RT-Ex4-R durchgeführt wurden. Die Beschriftung über den Spuren gibt an, welche Proben aufgetragen wurden.

3.2.2 Klonierung der menschlichen *ZFYVE27*-cDNA

Es sollte mit Hilfe der RT-PCR die komplette kodierende Sequenz von *ZFYVE27* aus humaner Gehirn-RNA analysiert werden. Da beim ersten Versuch, unter Verwendung der Primer FLJ-Nested-F und FLJ-Nested-R, keine ausreichende Menge des gewünschten Produkts erzielt werden konnte, wurde eine „Nested“-PCR (2.2.6.4, S. 27) mit den Primern FLJ-ORF-F und FLJ-ORF-R durchgeführt. Diese, anhand von Datenbankinformationen generierten Primer, liegen in Exon 2 im Bereich des Start-Codons und in Exon 10 im Bereich des Stop-Codons und ermöglichen eine Amplifikation der gesamten kodierenden Sequenz von *ZFYVE27* unter Erhaltung des ursprünglichen Leserasters (s. Abb. 14). Die Lage dieser Primer führt beim Vorliegen der Variante 1 zu einem 957 bp großen Produkt. Im Falle einer Expression der Varianten 2, 3 oder 4 entstehen ungefähr 1,2 kb große Amplifikate.

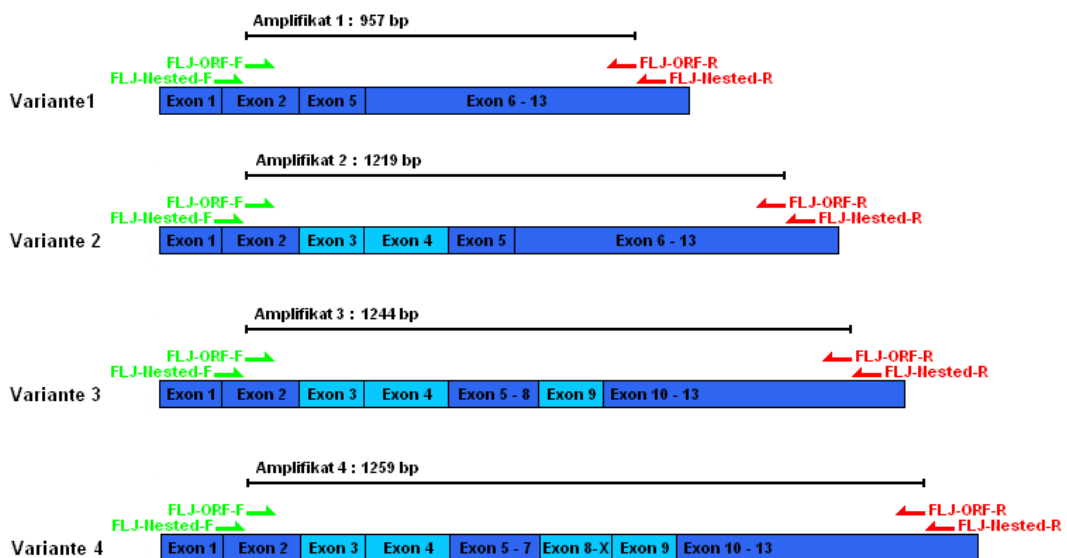


Abbildung 14: Parameter der RT-PCR komplette kodierende Sequenz

Darstellung der verwendeten Primer in Bezug zur *ZFYVE27*-cDNA. Die „forward“-Primer FLJ-Nested-F und FLJ-ORF-F sind grün und die „reverse“-Primer FLJ-ORF-R und FLJ-Nested-R rot über der cDNA dargestellt. Über den verschiedenen Varianten der cDNA sind vier der möglichen Amplifikate dargestellt.

Das Produkt der „Nested“-PCR wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit Hilfe von Ethidiumbromid unter UV-Licht-Anregung sichtbar gemacht (s. Abb. 15). Hierbei zeigte sich ein einzelnes ungefähr 1 kb großes Amplifikat. Andere Amplifikate konnten nicht nachgewiesen werden. Die 1 kb große Bande wurde aus dem Gel extrahiert, in den Vektor pGem®-Teasy kloniert und anschließend

sequenziert. Die Sequenzierung zeigte, dass es sich bei dem Insert um die 957 bp große kodierende Sequenz der Variante 1 des *ZFYVE27*-Gens handelt (Genbank Nummer AK097945). Da nur dieses Amplifikat nachgewiesen werden konnte, wird es im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch mit *ZFYVE27*-cDNA bezeichnet. Alle Positionsangaben auf DNA- und Aminosäureebene beziehen sich ebenfalls auf diese Spleißvariante.

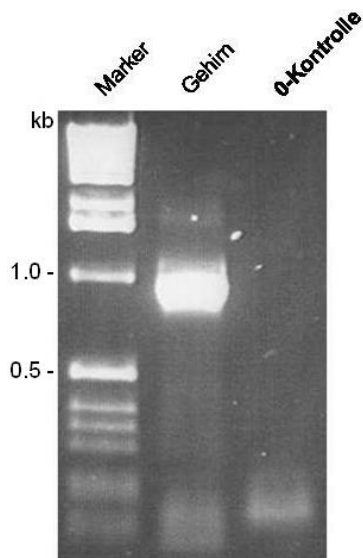


Abbildung 15: RT-PCR – *ZFYVE27* Gehirn

Agarosegel mit dem Produkt der „Nested“ PCR (Primer FLJ-ORF-F und FLJ-ORF-R). Neben dem Größenstandard, „Marker“ wurde das Produkt der RT-PCRs, mit RNA aus dem humanen Gehirn, „Gehirn“, und ohne RNA, „0-Kontrolle“, aufgetragen.

3.2.3 Analyse der Expression des *Zfyve27*-Gens auf RNA-Ebene bei der Maus

In der Maus existiert ein dem *ZFYVE27*-Gen homologes Gen, dessen Sequenz zu 87% mit der menschlichen Form übereinstimmt. Die Sequenz des entsprechenden Proteins ist zu 86% mit dem menschlichen *ZFYVE27*-Protein (Variante 3) homolog. Das bei der Maus als *zfyve27* bezeichnete Gen besteht genau wie *ZFYVE27* aus 13 Exons, besitzt eine FYVE-Finger-Domäne und kann 3 putative Transmembrandomänen ausbilden. Die Datenbanken liefern bei der Maus aber, im Gegensatz zum Menschen, nur Hinweise auf das Vorliegen einer einzigen Spleißvariante, welche der Variante 3 des humanen *ZFYVE27* entspricht. Es sollte untersucht werden, inwieweit *zfyve27* in der Maus exprimiert wird und ob Unterschiede in der Expression in verschiedenen Organen und während der embryonalen Entwicklung der Maus bestehen. Hierfür wurde RNA aus Herz-, Lungen-, Nieren-, Muskel-, Luftröhren-, Ovar-, Eileiter-, Plazenta-, Hodengewebe und aus unterschiedlich alten Maus-Embryonen gewonnen. Als erstes wurde eine

RT-PCR (2.2.6.3, S. 27) mit RNA aus dem murinen Gehirn mit dem Primerpaar FLJ-M-F1 und FLJ-M-R3 durchgeführt, mit der die komplette kodierende Sequenz des Gens amplifiziert werden sollte (s. Abb.16).

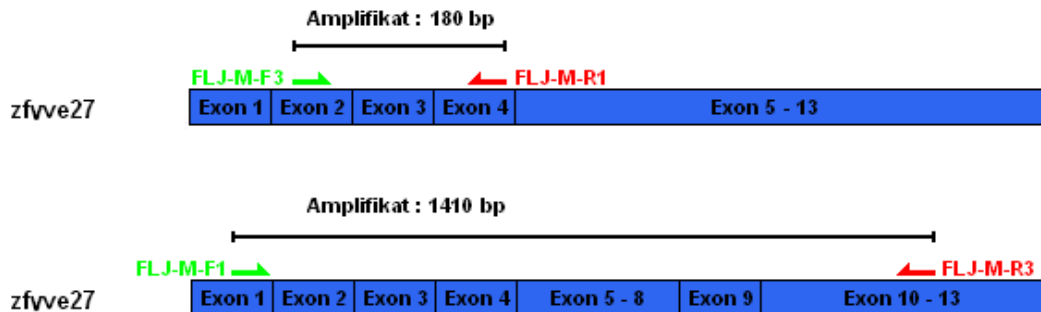


Abbildung 16: Parameter für die RT-PCR *zfyve27*

Die Abbildung zeigt die *zfyve27*-cDNA und die ungefähre Lage der für die RT-PCR verwendeten Primerpaare. Die „forward“-Primer sind grün und die „reverse“-Primer rot über der cDNA dargestellt.

Es zeigte sich bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte und ihrer Darstellung mit Hilfe von Ethidiumbromid und UV-Licht-Anregung eine einzelne ungefähr 1,4 kb großen Bande. Diese Bande wurde aus dem Gel extrahiert und in den Vektor pGem®-Teasy kloniert. Durch Sequenzierung des Inserts konnte die 1410 bp große komplette kodierende Sequenz des *zfyve27*-Gens identifiziert werden.

Zur weiteren Untersuchung der Gewebe wurden die Primer FLJ-M-F3 und FLJ-M-R1 (s. Abb. 16) verwendet, welche den Bereich zwischen Exon 2 und Exon 4 der *zfyve27*-cDNA einschließen. Die Effizienz der RT-PCRs wurde mit den zusätzlich verwendeten Primern GAPDH-F und GAPDH-R kontrolliert. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurde zusätzlich eine „0-Kontrolle“ durchgeführt.

Bis auf die „0-Kontrolle“ zeigten alle untersuchten Proben bei der gelelektrophoretischen Auftrennung zwei Banden. Es lagen eine ungefähr 450 bp große Bande und eine etwa 200 bp große Bande vor. Zwischen den einzelnen Proben bestanden leichte Unterschiede in der Intensität der Banden. (s. Abb. 17).

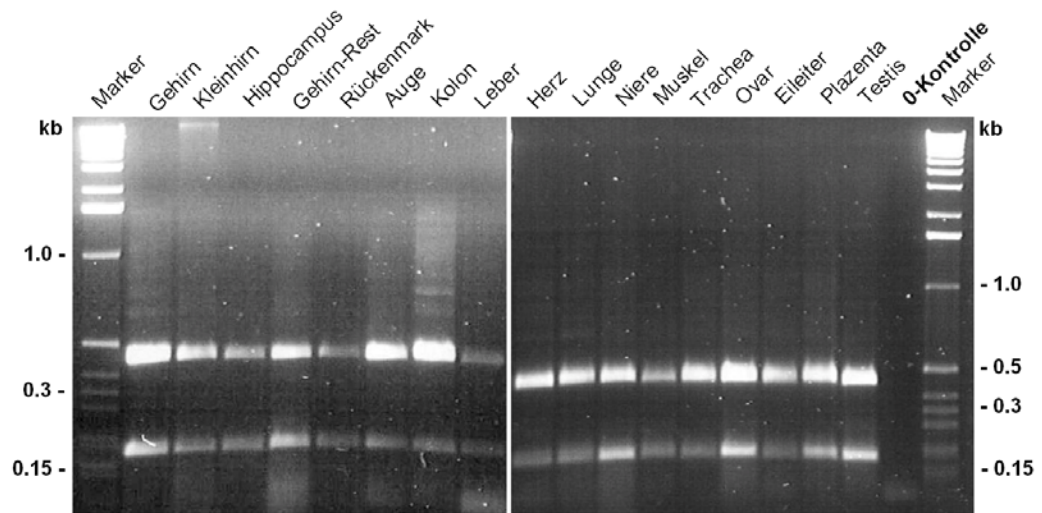


Abbildung 17: RT-PCR – Expression von *Zfyve27* in der Maus

Agarosegel mit den Produkten der RT-PCRs zur Untersuchung der Expression von *Zfyve27* in verschiedenen Geweben der Maus. Die Beschriftung über den Spuren gibt an aus welchem Gewebe die RNA stammte, die für den Ansatz verwendet wurde.

Bei der Untersuchung der RNA der unterschiedlich alten Maus-Embryonen zeigten bei der optischen Kontrolle alle Proben eine circa 450 bp große Bande und eine ungefähr 200 bp große Bande. Neben diesen beiden Banden konnten noch weitere Produkte von schwächerer Intensität nachgewiesen werden. Die RT-PCRs mit RNA der 10,5, 12,5, 14,5, 13,5, 15,5 und 18,5 Tage alten Embryonen enthielten zusätzlich ein 600 bp großes und ein ungefähr 700 bp großes Produkt. Die RT-PCR mit der RNA des 13,5 Tage alten Maus-Embryos enthielt zudem ein etwa 900 bp großes Amplifikat. Die „0-Kontrolle“ enthielt kein Amplifikat (s. Abb. 18).

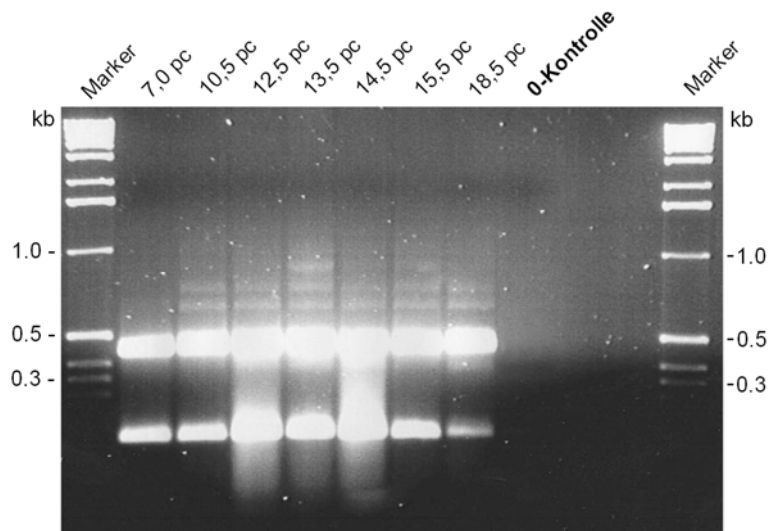


Abbildung 18: *Zfyve27* Expression während der embryonalen Entwicklung

Die Abbildung zeigt die Produkte der RT-PCRs nach gelelektrophoretischer Auftrennung. Der Größenstandard (Marker) wurde links und rechts aufgetragen. Das Alter der untersuchten Embryonen ist in Tagen über den Spuren angegeben.

In weiteren Versuchen wurde die Expression von *zfyve27* in verschiedenen Zelllinien analysiert. Die untersuchten Zelllinien stammen von Sertoli-Zellen (15p1), Leydigzellen (MA-20), Neuroblastomzellen (NS20Y), Spermatogonien und Spermatozyten (GC 1, GC 2, GC 3) der Maus ab. In allen RT-PCRs konnte eine ungefähr 450 bp große Bande und eine 200 bp große Bande nachgewiesen werden. Neben diesen beiden deutlich sichtbaren Banden waren in allen Proben noch mehrere größere Banden sichtbar, die aber von sehr geringer Intensität waren. In der „0-Kontrolle“ war kein Amplifikat nachweisbar (s. Abb. 19).

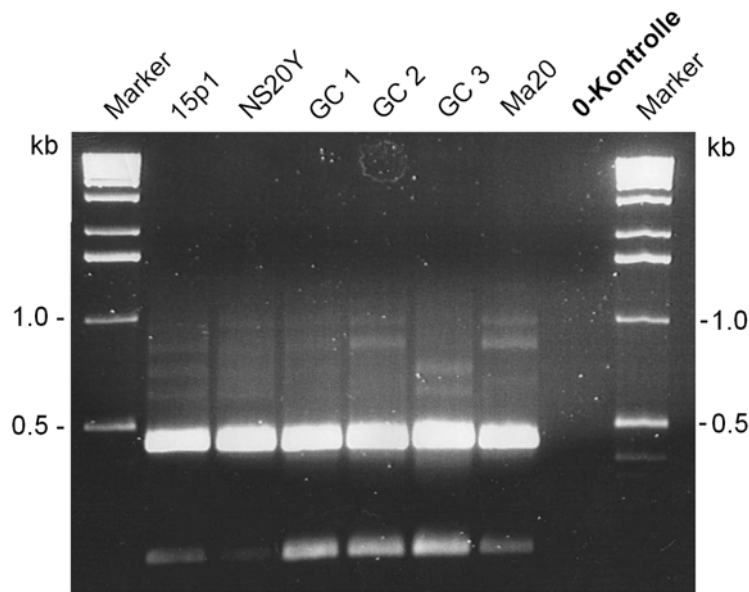


Abbildung 19: RT-PCR – *zfyve27* Zelllinien

Agarosegel nach Auftrennung der Produkte der RT-PCRs zur Untersuchung der Expression von *zfyve27* in verschiedenen Zelllinien. Die Proben 15p1, NS20Y, GC 1, GC 2, GC 4 und Ma 20 wurden zwischen dem Größenstandard (Marker) links und rechts aufgetragen. Die Beschriftung über den Spuren gibt an, aus welchen Zellen die RNA für den jeweiligen Ansatz stammte.

3.3 Co-Immunlokalisation

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen zur Funktion des *ZFYVE27*-Gens angestellt werden. Einen ersten Hinweis auf die Funktion des entsprechenden Proteins könnten intrazelluläre Lokalisationstudien liefern. Zudem könnte eine mögliche Co-Lokalisation mit Spastin ein weiteres Indiz für die Interaktion der beiden Proteine sein.

3.3.1 Immunfluoreszenz-Analyse von *ZFYVE27* in HeLa-Zellen

Zu diesem Zweck sollte die cDNA von *ZFYVE27* synthetisiert, in die Expressionsvektoren pEGFP-C1 und pQM-Ntag/A kloniert, menschliche Zervixkarzinom-Zellen der Zelllinie HeLa jeweils mit einem Vektor transfiziert (2.2.8.2, S. 30) und die Verteilung des *ZFYVE27*-Proteins in diesen Zellen per Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden (2.2.8.4, S. 31). *SPG4* war zuvor schon in den Vektor pCS2 kloniert worden und wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt, um *ZFYVE27* direkt mit Spastin vergleichen zu können. Mit

Hilfe des pEGFP-C1-Vektors kann an das gewünschte Protein das grünfluoreszierende Peptid EGFP angehängt werden, über welches man dann das Fusionsprotein in den Zellen im Mikroskop direkt nachweisen kann. Der intrazelluläre Nachweis der durch pQM-Ntag/A und pCS2 generierten Fusionsproteine basiert hingegen auf Antikörpern, welche jeweils an das E2- oder c-myc-Epitop binden und einem zweiten Antikörper, welcher wiederum an den ersten bindet und mit einem in unserem Fall rotfluoreszierenden Farbstoff versehen ist.

Es wurde die bei der Expressionsanalyse (3.2.1, S. 42) aus menschlicher RNA des Gehirns amplifizierte *ZFYVE27*-cDNA (Genbank Nummer AK097945) verwendet. Die bereits in den pGem®-Teasy-Vektor klonierte cDNA wurde für eine PCR (2.2.6.1, S. 25) benutzt, bei der die Primer FLJ-BamHI und FLJ-Hind3 gebraucht wurden, die die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III enthielten. Das Produkt wurde in den pGem®-Teasy-Vektor kloniert. Dieser wurde mit *Bam*HI und *Hind*III restringiert (2.2.4.1, S. 23) und die cDNA per Gelelektrophorese vom Vektor getrennt. Das hierbei gewonnene Fragment ist 0,958 kb groß und enthält den kompletten offenen Leserahmen von Base 199 bis zu Base 1151 der *ZFYVE27*-cDNA. Dieses Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III im korrekten Leserahmen in pEGFP-C1 kloniert, so dass das entstandene Konstrukt zur Expression des *ZFYVE27*-Proteins mit dem C-terminal angehängten EGFP führt. Zur Erstellung des E2-*ZFYVE27*-Konstrukts wurde ebenfalls die *ZFYVE27*-cDNA verwendet. Das bereits in pGem®-Teasy klonierte cDNA-Fragment wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Kpn*I unter Erhaltung des korrekten Leserahmens direkt in den Expressionsvektor kloniert (2.2.4.2, S. 23). Zur intrazellulären Detektion des E2-*ZFYVE27*-Fusionsproteins wurde ein monoklonaler anti-E2-tag-Antikörper verwendet.

Die mikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass es in den meisten Zellen zu einer deutlichen Anreicherung sowohl des GFP-*ZFYVE27*-, als auch des E2-*ZFYVE27*-Fusionsproteins in punktförmigen Bereichen im Zytosol der HeLa-Zellen kommt (Abb.20 B, A). Im Gegensatz hierzu zeigte ein kleinerer Teil der Zellen eine gleichmäßigere Verteilung der Fusionsproteine mit besonders hoher

Konzentration in Zellkernnähe (Abb. 20 C). Zur besseren Beurteilung, in welchen Zellkompartimenten die Fusionsproteine vorhanden sind, wurde der endosomale Marker EEA1 verwendet. Dieser bindet an das FYVE-Protein EEA1, für welches eine Bindung an frühe Endosomen wiederholt nachgewiesen werden konnte (Stenmark et al. 1996, Mills et al. 1998, Stenmark und Aasland 1999). So sollte eine Einschätzung zu eben diesem Zellkompartiment ermöglicht werden. Der direkte Vergleich mit dem EEA1-Marker könnte, aufgrund der Gemeinsamkeit, dass sowohl *ZFYVE27*, als auch EEA1 eine FYVE-Domäne enthalten, ebenfalls genaueren Aufschluss über die Bedeutung der FYVE-Domäne von *ZFYVE27* geben. Beim Vergleich mit EEA1 konnte in HeLa-Zellen, die eher eine punktelle Verteilung von *ZFYVE27* zeigten, eine Überlagerung des Markersignals und des Signals des *ZFYVE27*-GFP-Fusionsproteins nachgewiesen werden. Zwei dieser Bereiche wurden in Abbildung 20 D, E und F mit Pfeilen markiert. Hingegen konnte bei der zellkernnahen Anreicherung des *ZFYVE27*-GFP-Fusionsproteins eine teilweise übereinstimmende Verteilung mit dem an das Endoplasmatische Retikulum bindenden Marker RTN1 (Mannan et al. 2005) gezeigt werden (Abb. 20 G, H, I). Bei der gleichzeitigen Transfektion von HeLa-Zellen mit dem GFP-*ZFYVE27*-Konstrukt und einem c-Myc-Spastin-Konstrukt war eine deutliche gemeinsame Lokalisation der beiden Proteine in rundlichen Strukturen im Zytoplasma sichtbar (Abb. 20 L).

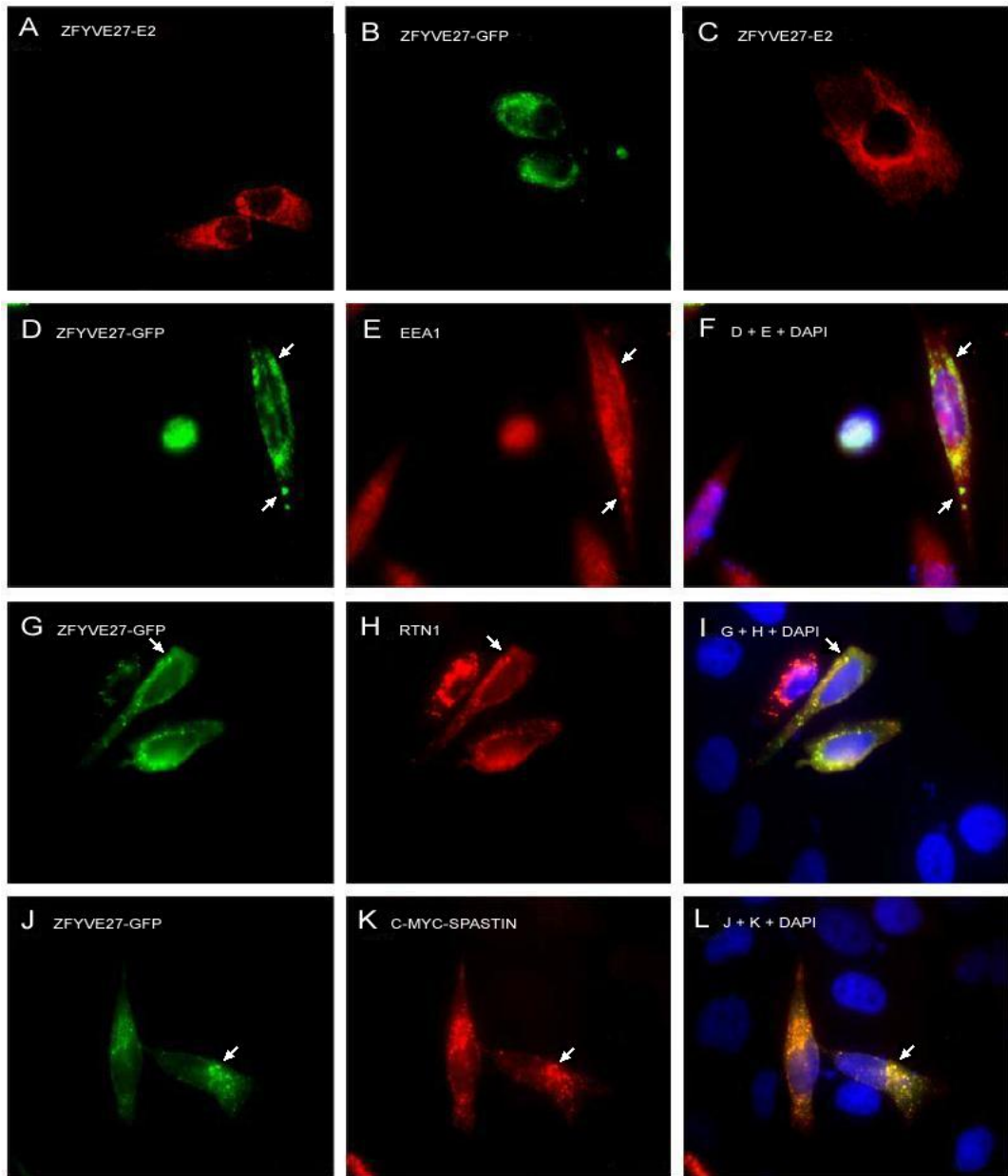


Abbildung 20: Co-Immunlokalisation von *ZFYVE27* in HeLa-Zellen

Die mikroskopischen Bilder zeigen die intrazelluläre Verteilung von *ZFYVE27*- und Spastin-Fusionsprotein, sowie die der Marker EEA1 (Endosomen), RTN1 (Endoplasmatisches Retikulum) und des Farbstoffes DAPI (Zellkern) in transfizierten HeLa-Zellen. Die beiden Antikörper EEA1 (E, F) und RTN1 (H, I) emittieren jeweils rotes und DAPI (F, I, L) blaues Licht. Das rote Signal des *ZFYVE27*-E2-Fusionsproteins zeigt in Bild A punktuelle Anreicherungen im Zytoplasma und in Bild C eher diffuse, kernnahe Anreicherungen. In den Bildern B, D, G und J zeigt das grüne Signal des GFP-*ZFYVE27*-Fusionsproteins jeweils eine klare punktuelle Verteilung im Zytoplasma mit Aussparung des Kerns. Bei den mit GFP-*ZFYVE27* transfizierten und zusätzlich mit dem EEA1-Marker behandelten Zellen zeigt das rote EEA1-Signal eine lokale, leicht diffuse Verteilung im Zytoplasma (E). Die Überlagerung der Signale zeigt in Bild F eine genaue Übereinstimmung einiger runder zytoplasmatischer Signalherde. In Bild H ist das rote Signal des RTN1-Markers in drei Zellen, jeweils mit leichten Unterschieden in der Intensität, zytosolisch an rundlichen Strukturen lokalisiert. Bei gemeinsamer Darstellung in Bild I zeigen sich teilweise lokale Überlagerungen des RTN1- und des GFP-Signals. Bei den mit GFP-*ZFYVE27* (J) und c-myc-Spastin transfizierten Zellen zeigt das c-myc-Spastin-Fusionsprotein ebenfalls eine punktuelle zytoplasmatische Verteilung (K), und die Überlagerung mit dem GFP-Signal zeigt teilweise eine Co-Lokalisation der beiden Proteine (L). Einzelne Bereiche, in denen eine Co-Lokalisation sichtbar ist, sind mit Pfeilen markiert.

3.3.2 Generierung von *ZFYVE27*-cDNA(c.572G>T)

Eine Untersuchung der Aminosäuresequenz von *ZFYVE27* mit dem SOSUI-Programm (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) zeigte, dass das *ZFYVE27*-Protein mehrere Transmembrandomänen enthalten kann. Die Varianten 2, 3 und 4 bilden demnach drei, die Variante 1 eine Transmembrandomäne. Weiterhin zeigte die Analyse mit dem SOSUI-Programm, dass der bei der Sequenzierung gefundene Basenaustausch c.572G>T in der kodierenden Sequenz der *ZFYVE27*-cDNA zu einer Verschiebung einer Transmembrandomäne führen könnte. Diese Veränderung der Primärstruktur führt möglicherweise zu einer Störung der intrazellulären Verteilung des Proteins und könnte dadurch die Ursache der HSP sein. Um dies zu kontrollieren, sollte ein GFP-*ZFYVE27*-Konstrukt erstellt werden, welches den Basenaustausch G zu T an Position 572 der kodierenden Sequenz enthält. Mit der Immunfluoreszenz-Methode könnte dann eventuell beurteilt werden, ob die putative Mutation zu einer Störung der physiologischen Verteilung des *ZFYVE27*(p.G191V)-Proteins führt.

Zur Generierung der mutierten cDNA wurde die schon in den pGem®-Teasy-Vektor klonierte *ZFYVE27*-cDNA verwendet. Es wurde eine PCR mit den Primern FLJ-MUT79 F, welcher die Veränderung c.572G>T enthält, und FLJ-ORF-R durchgeführt und eine weitere mit den Primern FLJ-ORF-F und FLJ-RT-Ex4-R. Die Primer wurden so gewählt, dass bei den beiden PCRs sich überlappende Amplifikate entstehen. In einer weiteren PCR wurden dann, zusammen mit den Primern FLJ-ORF-F und FLJ-ORF-R, die aufgereinigten Produkte der ersten beiden PCRs eingesetzt (s. Abb. 21). Nachdem das hierbei entstandene Amplifikat in den pGem®-Teasy-Vektor kloniert worden war, wurde ein Zellklon, der die cDNA mit der Veränderung enthielt, nach Sequenzierung ausgewählt. So konnte die *ZFYVE27*-cDNA, beginnend von Base 196 bis zu Base 1149, mit dem Basenaustausch c.572G>T hergestellt werden.

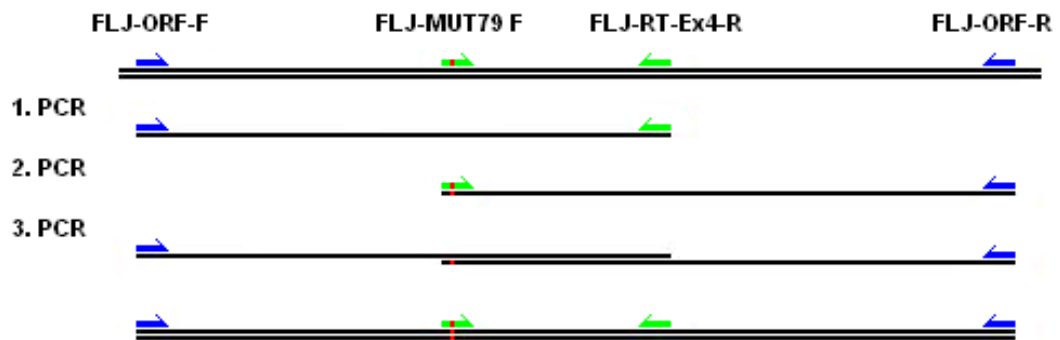


Abbildung 21: Generierung der veränderten *ZFYVE27*-cDNA

Das Schema zeigt die verwendeten Primer mit ihrer Bezeichnung in blau und grün über der schwarz dargestellten DNA. Die im Primer FLJ-MUT79-F enthaltene Veränderung ist rot dargestellt. Die Produkte der ersten und der zweiten PCR sind darunter dargestellt. Als letztes folgt die schematische Überschneidung dieser Produkte, die zum endgültigen Amplifikat der dritten PCR führt.

Anschließend wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III per PCR integriert und die cDNA wieder in den pGem®-Teasy-Vektor kloniert. Schließlich wurde die cDNA mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Hind*III in den pEGFP C1-Vektor kloniert. Das in den pEGFP C1-Vektor klonierte Fragment ist 0,958 kb groß und entspricht der *ZFYVE27*-cDNA von Base 199 bis Base 1152, enthält aber im Gegensatz zur normalen cDNA die putative Mutation. Dieses Konstrukt wurde mit GFP-*ZFYVE27*(p.G191V) bezeichnet. Mit ihm wurden HeLa-Zellen transfiziert und für die Co-Immunlokalisations-Analyse verwendet.

3.3.3 Immunfluoreszenz-Analyse von *ZFYVE27*(p.G191V) in HeLa-Zellen

GFP-*ZFYVE27*(p.G191V) zeigte mehrere deutlich unterschiedliche Verteilungsmuster. In einigen HeLa-Zellen war eine Verteilung ähnlich der des normalen *ZFYVE27* mit sehr punktuellen Anreicherungen des grünen GFP-Signals zu erkennen (Abb. 22 D). Einige Zellen ließen dies ebenfalls noch erahnen, doch schien das Konstrukt in diesen insgesamt homogener im Zytoplasma verteilt zu sein (Abb. 22 A). Ein weiterer Teil der Zellen zeigte jedoch eine markant andere Verteilung des Fusionsproteins. Das GFP-Signal war in manchen der HeLa-Zellen deutlich diffuser, mit größter Konzentration perinukleär und

überdeckte teilweise den Zellkern (Abb. 22 B) oder es war, wie in Abbildung 22 Bild C, eine verhältnismäßig gleichmäßige Verteilung über den gesamten Zellkörper zu erkennen. In den gleichzeitig mit GFP-*ZFYVE27*(p.G191V) und c-Myc-Spastin transfizierten Zellen zeigte das rote Signal des c-Myc-Spastins viele lokal konzentrierte Anreicherungen im Zytoplasma (Abb. 22 E). Das veränderte *ZFYVE27*-Fusionsprotein hingegen zeigt im direkten Vergleich keine so klare punktuelle Konzentration (Abb. 22 D), und die Überlagerung der beiden Signale zeigte nur geringe Übereinstimmungen, die hier mit Pfeilen markiert sind.

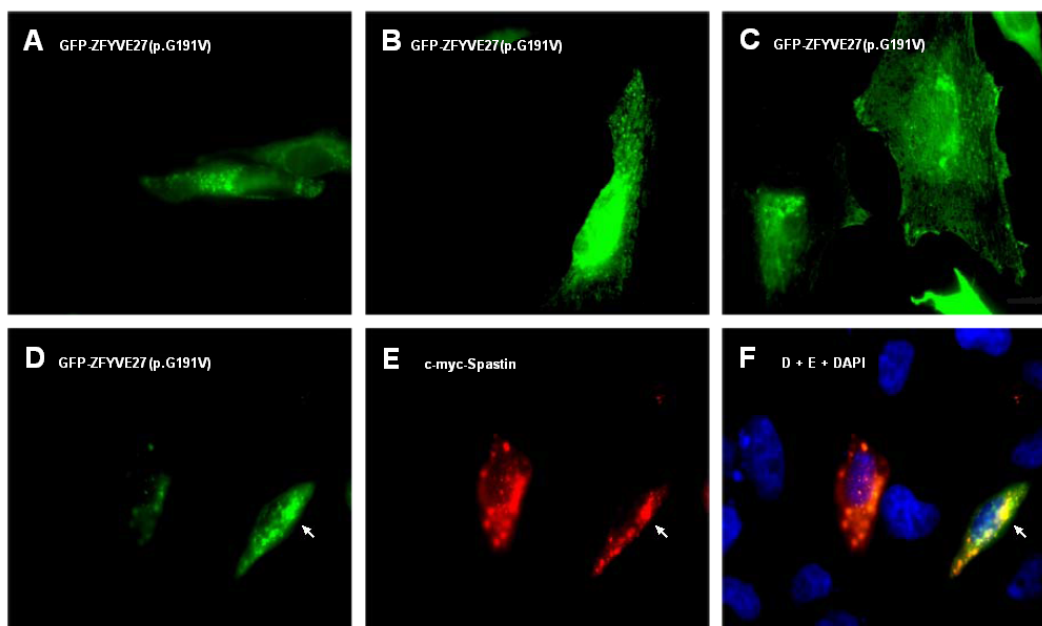


Abbildung 22: Co-Immunlokalisation von *ZFYVE27*(p.G191V) in HeLa-Zellen

Die mikroskopischen Bilder zeigen die intrazelluläre Verteilung des GFP-*ZFYVE27*(p.G191V)- (grün) und des c-Myc-Spastin-Fusionsproteins (rot), sowie des Zellkernmarkers DAPI (blau).

Bei ungefähr 50% der Patienten mit autosomal dominanter HSP kann durch Sequenzierung der Gene *SPG3* und *SPG4* eine Mutation gefunden werden. Neben Mutationen im *ZFYVE27*-Gen wäre das Vorhandensein von großen Deletionen in *SPG3* und *SPG4*, welche durch das normale Sequenzierungsverfahren nicht erkannt werden, eine weitere Erklärung hierfür. Außerdem gibt es Berichte über Familien, in denen die HSP durch Deletionen im *SPG4*-Gen verursacht wird (Bönsch et al. 2003, Beetz et al. 2006, Erichsen et al. 2007). Deswegen wurde in

dieser Arbeit das *SPG4*-Gen von HSP-Patienten unter Verwendung der Real-Time-PCR auf Deletionen untersucht.

3.4 Deletionssuche im *SPG4*-Gen mit Hilfe der Real-Time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Real-Time-PCR-Methode (2.2.11, S. 34) für das *SPG4*-Gen etabliert werden, um bei HSP-Patienten Deletionen im *SPG4*-Gen detektieren zu können. Die sehr empfindliche Methode der Real-Time-PCR konnte für 15 der 17 Exons von *SPG4* etabliert werden. Für die Exons 6 und 7 konnten keine Reaktionsbedingungen gefunden werden, mit denen reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden konnten. Sie wurden deswegen in dieser Arbeit nicht untersucht.

3.4.1 Ergebnisse der Real-Time-PCR-Untersuchung

Von den insgesamt 91 untersuchten HSP-Patienten, bei denen durch Sequenzierung eine Mutation im *SPG3*- und im *SPG4*-Gen ausgeschlossen wurde, zeigten sieben eine Verringerung der relativen DNA-Kopienanzahl. Bei den Patientenproben 19544, 19545, 19549, 21962, 21963 und 21969 war die DNA-Kopienzahl des Exons 16 im Vergleich mit dem Kontroll-Amplifikat deutlich vermindert (s. Abb. 23). Die Untersuchungen ergaben bei diesen Patienten für Exon 16 eine relative Kopienzahl von ungefähr 0,5, während die Werte der anderen untersuchten Exons um 1 lagen. Die genauen Werte sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Als Kontrollproben wurde die DNA von zwei nicht an HSP erkrankten Menschen verwendet, welche hier mit WT-1 und WT-2 bezeichnet werden. Im Vergleich mit diesen Kontrollen und den anderen *SPG4*-Exons betrug die Verminderung der DNA-Kopienzahl circa 50 Prozent.

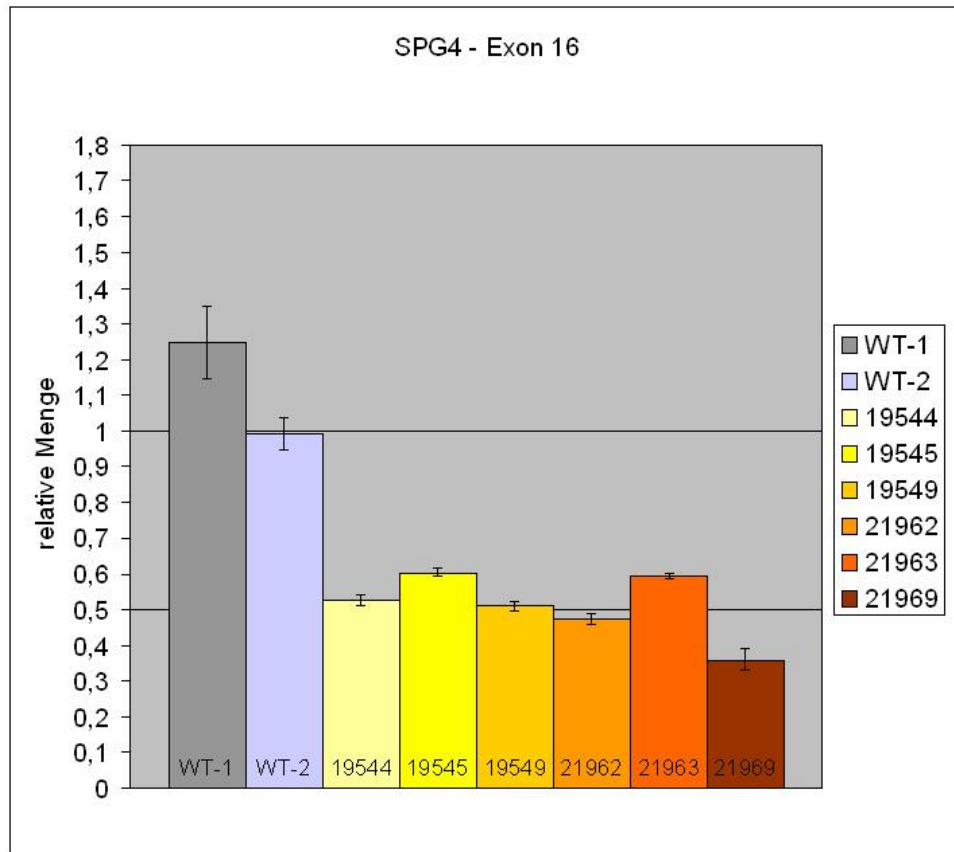


Abbildung 23: relative DNA-Kopienzahl SPG4 Exon 16

Graphische Darstellung der Real-Time-Ergebnisse der Patienten mit verminderten Werten für das Exon 16 und der Kontrollproben (WT-1, WT-2). Auf der Y-Achse ist die relative DNA-Kopienanzahl angegeben. Diese ist das Produkt aus der Division der Konzentration des jeweiligen Exons 16 und der Konzentration des Kontroll-Exons. Auf der X-Achse sind die Patienten-Proben und die beiden Kontroll-Proben nebeneinander als Balken dargestellt.

	WT-1	WT-2	19544	19545	19549	21962	21963	21969
Probe $C_{SPG4\text{-Exon 16}}/C_{TcT}$	1,24	0,99	0,52	0,60	0,50	0,47	0,59	0,36

Tabelle 2: relative Kopienzahl SPG4 Exon 16

Die Patientenprobe 21940 zeigte bei den Untersuchungen eine verminderte DNA-Kopienzahl der Exons 14, 15, 16 und 17 (s. Abb. 24). Die relative Kopienzahl der Exons 14, 15, 16 war im Vergleich mit der Kontrollprobe WT-2 und den anderen SPG4-Exons der Probe um ungefähr 50 Prozent reduziert. Exon 17 zeigte eine Verringerung um 24 Prozent. Um eine putative Deletion einzugrenzen, wurde ein weiteres Amplifikat untersucht, welches ungefähr 2 kb in 3'-Richtung des Exon

17 liegt. Dieses als 17-X bezeichnete Amplifikat zeigte eine relative DNA-Kopienzahl von etwa „1“. Tabelle 3 gibt die genauen Zahlenwerte wieder.

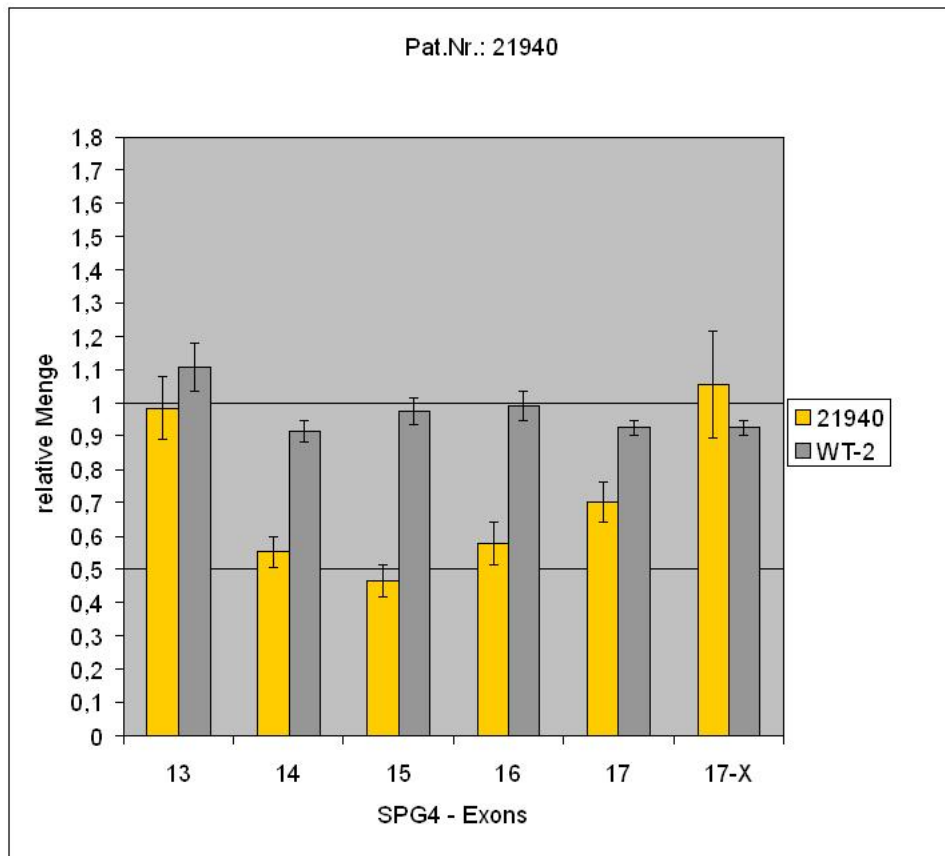


Abbildung 24: Real-Time-PCR-Ergebnisse - Patient 21940 im Vergleich mit WT-2

Graphische Darstellung der Real-Time-Ergebnisse des Patienten 21940 im Vergleich mit der Kontroll-Probe WT-2. Auf der Y-Achse ist die relative DNA-Kopienanzahl angegeben. Diese ist das Produkt aus der Division der Konzentration des jeweiligen Exons und der Konzentration des Kontroll-Exons. Auf der X-Achse sind die Werte der Exons 13 bis 17 und für das Amplifikat 17-X der beiden untersuchten Proben nebeneinander als Balken dargestellt.

Exon	13	14	15	16	17	17-X
WT-2 (<i>cSPG4</i> -Exon/ <i>cTcT</i>)	1,10	0,91	0,97	0,99	0,92	0,92
21940 (<i>cSPG4</i> -Exon/ <i>cTcT</i>)	0,98	0,55	0,46	0,57	0,70	1,05

Tabelle 3: relative Kopienzahl der Exons 13, 14, 15, 16, 17, 17-X von WT-2 und Probe 21940

Bei drei der 91 Patienten konnten keine verwertbaren Ergebnisse erzielt werden, was am ehesten durch die degradierte DNA zu erklären ist. Um die Ergebnisse zu kontrollieren, wurde bei den sieben Patienten mit möglicherweise vorliegender Deletion das Experiment wiederholt, wobei sich die Ergebnisse bestätigten.

3.4.2 „Long-Range“-PCR

Um das Ergebnis der Real-Time-PCR zu verifizieren, wurde eine PCR mit Primern durchgeführt, die vor Exon 15 (Intron 14) und hinter Exon 17 liegen und so sowohl eine Amplifikation des normalen ungefähr 12 kb großen Wildtyp-Allels, als auch des durch eine eventuell vorliegende Deletion verkürzten Allels ermöglichen. Als Kontrolle wurde die DNA eines Menschen ohne HSP-Erkrankung verwendet, hier als WT-1 bezeichnet. Zusätzlich wurde eine Reaktion als negative Kontrolle ohne DNA durchgeführt („0-Kontrolle“).

Bei der gelelektrophoretischen Auftrennung der Produkte konnte in der Kontrollprobe WT-1 eine einzelne ungefähr 12 kb große Bande dargestellt werden. In den Proben 19544 und 21969 konnte neben einem 12 kb großen Amplifikat ein etwa 10 kb großes Amplifikat nachgewiesen werden. In Probe 19549 waren zusätzlich mehrere kleinere Banden mit einer Größe von 6 bis 11 kb vorhanden. Probe 21962 zeigte mehrere Banden im Bereich von 1 bis 3 kb, aber keine Bande im Bereich um 12 kb. Die „0-Kontrolle“ enthielt kein Amplifikat (s. Abb. 25 und 26).

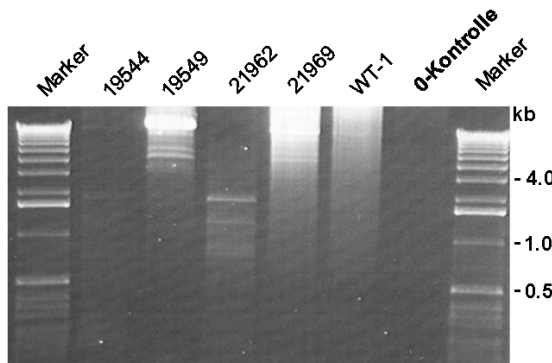


Abbildung 25: „Long-Range“-PCR

Agarosegel mit den Amplifikaten der „Long-Range“-PCRs. Neben dem Größenstandard (Marker) links und rechts wurden die Proben und die „0-Kontrolle“ entsprechend der Beschriftung über den Spuren aufgetragen.

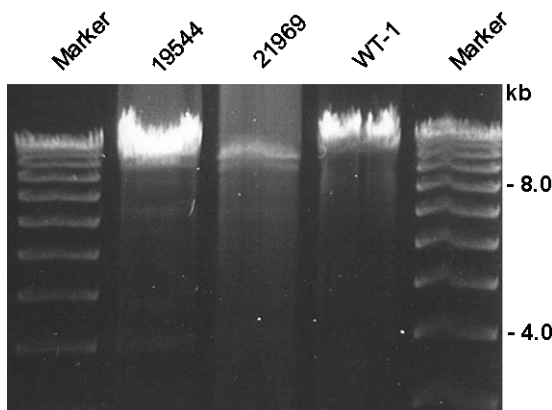


Abbildung 26: „Long-Range“-PCR – 19544, 21969, WT-1

Agarosegel mit Produkten der „Long-Range“-PCR. Nebeneinander aufgetragen wurden der Größenstandard (Marker), die Proben 19544 21969, WT1 und der Größenstandard (Marker). Über den Spuren ist jeweils angegeben, von welchem Patienten die DNA für den Ansatz stammt.

3.4.3 RT-PCR

Die „Long-Range“-PCR (2.2.6.5, S. 27) lieferte keinen eindeutigen Beweis für das Vorliegen von Deletionen, da neben dem gewünschten Amplifikat auch immer unspezifische Produkte nachweisbar waren. Es sollte nun mit Hilfe der RT-PCR kontrolliert werden, ob eine mögliche Deletion auf RNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Hiermit würde einerseits bewiesen werden, dass eine Deletion vorliegt, als auch geklärt werden, ob es zu einer effektiven Expression des mutierten Allels kommt. Es wurde RNA aus dem Blut der Patienten gewonnen (2.2.3.1, S. 19) und für eine Reverse-Transkriptase-Reaktion mit anschließender PCR verwendet. Hierbei wurden die Primer *SPG4*-RNA-F4 und *SPG4*-RNA-R2 eingesetzt, die den Bereich von Exon 14 bis Exon 17 einschließen und so bei einer Deletion in einem Allel zwei verschieden große Amplifikate erzeugen sollten. Als Kontrolle wurden RT-PCRs mit der RNA von zwei Menschen, bei denen keine HSP-Erkrankung vorliegt, durchgeführt. Diese werden hier als „WT-1“ und „WT-2“ bezeichnet.

Alle untersuchten Proben ergaben ein ungefähr 1,4 kb großes Fragment (s. Abb. 27). In den Patientenproben 21962 und 21963 ließ sich bei der optischen Kontrolle zusätzlich ein kleineres Amplifikat vermuten, welches in Abbildung 27 mit weissen Pfeilen markiert ist. Der Versuch, dieses nach Gelextraktion in pGem®-Teasy zu klonieren und zu sequenzieren gelang wiederholt nicht.

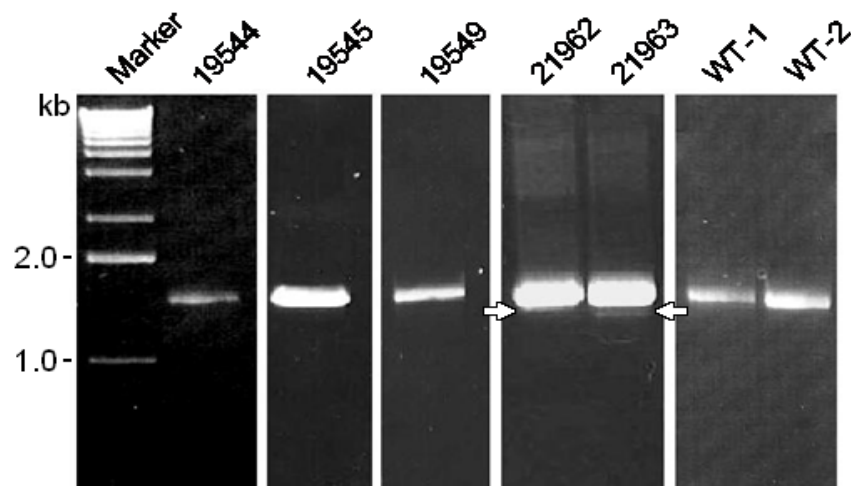


Abbildung 27: RT-PCR – SPG4 Deletions-Kandidaten

Agarosegel mit den Produkten der RT-PCRs. Über den Spuren ist angegeben, welche Probe aufgetragen wurde.

3.4.4 Southernblot

Die bisherigen Untersuchungen lieferten keine eindeutige Bestätigung der Ergebnisse der Real-Time-PCR, deswegen sollten die Deletionen mit Hilfe der Southernblot-Methode (2.2.9.1, S. 32) endgültig auf DNA-Ebene verifiziert werden. Hierzu wurde mittels des Programms „webcutter“ (<http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/>) eine Karte der Restriktionsenzym-Schnittstellen erstellt und anhand dieser die Enzyme *EcoR1* und *Stu1* für die Southernblot-Analyse gewählt (s. Abb. 28).



Abbildung 28: Restriktions-Schnittstellen *EcoR1* und *Stu1*

Die Abbildung zeigt die ungefähre Lage der Restriktionsenzym-Schnittstellen (grün), der Sonde (blau) und der eventuell vorliegenden Deletion (rot) im Bezug zum SPG4-Gen. Exons sind blau und Introns gelb dargestellt.

Das Restriktionsenzym *EcoR1* schneidet die humane DNA u.a. im Bereich des Introns 13 und im Intron 16, so dass bei Vorliegen des normalen, nicht deletierten Gens ein ungefähr 9 kb großes Fragment entsteht. Die Schnittstellen von *Stu1* liegen in Intron 13 und in Exon 17 und lassen bei Restriktion des normalen *SPG4*-Gens ein ungefähr 12 kb großes Fragment entstehen. Als Sonde wurde bei diesem Southernblot ein 590 bp großer Abschnitt des Introns 14 unter Verwendung der Primer SB-Sonde-F und SB-Sonde-R amplifiziert. Da die Taqman-Untersuchungen keinen Hinweis auf eine Deletion von Exon 15 geliefert hatten, sollte die Sonde auch bei Vorliegen einer Deletion an das entsprechende Fragment binden können. Von jeder Patienten-Probe wurde ein Ansatz mit *EcoR1* und ein Ansatz mit *Stu1* restringiert und untersucht. Zusätzlich wurde eine DNA-Probe von einem nicht an HSP erkrankten Menschen untersucht. Diese wurde hier als WT-1 bezeichnet.

Die radioaktive Sonde markierte bei Restriktion mit *EcoR1* in den Proben WT-1, 19544, 25950, 19549, 21962 und 21963 ein einzelnes ungefähr 9 kb großes Fragment (s. Abb. 29). Bei Restriktion mit *Stu1* konnte in denselben Proben eine Bindung der Sonde an ein einzelnes ungefähr 12 kb großes Fragment nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Probe 19545 konnte auch bei

Wiederholung des Experiments keine Bindung der Sonde nachgewiesen werden. Keine Probe zeigte weitere Fragmente und somit eindeutig auch keine Hinweise auf eine vorliegende Deletion.

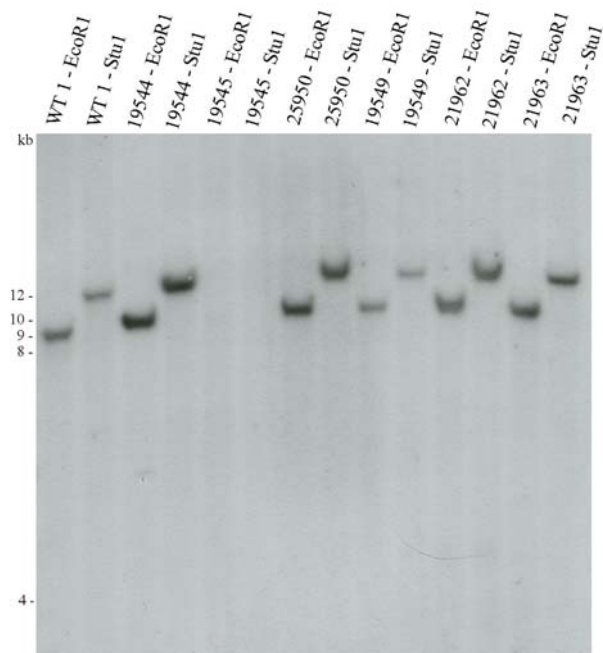


Abbildung 29: Southernblot

Röntgenfilm, der das Ergebnis der Hybridisierung zeigt. Die Spuren enthalten der Beschriftung entsprechend die mit *EcoRI* und *StuI* restringierten Patientenproben. Der Größenstandard ist nicht mit abgebildet.

4. Diskussion

4.1 Problemstellung

Die hereditären spastischen Paraplegien bilden eine heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen, für welche bisher 41 Loci identifiziert werden konnten (Salinas et al. 2008), wobei 70 bis 80 Prozent aller HSP-Erkrankungen autosomal-dominant vererbt werden. Bei ungefähr 50 Prozent der autosomal-dominanten Krankheitsfälle kann eine Mutation in den Genen *SPG3* oder *SPG4* als Ursache der HSP nachgewiesen werden. Für einen großen Teil der Fälle verbleiben die für die Krankheit verantwortlichen Gene unbekannt. Eine der möglichen Erklärungen für diese bisher nicht geklärten Fälle könnte in Mutationen anderer Gene liegen, welche durch eine Interaktion mit dem von *SPG4* codierten Protein Spastin die Funktion des Spastins verändern und so die Entstehung der Krankheit auslösen. Mit der Y2H-Methode wurde nach Interaktionspartnern des Spastins gesucht und hierbei unter anderem *ZFYVE27* identifiziert (Mannan et al. 2006). Das Ziel dieser Arbeit ist die Überprüfung der Interaktion zwischen dem hypothetischen Protein *ZFYVE27* und Spastin und die Identifizierung von Mutationen im *ZFYVE27*-Gen bei AD-HSP-diagnostizierten Patienten.

ZFYVE27 ist noch nicht untersucht worden und zu Beginn dieser Arbeit lagen keine Erkenntnisse über das *ZFYVE27*-Gen und das entsprechende Protein vor. Es sollten deswegen grundlegende Informationen über den Aufbau, die Expression und intrazelluläre Verteilung von *ZFYVE27* gewonnen werden, um so eventuell Rückschlüsse auf seine Funktion ziehen zu können. Eine weitere naheliegende Ursache für die AD-HSP könnten Deletionen in den Genen *SPG3* und *SPG4* sein, welche durch die angewandte Sequenzanalyse nicht nachgewiesen werden. Daher sollte das *SPG4*-Gen bei AD-HSP-diagnostizierten Patienten mit Hilfe der Real-Time-PCR-Methode auf Deletionen hin untersucht werden

4.2 *ZFYVE27*

Das hypothetische Protein *ZFYVE27*, das je nach Spleißvariante aus 318 bis 416 Aminosäuren besteht, enthält im N-terminalen Bereich eine FYVE-Domäne und nach Analyse-Ergebnissen mit dem SOSUI-Programm (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) ein oder drei Transmembrandomänen im C-terminalen-Bereich. Bisher wurden beim Menschen mehr als 27 Proteine mit einer solchen FYVE-Domäne identifiziert. Die strukturell ähnlichen Proteine können über die FYVE-Domäne mit PI3P Kontakt aufnehmen und aufgrund dessen an Membranstrukturen der Zelle gebunden sein. Besonders an Endosomen scheint ein Großteil der FYVE-Proteine zu binden und so wird ihnen, ihrer Lokalisation entsprechend, eine Funktion bei intrazellulären Transportprozessen zugeschrieben. Bekannt ist aber auch eine Beteiligung an der Regulation des Zytoskeletts und bei der Vermittlung von Signalkomplexen. Außergewöhnlich für ein Mitglied der FYVE-Proteinfamilie ist bei *ZFYVE27* das Vorkommen mehrerer hydrophober Transmembrandomänen, die in dieser Form bei keinem der bisher bekannten FYVE-Proteine nachgewiesen werden konnten. Obwohl schon eine Reihe der FYVE-Proteine Bestandteil vielfacher Untersuchungen war, lässt sich für die Familie dieser Proteine keine einheitliche Einteilung finden. Zu den bereits gut charakterisierten fügen sich immer weitere, neue und teilweise sehr unterschiedliche Mitglieder hinzu. Um dennoch eventuell Rückschlüsse auf die Eigenschaften, Funktionen und Aufgaben von *ZFYVE27* ziehen zu können, sollen im folgenden Teil die wichtigsten Vertreter der FYVE-Familie dargestellt und Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten mit *ZFYVE27* aufgezeigt werden.

4.2.1 FYVE-Finger-Proteinfamilie

Die Bezeichnung der FYVE-Domäne wurde zum ersten Mal 1996 verwendet, als Stenmark et al. das Protein EEA1 untersuchten und eine Zinkionen-bindende Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins identifizierten. Neben EEA1 konnte diese Domäne auch in den Proteinen Fab1p, YOTP und Vps27p nachgewiesen werden und so wurden die Anfangsbuchstaben dieser vier Proteine für die Namensgebung verwendet. Bis heute konnten beim Menschen 27, im Fadenwurm (*C. elegans*) 13 und in Hefe (*S. cerevisiae*) 5 FYVE-Proteine

identifiziert werden. Während einige Bereiche konserviert blieben, weitete sich im Laufe der Evolution die Verwendung dieser Proteine aus und es entstanden Moleküle mit unterschiedlichsten Aufgaben. Entsprechend vielfältig sind die funktionellen Gruppen, die neben der FYVE-Domäne auftreten, aber auch die Eigenschaften der einzelnen FYVE-Domänen an sich. Die Tabelle 4 zeigt eine Übersicht über die FYVE-Proteinfamilie mit ihren bekanntesten Vertretern.

Bezeichnung	Struktur	Funktion
EEA1 Rabenosyn-5/ Vac1p	IQ-Motiv, ZFIRE finger, coiled-coil	Rab-Effektoren
Rabip4	RUN	
FCCD1	RUN, coiled-coil	?
ANKHZN	BTB, Ankyrin-Repeats	Endosom-Zytoskelett Interaktion
FENS-1	WD-Repeats	Endozytose
MTMR3 FYVE-DSP	PI3P-Phosphatase	Autophagozytose-Regulation
Fgd1, 2, 3/ YOTB Frabin	DH, PH	Actin Zytoskelett-Steuerung
SARA Endofin	Smad, TGF β -binding	Rezeptor-Signalvermittlung
PIKfyve/ Fab1p	PI3P 5-Kinase, DEP, Chaperon	MVB/Membran-Recycling
Hrs/ Vps27p	VHS,UIM, coiled-coil, Clathrin-box	Endosom-Lysosom-Vermittlung Clathrin/MVB-Ausbildung
DFCP1 (TAFF1)	Doppel-FYVE-Domain	?
ZFYVE27	Transmembran-Domäne	?

Tabelle 4: FYVE-Protein-Familie

Die Tabelle zeigt eine Auswahl der bekanntesten FYVE-Proteine mit ihrer Bezeichnung, ihren funktionellen Domänen und ihrer vermuteten Funktion. Die Bezeichnung der Proteine, die gleichfalls in *H. sapiens*, *C. elegans* oder *S. cerevisiae* nachgewiesen werden konnten, sind durch einen / getrennt.

Die FYVE-Domäne ist durch vier streng konservierte CxxC Bereiche definiert, welche für die Bindung von Zinkionen verantwortlich sind. Insgesamt besteht sie aus 60-80 Aminosäuren, in denen die funktionellen Bereiche WxxD, R(R/H)HHR und RVC eine wichtige Aufgabe für ihre Funktion erfüllen (Stenmark et al. 2002, Blatner et al. 2004, Hayakawa et al. 2004). Diese ebenfalls konservierten Bereiche wurden so in sehr ähnlicher Form in allen FYVE-Domänen gefunden und stehen bei der Bindung an PI3P in direktem Kontakt mit der Kopfgruppe des Inositols. In Abbildung 30 sind diese für die Eigenschaften der Domäne entscheidenden Bereiche blau markiert, außerdem zeigt die Abbildung 30 eine Übersicht über die weiteren Strukturmerkmale und den genauen Aufbau der Domäne. Untersuchungen zur Bindung an PI3P zeigten, dass ein als „Turretloop“ bezeichneter Bereich die Bindungsfähigkeit an membrangebundenes PI3P steigert, indem er in direkte Wechselwirkung mit der Membran tritt (Misra und Hurley 1999, Mao et al. 2000). Die Membranbindungsfähigkeit der einzelnen FYVE-Domäne ist zwar sehr selektiv, jedoch bei den meisten FYVE-Proteine nicht stark genug, um in vivo eigenständig für die Bindung an endosomale Strukturen zu sorgen. Die Bindungsfähigkeit der Moleküle wird deswegen durch unterschiedliche Mechanismen erhöht. Einige FYVE-Proteine besitzen hierzu zusätzlich andere funktionelle Gruppen, die ebenfalls membranbindende Eigenschaften besitzen oder aber mehrere FYVE-Domänen führen durch ihre synergistische Wirkung zu einer Bindung an die Membran. Dabei können diese in einem Molekül vorhanden sein, wie bei DFCP1, oder aber in 2 gleichen FYVE-Proteinen, die sich zu einem Dimer zusammenfügen (Derubeis et al. 2000, Raiborg et al. 2001).

Es hat sich gezeigt, dass die Fähigkeit der FYVE-Proteine mit sich selbst Dimere auszubilden verbreitet ist und, wie bei EEA1, durch sogenannte coiled-coil-Bereiche begünstigt werden kann (Stenmark et al. 2002). Weiterhin konnte innerhalb der FYVE-Domäne ein als „Dimerinterface“ bezeichneter Bereich identifiziert werden, welcher ebenfalls die Homodimer-Bildung unterstützt (Dumas et al. 2001). Durch die gemeinsame Wirkung der FYVE-Domänen eines solchen Dimers erhöht sich die Bindungsstärke soweit, dass in einigen Fällen auch ohne

Wirkung anderer funktioneller Gruppen eine endosomale Lokalisation erreicht wird (Hayakawa et al. 2004).

	WxxD	"Turretloop" R(R/H)HHR	"Dimerinterface" RVC
EEA1	RKWAEDNEVQNCMA	CGKG-FSVT---VRFHHCRCQGNIFCAECSAKNALT-----	PS S K K P V R V C D A C F N
Rabenosyn-5	VPWVHIDQDVVPC	PDCCGNK-FSIR---NRFHHCRLCGSIMCKKCMELISLP<42>VLDEKDDDRIRCC	THCKD
Rabip4	LVWLKDKKETHCKL	CEKE-FSLS---KRFHHCRCNGEIFCNA	CSDNELPL-----PS S P K P V R V C D S C H A
FENS-1	PQWL-E--SDSCQKCEQPF	FWNI<10>LRQHHCRCGQAVCGKCSSKRSSY-----	PVMGFQEFQVRFVCDSCYD
MTMR3	TRWLPDHLAAHCYAC	DSA-FWLA---SRFHHCRCNGVFCSSCCNQKVPV-----	PS QQLFEPSPRVCKSCYS
Fgd1	PTFIREKEVTMCMRC	QEP-FNSIT---KRFHHCRCAGHVVC	GKSEFRA RL-----VYDNRSRNEVCTDCYV
SARA	PVWVPDSQA PNCMKC	EAR-FTFT---KRFHHCRCAGKVFCA	CCSLKCKL-----LYMDRKEARVVCVICH
Endofin	PTWVFDSEA PNCMNC	QVK-FTFT---KRFHHCRCAGKVFCA	GVCCNRKCKL-----QYLEKEARVVCVVCYE
PIKfyve	QYWMPDSQKCEYDC	SEK-FTTF---RFRHHCRLCGQIFCSRCCNQEI	PG-----KFMGYTGDLRAC
Hrs	PDWV-D--AEECHRC	RVQ-FGVM---TRFHHCRCAGQIFCGKCSSKYSTI-----	PKFGLKEKVRVCEPCYE
mFrabin	PRWIRDNEVTMCMCKES	-FNAL T---RFRHHCRCAGHVVCWKCSDYKAL	QL-----EYDGGRLNKVCKDCYQ
ZFYVE27	RKRYPTNIFGNC	TGCSAT-FSVL---KRRRSCNCGNSFC	SRCCSFKVPK<4>ATAPEAQRETVFVCA
	CxxC	CxxC CxxC	CxxC

Abbildung 30: Struktureller Aufbau der FYVE-Domäne

Die Grafik zeigt die Aminosäuresequenz einiger FYVE-Domänen. Die konservierten und für die Funktion entscheidenden Bereiche sind farblich kenntlich gemacht - die zinkionen-bindenden Cysteine hellblau, die direkt mit PI3P in Kontakt stehenden Bereiche blau, das „Dimerinterface“ gelb und der „Turretloop“ grün.

Insgesamt lassen die Untersuchungen der FYVE-Domänen darauf schließen, dass durch das Zusammenspiel vieler einzelner Bereiche und unterschiedlicher Mechanismen eine Feinregulierung der FYVE-Proteine ermöglicht wird. Schon geringe Unterschiede in den funktionellen Bereichen der FYVE-Domäne (WxxD, R(R/H)HHR, RVC, „Turretloop“, „Dimerinterface“) und den begleitenden funktionellen Domänen können zu deutlichen Veränderungen der Bindungseigenschaften führen. Es konnte gezeigt werden, dass die FYVE-Domänen nur bei ganz bestimmten Bedingung an Membranen binden und so eine Art des Ein- und Ausschaltens möglich ist, welches u. a. von der Phosphoinositol-Konzentration, dem pH-Wert oder der Konformation des Proteins abhängt (Lee et al. 2005).

4.2.1.1 EEA1

Dieses konservierte Protein ist mit Rab5-GTP und einem Transferrin-Rezeptor an frühen Endosomen co-lokalisiert (Mu et al. 1995) und enthält neben der FYVE-Domäne im C-terminalen Bereich eine als IQ-Motiv bezeichnete Rab-5-bindende, funktionelle Gruppe (Stenmark et al. 1996). Eine weitere Rab-5-bindende Sequenz findet sich im N-terminalen Bereich. Während die Bindung von FYVE an Membranstrukturen selektiv über PI3P erfolgt, bindet das IQ-Motiv selektiv an

Rab-5-GTP. Die Eigenschaften dieser beiden funktionellen Gruppen führen zu einer sehr selektiven Bindung von EEA1 an junge Endosomen, da nur hier PI3P und Rab-5 in ausreichend hoher Konzentration zu finden sind (Wiedemann und Cockcroft 1998). Es konnte weiter gezeigt werden, dass trotz der Kombination der Bindungsstellen die Fähigkeit an Endosomen zu binden davon abhängig ist, dass EEA1 mit sich selbst Dimere ausbilden kann (Callaghan et al. 1999). Funktionell konnte für EEA1 eine Aufgabe bei der Fusion von Endosomen nachgewiesen werden (Mills et al. 1998). Dabei könnte EEA1 möglicherweise über das C-terminal gelegenen IQ-Motiv und die FYVE-Domäne zunächst an junge Endosomen binden und dann über die N-terminal gelegene Rab-5-Bindungsstelle Kontakt zu einem anderen Endosom aufnehmen (Stenmark und Aasland 1999).

4.2.1.2 PIKfyve/Fab1p

Zu dem in der Hefe vorkommenden Fab1p gibt es bei den Säugetieren das homologe PIKfyve. Beide besitzen neben der im N-terminalen Bereich liegenden FYVE-Domäne einen Bereich mit Phosphoinositol-Kinase-Aktivität (Shisheva et al. 1999, Sbrissa et al. 1999). Daneben enthält PIKfyve im mittleren Bereich noch weitere bisher wenig bekannte funktionelle Bereiche. Ähnlich den Eigenschaften von EEA1 konnte für PIKfyve auch eine Bindung über PI3P an membranöse Strukturen festgestellt werden, es wurde aber eine Assoziation mit eher älteren Endosomen nachgewiesen. Die Bindung erfolgt sowohl über die FYVE-Domäne als auch durch die katalytische Domäne, wobei die Affinität der Kinase-Bindung deutlich geringer ist (Sbrissa et al. 2002). PIKfyve scheint über die PI-Kinase-Aktivität an der Reifung von Endosomen beteiligt zu sein, jedoch ist besonders die Funktion und Regelung der DEP- und HSP-Chaperon-Domäne noch ungeklärt (Shisheva 2008).

4.2.1.3 Hrs/ Vps27p

Hrs, eines der wenigen FYVE-Proteine, bei dem die FYVE-Domäne im C-terminalen Molekülbereich liegt, enthält eine VHS-Domäne, eine clathrin-bindende Domäne, eine coiled-coil-Region und einen mit Ubiquitin interagierenden Bereich. Auch für Hrs wurde eine deutlich Co-Lokalisation mit

EEA1 an jungen Endosomen nachgewiesen (Komada und Soriano 1999; Raiborg et al. 2001). Stahelin et al konnten durch Röntgenkristall-Untersuchung an Vps27p und dem dazu homologen Hrs zeigen, dass die Proteine als Dimere an zwei membrangebundene PI3P binden (2002). Sie stellten gleichfalls fest, dass der erste Kontakt über Lys181 und Lys182 aufgenommen wird und dann der Rest der Domäne möglicherweise durch eine Konformationsänderung in die Membran „eintaucht“. Es scheint, als ob Hrs hauptsächlich als Rekrutierungsstelle für andere Proteine an den jungen Endosomen fungiert und so eine Rolle bei der Koordinierung der Endosomen und bei der Ausbildung von MVB einnimmt (Bache et al. 2003).

4.2.1.4 Frabin, Fgd1-3 / YOTB

Dieser Gruppe von FYVE-Proteinen ist neben der FVYE-Domäne gemein, dass sie C-terminal zwei membranbindungs-fähige PH-Domänen und eine DH-Domäne enthalten, welche eine Funktion bei der Regelung des GTP-Haushalts besitzt. Die Unterschiede zwischen ihnen liegen im N-terminalen Bereich, wo Fgd1 einen prolinreichen Bereich enthält, mit dem es über einen Interaktionspartner an F-Aktin binden kann, wohingegen die bei Frabin dort vorhandenen FAB-Domäne direkt an F-Aktin bindet. Dementsprechend konnte für diese Gruppe eine cytoskelettsteuernde Funktion nachgewiesen werden (Nakanishi und Takai 2008).

4.2.1.5 SARA/Endofin

Sowohl für SARA als auch für das sehr ähnliche Endofin konnte eine funktionelle Verbindung zu Signalvermittlungsprozessen hergestellt werden. Diese beiden FYVE-Proteine können über eine entsprechende Bindungsstelle an TGF β -Rezeptoren binden und fungieren, wohl über die zusätzliche Bindung von Smad-Proteinen, als Regulatoren einer TGF β -Signalkette. Immunfluoreszenzanalysen haben auch für diese beiden FYVE-Vertreter eine intrazelluläre Lokalisation an jungen Endosomen ergeben. Während für SARA eine Bindung von Smad 2 und 3 nachgewiesen wurde, scheint Endofin mit Smad 4 zu interagieren (Tsukazaki et al. 1998, Chen et al. 2007).

4.2.2 Eigenschaften von *ZFYVE27*

4.2.2.1 Expression in *Homo sapiens* und *Mus musculus*

In den zur Expression von *ZFYVE27* durchgeführten Untersuchung konnte beim Menschen auf RNA-Ebene, von den 4 theoretisch bestehenden Spleißvarianten, nur die 2751 bp große Variante 1 und diese auch nur im Gehirn nachgewiesen werden (3.2.1, S. 41). Sowohl in Abbildung 13 als auch in Abbildung 15 ist jeweils nur die der Variante 1 entsprechende Bande deutlich sichtbar. Die Varianten 2 bis 4 scheinen in den untersuchten Geweben nicht oder in zu geringem Maße exprimiert zu werden, als dass sie durch RT-PCR nachgewiesen werden konnten. Ein Hinweis hierfür könnten die in Abbildung 13 schwach sichtbaren Banden in der Nebennieren- und der Testis-Probe sein. Diese Amplifikate könnten durch minimalste Expression der größeren Spleißvarianten bedingt sein. Eine weitere Analyse dieser Banden zur Ermittlung ihrer Sequenz gelang aufgrund der geringen Konzentration des Produkts nicht. Da jedoch auch bei der Amplifikation der gesamten cDNA nur Variante 1 nachgewiesen werden konnte (3.2.2, S. 44), ist es wahrscheinlicher, dass es sich bei den Banden um unspezifische Produkte der PCR handelt. Im Gegensatz hierzu zeigten die RT-PCR-Analysen bei der Maus (3.2.3, S. 45) sowohl in allen Geweben adulter Mäuse, den untersuchten Zelllinien als auch im Gewebe embryonaler Mäuse nur die der Variante 4 von *ZFYVE27* entsprechende Bande.

Dies deutet darauf hin, dass beim Menschen nur im Gehirn eine relevante Expression des *ZFYVE27*-Gens stattfindet, und dass wahrscheinlich nur Variante 1 exprimiert wird, während in der Maus eine ubiquitäre Expression erfolgt; Dies spricht für eine spezielle Rolle von *ZFYVE27* für das menschliche ZNS. Hierfür würde ebenso sprechen, dass Shirane und Nakayama für *Zfyve27* eine Beteiligung bei der Ausbildung von Neuriten nachweisen konnten (2006).

4.2.2.2 Intrazelluläre Lokalisation

Die mikroskopischen Untersuchungen der mit den *ZFYVE27*-Konstrukten transfizierten HeLa-Zellen (3.3, S. 49) zeigten größtenteils eine endosomale Lokalisation des Proteins. Sowohl das mit GFP als auch das mit E2 markierte *ZFYVE27* schienen sich im Zytoplasma in rundlichen Bereichen anzusammeln. Ein ähnliches Verteilungsmuster wurde in dieser Form schon bei anderen endosomalen FYVE-Proteinen nachgewiesen (Stenmark et al. 1996, Tsukazaki et al. 1998, Lorenzo et al. 2005), und auch der Vergleich mit dem endosomalen Marker EEA1 ergab eine Übereinstimmung der Signale und damit einen deutlichen Hinweis auf die Co-Lokalisation von *ZFYVE27* mit EEA1 an jungen Endosomen. Auffällig war weiterhin, dass einige Zellen eine leicht andere Verteilung des Signals zeigten, welche eher dem tubulären System entsprach. Die Überlagerung mit dem Marker RTN1, der an das Endoplasmatische Retikulum bindet, zeigte in diesen Fällen teilweise Übereinstimmungen, was dafür sprechen könnte, dass sich *ZFYVE27* in einigen Zellen auch am Endoplasmatischen Retikulum befindet. Eine Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation in einzelnen Zellen könnte sein, dass der physiologische Weg *ZFYVE27* vom endoplasmatischen Retikulum, wo es gebildet werden könnte, zu den Endosomen führt. Je nach Lage des Zellstoffwechsels und den momentanen Anforderungen an die Zelle könnten so unterschiedliche Mengen des Proteins in diesen beiden Bereichen angetroffen werden.

Das ebenfalls untersuchte Spastin war in den Untersuchungen an vesikulären Strukturen in Kernnähe lokalisiert. Das Signal des c-myc-Spastin-Proteins zeigte eine Anreicherung an runden Strukturen im Zytoplasma, wie es auch schon in anderen Arbeiten zuvor nachgewiesen werden konnte (Errico et al. 2002). Die hier gezeigte Bindung von Spastin an vesikuläre Strukturen (Abb. 22 F) und der Vergleich mit dem GFP-*ZFYVE27*-Protein könnte den Verdacht bestätigen, dass beide intrazellulär zusammen auftreten. Die beiden Signale zeigen eine deutliche Übereinstimmung im kernnahen Zytoplasma an rundlichen Strukturen (Abb. 21 K), was, zusammen mit der Übereinstimmung mit dem EEA1-Marker, für eine Co-Lokalisation der beiden Proteine an Endosomen spricht. In der Literatur gibt es sowohl Hinweise darauf, dass Spastin an perinukleären Vesikeln oder dem

Zellkern vorkommen kann, als auch Hinweise auf eine Bindung an Mikrotubuli und die Zentromerregion (Errico et al. 2004, Beetz et al. 2004). Es scheint so, als ob dieses unterschiedliche Auftreten von Zellart und Zellzyklusphase abhängig ist. Eine definitive Klärung der intrazellulären Lokalisation von Spastin steht deswegen noch aus, doch die nachgewiesene örtliche Verbindung innerhalb der Zelle ist ein weiteres Indiz für eine, durch die Y2H-Methode schon vermutete, Interaktion zwischen Spastin und *ZFYVE27*. Zusätzlich konnten Mannan et al. die Interaktion auch durch Co-Immunpräzipitation nachweisen (2006). In welcher Art diese Verbindung stattfindet und welche Konsequenzen sie für die Funktion der beiden Partner hat, bleibt hingegen offen und eventuell Bestandteil weiterer Untersuchungen.

4.2.2.3 Struktureller Aufbau und Funktion

Wie weiter oben gezeigt wurde, gehören zur Gruppe der FYVE-Proteine Vertreter mit unterschiedlichsten Aufgaben und sehr verschiedenem Aufbau. Keines der bisher bekannten FYVE-Proteine besitzt, wie *ZFYVE27*, eine Transmembrandomäne. Dies lässt vermuten, dass *ZFYVE27* zu einer neuen Untergruppe mit möglicherweise bisher so nicht nachgewiesener Funktion gehört. Auch die FYVE-Domäne an sich unterscheidet sich in einzelnen Punkten deutlich vom Großteil der bisher bekannten. So ist das WxxD-Motiv nicht vorhanden und auch die Bereiche R(R/H)HHR und RVC weisen Unterschiede zu den anderen FYVE-Proteinen auf (s. Abb. 30). Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass *ZFYVE27* u.a. an jungen Endosomen lokalisiert ist (3.3, S.49), kann davon ausgegangen werden, dass hierfür die FYVE-Domäne, trotz der Strukturabweichungen, zumindest mitverantwortlich ist. Das „Dimerinterface“ von *ZFYVE27* ist im Vergleich mit den meisten anderen FYVE-Proteinen um einige Aminosäuren erweitert, was vielleicht zu einer starken Dimerisierung und hierüber, trotz der alterierten WxxC-, RVC- und R(R/H)HHR-Gruppe, zu einer allein durch die FYVE-Domäne bedingten Bindung an Endosomen führen könnte. Eben eine solche Abhängigkeit der Membranbindung an das Dimerinterface konnte für das FYVE-Protein SARA nachgewiesen werden (Hayakawa et al. 2004). Jedoch konnte für die FYVE-Domäne von Fgd1, das genau wie *ZFYVE27* das WxxD-Motiv nicht besitzt, gezeigt werden, dass es sowohl einzeln als auch

als Dimer nicht an Endosomen bindet (Hayakawa et al. 2004), was eher gegen eine Bindung eines *ZFYVE27*-Dimers alleine über die FYVE-Domäne spricht. Außerdem zeigte sich, dass Fgd1 nicht spezifisch an PI3P bindet, sondern auch mit PI5P Kontakt aufnehmen kann (Sankaran et al. 2001). Wahrscheinlich besitzt die FYVE-Domäne von *ZFYVE27* aufgrund des fehlenden WxxD-Motivs eine eher schwache PI3P-Bindungsfähigkeit und ist deswegen intrazellulär an den Ort mit der höchsten PI3P-Konzentration, die jungen Endosomen, gebunden. Dass *ZFYVE27* überhaupt an Endosomen bindet, könnte möglicherweise durch die Transmembrandomäne bedingt sein. Es konnte schon für mehrere FYVE-Proteine gezeigt werden, dass die Bindung über die FYVE-Domäne an PI3P nicht stark genug ist, um alleine für eine Lokalisierung an eine Membran zu sorgen (Wiedemann und Cockcroft 1998, Raiborg et al. 2001). Die im N-terminalen Bereich liegende Transmembrandomäne könnte als stabilisierende Gruppe wirken, die synergistisch mit der FYVE-Domäne die Bindung von *ZFYVE27* an die Endosomen unterstützt. Für den Fall, dass die FYVE-Domäne aber dennoch eigenständig für die endosomale Lokalisation verantwortlich ist, wäre auch denkbar, dass über die Transmembrandomäne eine Bindung an ein anderes Zellkompartiment erfolgt. *ZFYVE27* könnte also als Verbindungsmolekül zwischen jungen Endosomen und einer anderen Membranstruktur fungieren, wie es auch schon für EEA1 vermutet wurde (Stenmark und Aasland 1999).

Wahrscheinlich ist, dass die Funktion von *ZFYVE27* direkt mit dem endosomalen System in Zusammenhang steht. Um jedoch genauere Aussagen über die Funktion von *ZFYVE27* treffen zu können, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Hierbei wäre besonders interessant zu untersuchen, ob es spezifisch an PI3P bindet, inwieweit die Membranbindung von der Transmembrandomäne abhängig ist und, falls nein, an welches Kompartiment die Transmembrandomäne bindet. Untersuchungen an Zellen mit unterdrückter oder ausgeschalteter Expression könnten dann weitere Hinweise auf den Einfluss von *ZFYVE27* auf die Zellkompartimente geben.

4.2.3 Mutationsanalyse von AD-HSP-Patienten

Die Sequenzanalyse der 43 HSP-Patienten mit autosomal dominantem Erbgang ergab zwei Basenaustausche im 5' untranslatierten Bereich (c.187T>A, c.117C>T) und einen im Bereich von Intron 7 (IVS7+57T>C). Ob diese Bereiche genregulierende Funktionen besitzen, wurde nicht untersucht und bleibt zu überprüfen. Eine weitere heterozygote Veränderung liegt in Exon 2 (c.127C>T). Der hier erfolgte Austausch von Cytosin durch Thymin an Position 127 der cDNA führt zu keinem Aminosäureaustausch, da sowohl das ursprüngliche Codon CTC, als auch das neu entstandene Codon CTT für die Aminosäure Leucin codieren. Anders verhält es sich bei der im Exon 6 gefundenen Veränderung c.572G>T. Hier ist das ursprünglich für Glycin codierende Triplet GGC zu GTC geändert, was zu einem Austausch von Glycin durch Valin führt. Sowohl Glycin als auch Valin zeichnen sich durch apolare Moleküleigenschaften aus, wobei Valin durch den größeren, apolaren Rest stärkere hydrophobe Eigenschaften besitzt. Keine der 5 Veränderungen wurde mehrmals in den untersuchten Patientenproben gefunden. Zum Ausschluß eines Polymorphismus wurden 100 weitere Wildtypchromosomen vergeblich auf die Veränderung c.572G>T hin untersucht, dennoch besteht der gefundene Basenaustausch laut SNP-Datenbank in unterschiedlichen ethnischen Populationen (Martignoni et al. 2008). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Sequenzvariante p.G191V je nach Population verschiedene pathogenetische Eigenschaften besitzen kann, wie es schon für andere genetische Veränderungen gezeigt werden konnte (Pollak et al. 2007), erfolgte die Aufnahme einer genauen Familienanamnese und Untersuchung der Familienmitglieder der betroffenen Patientin.

Anamnestisch bestand bei der von uns identifizierten Trägerin von c.572G>T (III.2) ein Spitzfuß beidseits, als sich im Alter von ungefähr 50 Jahren Gangstörungen einstellten. Im Verlauf kam es zu zunehmender Hyperreflexie und Spastizität an den unteren Extremitäten, mit positiven Pyramidenbahnzeichen und pathologischem Fußklonus. Die Sensibilität stellte sich zu allen Zeitpunkten normal dar. Durch weitere Progredienz der motorischen Einschränkungen konnte die Patientin ab 2006 ohne Hilfe nicht mehr das Bett verlassen. Die Familienanamnese ergab, dass die Großmutter (I.1) vor ihrem Tode ebenfalls an

ähnlichen Symptomen gelitten hatte. Ob der Vater der Patientin (II.1) vor seinem Tod Zeichen der HSP zeigte, ließ sich aufgrund der eingeschränkten Anamnese und des Todeszeitpunktes nicht genau klären. Während eine Tochter (IV.4) bis heute keinerlei Anzeichen der Krankheit zeigt, bestanden bei der anderen Tochter der Patientin (IV.2) im Alter von 47 Jahren ein Spitzfuß, Gangstörungen, Fußklonus, sowie Hyperreflexie und Spastizität an der unteren Extremität und bei ihrem Sohn (IV.3) Spitzfuß, Gangstörung und eine Spastik der Beine. Eine genaue Bestimmung des onset-Alters war aufgrund der eingeschränkten Anamnesemöglichkeit nicht mehr möglich. Niemand von den betroffenen Personen zeigte Anzeichen für eine Störung der kognitiven Funktionen oder zusätzliche neurologische Symptome, wie man sie bei einer komplizierten Form der HSP erwarten würde. Es ist deswegen davon auszugehen, dass es sich bei der in dieser Familie aufgetreten Erkrankung um eine reine, autosomal-dominant vererbte Form der HSP handelt.

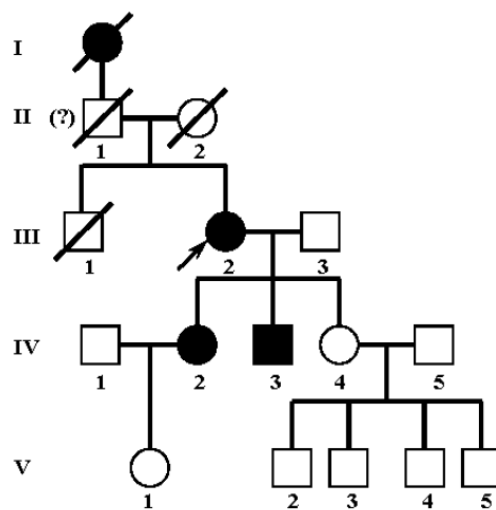


Abbildung 31:

Stammbaum der betroffenen Familie über fünf Generationen. Der schwarzen Pfeil markiert die Trägerin bei der die Veränderung c.572G>T zuerst gefunden wurde.

Die Sequenzanalysen von IV.2, IV.3 und IV.4 erbrachten eine Übereinstimmung von Phänotyp und Genotyp. Während die, wie oben beschrieben, an HSP erkrankten IV.2 und IV.3 heterozygote Träger von c.572G>T sind, konnte beim gesunden IV.4 nur das homozygote Wildtyp-Allel nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse könnten ein Hinweis darauf sein, dass der Polymorphismus c.572G>T in Zusammenhang mit der HSP-Erkrankung in dieser Familie steht.

Auf zellulärer Ebene wurde die Wirkung der Mutation durch die Immunfluoreszenz-Untersuchungen kontrolliert (3.3.3, S. 54). Das mit der

Mutation versehene GFP-ZFYVE27(p.G191V)-Protein zeigte im Vergleich mit der normalen Version eine veränderte intrazelluläre Verteilung. Zwar waren auch Zellen sichtbar, bei denen das mutierte Protein, wie beim physiologischen *ZFYVE27*, offensichtlich an Endosomen lokalisiert war (Abb. 22 A), war jedoch in einem Teil der Zellen die normale Verteilung komplett aufgehoben. Dabei zeigten sich zwei unterschiedliche Muster: Einmal gab es Zellen, bei denen sich das Fusionsprotein in Zellkernnähe anreicherte, was einer massiven Bindung am Endoplasmatischen Retikulum entsprechen könnte (Abb. 22 B), und in einigen Zellen scheint es zur Bindung an die Plasmamembran gekommen zu sein. Dies stellte sich in einer sehr gleichmäßigen Signalverteilung über das gesamte Zytoplasma dar (Abb. 22 C). Auffällig war weiterhin, dass es Abstufungen zwischen der „endosomalen/endoplasmatischen“-Verteilung und der diffusen zu geben schien. Das Auftreten dieser unterschiedlichen Verteilungsmuster wirft weitere Fragen auf: Ist die eingebrachte Veränderung tatsächlich der Grund für die stärkere Bindung an das ER und die Plasmamembran oder handelt es sich viel mehr um einen Fehler in der Versuchsreihe? Warum zeigt die mutierte *ZFYVE27*-Version ein so breites, uneinheitliches Verteilungsspektrum? Eine Möglichkeit hierfür könnte über die putative Dimerisierungsfähigkeit von *ZFYVE27* führen. Wie weiter oben gezeigt werden konnte, gibt die Struktur der FYVE-Domäne begründeten Anlass dazu, davon auszugehen, dass *ZFYVE27* mit sich selbst Dimere ausbilden kann. Falls dies zutrifft, könnte ein Teil des GFP-ZFYVE27(G191V)-Proteins mit dem physiologischen *ZFYVE27* dimerisieren und so zu der normalen Lokalisation an jungen Endosomen führen. Ein ähnlicher Mechanismus wurde schon für die FYVE-Proteine MTMR-3, das physiologischerweise zytosolisch auftritt (Walker et al. 2001), und das homologe MTMR-4 nachgewiesen. Durch Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass bei einer Überexpression von MTMR-4 auch MTMR-3 an Endosomen gebunden vorkommt (Lorenzo et al. 2005). Um dies letztendlich klären zu können, müssen weitere Versuche zur Dimerisierungsfähigkeit von *ZFYVE27* durchgeführt werden.

Fraglich ist weiterhin, wie die eingebrachte Mutation zur Veränderung der Membranbindungsfähigkeit und damit zur Veränderung der intrazellulären Verteilung führen kann. Die Aminosäure 191 ist kein Bestandteil einer bekannten funktionellen Gruppe, eine essentielle Aufgabe des Bereichs für die Funktion des Proteins ist dennoch anzunehmen, da die betroffene Aminosäure in allen eukaryotischen Organismen strikt konserviert ist (s. Tabelle 32).

Mensch	CTT CTG GGC ACA GTC	LLGTV
Chimpanse	CTT CTG GGC ACA GTC	LLGTV
Stier	CTC CTG GGC ACG GTT	LLGTV
Maus	CTT CTG GGC ATG GTG	LLGMV
Ratte	CTT CTG GGC ATG GTT	LLGMV
Abbildung 32:		
Vergleich der Basen- und Aminosäuresequenz einiger Säugetiere des betroffenen Abschnitts aus Exon 6. Die Base c.572 und die Aminosäure p.191 des entsprechenden Codons sind grau unterlegt.		

Außerdem zeigte sich, dass die Veränderung, die unmittelbar N-terminal der Transmembrandomäne liegt, bei der Simulierung der Transmembrandomänen zu einer Alterierung der Struktur führen kann. Die Transmembrandomäne 3 wird durch den Austausch p.G191V um drei Aminosäuren in N-terminale Richtung verschoben, möglicherweise aufgrund der größeren Lipophilität von Valin. Diese Änderung des dreidimensionalen Molekulaufbaus könnte die Eigenschaften der Transmembrandomäne direkt verändern oder aber, über eine Konformationsänderung des im C-terminalen Bereich liegenden Zink-Fingers, indirekt die membranbindenden Eigenschaften von *ZFYVE27* beeinflussen.

Dass Störungen in den endosomalen Abläufen zu unterschiedlichen Erkrankungen führen können, konnte schon vielfach gezeigt werden. Filimonenko et al. (2007) haben nachgewiesen, dass einige neurodegenerative Erkrankungen, wie ALS und frontotemporale Demenz, durch Störung der Autophagozytose, ein Prozess an dem auch das FYVE-Protein Hrs beteiligt ist, ausgelöst werden können. Eine Form des M. Charcot-Marie-Tooth kann durch Mutationen in FIG4, einer Phosphoinositol(3,5)Di-Phosphat-5'Phosphatase, hervorgerufen werden. Die Störung im Phosphoinositol-Haushalt führt zu vergrößerten Endosomstrukturen.

Ähnliche Veränderungen konnten auch bei Ausschaltung von PIKfyve, mit dem FIG4 interagiert, nachgewiesen werden (Chow et al. 2007), und Mutationen in PIKfyve können zum Francois-Neetens-Syndrom, das durch eine hereditäre Dystrophy der Cornea definiert ist, führen (Li et al. 2005). Eine weitere Erkrankung, an deren Ursprung ein FYVE-Protein beteiligt ist, ist das Aarskog-Scott-Syndrom. Pasteris et al. haben 1994 Mutationen in *Fgd1* als Ursache für die auch als facio-genitale Dysplasie bekannte Krankheit nachgewiesen. Die Mutationen in *Fgd1* scheinen eine Störung des Zytoskeletts in Osteoblasten zu verursachen und so für die klinisch führenden Knochenfehlbildungen verantwortlich zu sein. Es ist also anzunehmen, dass eine Störung von *ZFYVE27* theoretisch durchaus als Ursache für die Entstehung der HSP in Frage kommt.

Zum genauen Pathomechanismus der HSP gibt es unterschiedliche Hypothesen. Da schon mehreren HSP-loci-kodierten Proteinen eine Verbindung zu intrazellulären Transportvorgängen nachgewiesen werden konnte, sind und bleiben diese dabei ein Kernpunkt. So scheinen SPG1, SPG3, SPG4 und SPG10 direkt an den Aufgaben des Zytoskeletts beteiligt zu sein (Reid et al. 2002, Zhao et al. 2001, Errico et al. 2002, Fink 2003), und das Protein SNX15, das Homologien zu SPG20 aufweist, scheint bei der Organisation des endosomalen Netzwerkes zu fungieren (Barr et al. 2000). Die FYVE-Proteine passen hierzu sehr gut ins Bild und auch die in dieser Arbeit zu *ZFYVE27* gezeigten Ergebnisse lassen sich mit der Theorie des gestörten intrazellulären Transportes bei HSP-Erkrankten gut vereinbaren. Da die genaue Funktion von *ZFYVE27* jedoch ungeklärt bleibt, ist besonders erwähnenswert, dass es eventuell eine Verbindung zu Autophagozytose-Prozessen besitzt. Ferreirinha et al. (2004) konnten bei Ausschaltung von SPG7 in Mäusen eine Ansammlung von Mitochondrien und Neurofilamenten in Axonen nachweisen, bevor diese degenerieren. Diese Ansammlungen könnten ein Hinweis auf eine gestörte Phagozytose von zelleigenen Bestandteilen sein. Dies ist wiederum ein Vorgang an dem sowohl PI3P als auch FYVE-Proteine direkt beteiligt sind (Petiot et al. 2000). Auch das Hefeprotein *Etf1* erfüllt bei einer speziellen Art der Autophagozytose in *S. cerevisiae* eine essentielle Aufgabe und besitzt einige Übereinstimmungen mit *ZFYVE27*. *Etf1* enthält zwar keine komplette FYVE-Domäne, es kann jedoch über den Bereich KKPAAK, der dem funktionellen FYVE-Abschnitt R(R/H)HHR entsprechen könnte, mit PI3P Verbindung aufnehmen, und die beiden Proteine

besitzen zudem eine gleichgroße Transmembrandomäne (Wurmser und Emr 2002). Homologievergleiche der beiden DNA-Sequenzen ergeben zwar keine besondere Übereinstimmung, aber die Ähnlichkeit der funktionellen Bereiche könnte auf eine homologe Aufgabe hinweisen.

4.3 Deletionen in SPG4

SPG4 und Spastin sind momentan sowohl bei der Diagnostik als auch für die Erforschung der Grundlagen der HSP der zentralste Ansatzpunkt. Mit ungefähr 40% wird der bisher größte Anteil der AD-HSP-Fälle durch eine der über 100 bekannten Mutationen im SPG4-Gen verursacht. Unter den Mutationen finden sich Missense-, Nonsense- und Spleiß-Mutationen, sowie Deletionen und Insertionen in leicht unterschiedlicher Häufigkeit (Fonknechten et al. 2000, Sauter et al. 2002). Da die Sequenzierung der exonischen Bereiche eines Gens heterozygote Deletionen nicht nachweisen kann wenn diese die Primerbindungsstelle enthalten, wurden im Rahmen dieser Arbeit 88 AD-HSP-Patienten, bei denen die Sequenzierung von *SPG3* und *SPG4* keine Mutation ergeben hatte, mit Hilfe der Real-Time-PCR auf Deletionen im *SPG4*-Gen hin untersucht. Die Wahrscheinlichkeit dafür, dass in diesem Patienten-Kontingent eine Deletionen im *SPG4*-Gen vorliegt, war nach den oben genannten, bekannten Daten als hoch einzuschätzen.

Bei der Etablierung der Methode kam es jedoch zu erheblichen Problemen. Obwohl die Erfahrungen aus den regelmäßig zur Diagnostik durchgeführten Sequenzanalysen von *SPG4* mitberücksichtigt wurden, kam es schon bei der Amplifikation zu unbefriedigenden Ergebnissen. Es wurde teilweise kein, zu wenig, oder mehrere unterschiedliche Fragmente amplifiziert. Es mussten multiple Primerkombinationen und Reaktionsbedingungen getestet werden, um schließlich für 15 der 17 Exons reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen.

Die Untersuchungen der 88 Patientenproben ergaben für 7 Patienten den dringenden Verdacht auf eine Deletion (3.4.1, S. 56). Dabei war auffällig, dass in allen dieser 7 Proben Exon 16 heterozygot deletiert zu sein schien. Diese Häufigkeit von Deletionen in diesem Bereich ist bisher nicht beschrieben worden.

Jedoch hat sich gezeigt, dass ein Großteil der Spastin-Mutationen den Bereich der AAA-Kassette, zu dem auch das Exon 16 gehört, betreffen (Hazan et al. 1999, Sauter et al. 2002). Zur Verifizierung der Ergebnisse auf DNA- und RNA-Ebene wurden bewusst Methoden mit einer hohen Spezifität gewählt. Dabei ergaben sich sowohl bei der „Long-Range“-PCR als auch bei der RT-PCR Ergebnisse, die für eine Deletion sprachen, jedoch diese nicht eindeutig bewiesen. Die „Long-Range“-PCR der Proben 19544 und 21969 zeigte eine dem normalen Allel entsprechende 12 kb-große Bande und gleichzeitig eine ~2kb kleinere Bande, so wie man es bei einer Deletion in diesem Bereich erwarten würde. Es zeigten sich jedoch in mehreren Reaktionsansätzen multiple kleinere Banden (s. Abb. 25, S. 59), was auf eine ungenügende Spezifität der Reaktion hindeutete.

Bei den RT-PCRs zeigte sich neben dem Amplifikat des normalen Allels in zwei Proben ein kleineres Produkt, das dem um Exon 16 verkürzten Spastin entsprach. Dieses lag jedoch in so geringer Konzentration vor, dass es nur schwierig optisch nachweisbar war und nicht sequenziert werden konnte. Falls eine Deletion im *SPG4*-Gen vorliegen sollte, wäre dies gut durch einen Abbau der eventuell funktionslosen RNA zu erklären. Das Ergebnis der Southernblot-Untersuchung ergab für die Proben 19544, 19549, 25950, 29162 und 29163, dass keine Deletion zwischen Intron 14 und Exon 17 besteht. Dies steht im direkten Gegensatz zu den Ergebnissen der Real-Time-PCR. Aufgrund der Tatsache, dass hierbei zwei Methoden angewendet wurden, von denen die Real-Time-PCR sehr viel empfindlicher für Fehler ist, kann davon ausgegangen werden, dass die erzielten Ergebnisse zumindest für das Exon 16 nicht korrekt sind. Hierfür gibt es unterschiedliche Ursachen: Das verwendete genetische Material war teilweise schon mehrere Jahre alt, was zu einer hohen Degradierungsrate geführt haben könnte. In diesem Falle könnte zwar das gewünschte Amplifikat nachgewiesen worden sein, jedoch wäre es möglich, dass die für die Beurteilung wichtig Effizienz der Reaktion gemindert wurde und so der Eindruck eines deletierten Bereichs entstand. Weiterhin wurden aufgrund der Schwierigkeiten bei der Etablierung der Methode für das *SPG4*-Gen teilweise Amplifikate gewählt, die größer sind als es für die Auswertung optimal gewesen wäre. Auch dies könnte zu einer Herabsetzung der Reaktionseffizienz geführt haben. Dass individuelle Fehler bei der Durchführung der Experimente zu den falschen Ergebnissen geführt haben, lässt sich nicht vollkommen ausschließen, jedoch wurden die Real-

Time-Ergebnisse bei der Durchführung durch eine zweite Person, in einem anderen Labor, weitestgehend reproduziert.

Die hier erzielten Ergebnisse schließen Deletionen im *SPG4*-Gen nicht aus und im Hinblick auf die oben geschilderten Fakten zur Mutationsverteilung sind diese weiterhin als wahrscheinlich anzusehen, jedoch scheint die Real-Time-Methode für die schwer amplifizierbaren Bereiche des *SPG4*-Gens nicht geeignet zu sein.

5. Zusammenfassung

Die hereditären spastischen Paraplegien (HSP) sind eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe erblicher neurodegenerativer Erkrankungen, welche durch eine progrediente spastische Paraparese und Hyperreflexie der unteren Extremitäten gekennzeichnet sind. Sie können autosomal-dominant, autosomal rezessiv und X-chromosomal vererbt werden. Für einen Teil der autosomal-dominanten Fälle können Mutationen in den Genen *SPG3* und *SPG4* nachgewiesen werden, bei einem Großteil der Erkrankungen bleiben die verantwortlichen Gene jedoch unbekannt. In dieser Arbeit sollte deswegen die Charakterisierung von *ZFYVE27*, eines Interaktionspartners von Spastin und damit potentiellen Kandidatengens für die AD-HSP, erfolgen und nach Deletionen im *SPG4*-Gen gesucht werden.

Es wurde gezeigt, dass *ZFYVE27*, welches zu einer als FYVE-Proteine bezeichneten Gruppe gehört, ausschließlich im Gehirn des Menschen effektiv exprimiert wird. Im Gegensatz hierzu ergab der Vergleich mit dem homologen Mausgen *zfyve27* für dieses eine ubiquitäre Expression. Es konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass *ZFYVE27* intrazellulär an das Endoplasmatische Retikulum und an Endosomen gebunden und mit Spastin co-lokalisiert ist.

Die für das Deletionsscreening verwendete Real-Time-PCR erwies sich unter den angewandten Bedingungen als nicht verlässlich genug, und obwohl Ergebnisse anderer Arbeiten eben diese in AD-HSP-Patienten nachweisen konnten, gelang es im Rahmen dieser Arbeit nicht, Deletionen im *SPG4*-Gen zu finden.

Durch die Sequenzanalyse von *ZFYVE27* bei 43 Patienten mit klinisch diagnostizierter AD-HSP wurden fünf Veränderungen auf genomischer Ebene nachgewiesen. Dass der hierbei identifizierte Polymorphismus c.572G>T die Ursache der HSP in einer der untersuchten Familien ist und *ZFYVE27* somit an der Pathogenese der HSP beteiligt ist, konnte jedoch nicht bewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.

Bache KG, Brech A, Mehlum A, Stenmark H (2003): Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J. Cell Biol.* 162: 435-442.

Barr VA, Phillips SA, Taylor SI, Haft CR (2000): Overexpression of a novel sorting nexin, SNX15, affects endosome morphology and protein trafficking. *Traffic* 11: 904-916.

Beetz C, Brodhun M, Moutzouris K, Kiehntopf M, Berndt A, Lehnert D, Deufel T, Bastmeyer M, Schickel J (2004): Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 318: 1079-1084.

Beetz C, Nygren AO, Schickel J, Auer-Grumbach M, Bürk K, Heide G, Kassubek J, Klimpe S, Klopstock T, Kreuz F, Otto S, Schüle R, Schöls L, Sperfeld AD, Witte OW, Deufel T (2006): High frequency of partial SPAST deletions in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 67: 1926-1930.

Behan WM, Maia M (1974): Strümpell's familial spastic paraplegia: genetics and neuropathology. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 37: 8-20.

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 24: 1513-1523.

Blatner NR, Stahelin RV, Diraviyam K, Hawkins PT, Hong W, Murray D, Cho W (2004): The molecular basis of the differential subcellular localization of FYVE domains. *J. Biol. Chem.* 279: 53818-53827.

Boehm D, Herold S, Kuechler A, Liehr T, Laccone F (2004): Rapid detection of subtelomeric deletion/duplication by novel real-time quantitative PCR using SYBR-green dye. *Hum. Mutat.* 2004 23: 368-378.

Bönsch D, Schwindt A, Navratil P, Palm D, Neumann C, Klimpe S, Schickel J, Hazan J, Weiller C, Liepert J (2003): Mutation in the spastin gene paraparesis type 4 (SPG4) depend on the type of Motor system abnormalities in hereditary spastic. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74:1109-1112.

Bruyn RPM, Scheltens F (1991): Hereditary spastic paraparesis (Strümpell-Lorrain). *Handbook of clinical neurology* 15: 301-318.

Callaghan J, Nixon S, Bucci C, Toh BH, Stenmark H (1999): Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur. J. Biochem.* 265: 361-366.

Chen YG, Wang Z, Ma J, Zhang L, Lu Z (2007): Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factor-beta signaling. *J. Biol. Chem.* 282: 9688-9695.

Chow CY, Zhang Y, Dowling JJ, Jin N, Adamska M, Shiga K, Szigeti K, Shy ME, Li J, Meisler MH (2007): Mutation of FIG4 causes neurodegeneration in the pale tremor mouse and patients with CMT4J. *Nature* 448: 68-72.

Derubeis AR, Young MF, Jia L, Robey PG, Fisher LW (2000): Double FYVE-containing protein 1 (DFCP1): isolation, cloning and characterization of a novel FYVE finger protein from a human bone marrow cDNA library. *Gene* 255: 195-203.

Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, Corvera S, Lambright DG (2001): Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell.* 8: 947-958.

Erichsen AK, Inderhaug E, Mattingsdal M, Eiklid K, Tallaksen CM (2007): Seven novel mutations and four exon deletions in a collection of Norwegian patients with SPG4 hereditary spastic paraplegia. *Eur. J. Neurol.* 14: 809-814.

Errico A, Ballabio A, Rugarli EI (2002): Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. *Hum Mol Genet.* 11: 153-163.

Errico A, Claudiani P, D'Addio M, Rugarli EI (2004): Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon. *Hum. Mol. Genet.* 13: 2121-2132.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.

Ferreirinha F, Quattrini A, Pirozzi M, Valsecchi V, Dina G, Broccoli V, Auricchio A, Piemonte F, Tozzi G, Rugarli EI (2004): Axonal degeneration in paraplegin-deficient mice is associated with abnormal mitochondria and impairment of axonal transport. *J. Clin. Invest.* 113: 231-242.

Filimonenko M, Stuffers S, Raiborg C, Yamamoto A, Malerød L, Fisher EM, Isaacs A, Brech A, Stenmark H, Simonsen A (2007): Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease. *J. Cell. Biol.* 179: 485-500.

Fink JK (2003): The hereditary spastic paraplegias: nine genes and counting. *Arch. Neurol.* 60: 1045-1049.

Fink JK, Heiman-Patterson T, Bird T, Cambi F, Dubé MP, Figlewicz DA, Haines JL, Heiman-Patterson T, Hentati A, Siddique T (1996): Hereditary spastic paraplegia: advances in genetic research. Hereditary Spastic Paraplegia Working group. *Neurology* 46: 1507-1514

Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bönsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, Hazan J (2000): Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet.* 9: 637-644.

Hayakawa A, Hayes SJ, Lawe DC, Sudharshan E, Tuft R, Fogarty K, Lambright D, Corvera S (2004): Structural basis for endosomal targeting by FYVE domains. *J. Biol. Chem.* 279: 5958-5966.

Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Durr A, Weissenbach J (1999): Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat. Genet.* 23: 296-303.

Komada M, Soriano P (1999): Hrs, a FYVE finger protein localized to early endosomes, is implicated in vesicular traffic and required for ventral folding morphogenesis. *Genes Dev.* 13: 1475-1485.

Lee SA, Eyeson R, Cheever ML, Geng J, Verkhusha VV, Burd C, Overduin M, Kutateladze TG (2005): Targeting of the FYVE domain to endosomal membranes is regulated by a histidine switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 13052-13057.

Li S, Tiab L, Jiao X, Munier FL, Zografos L, Frueh BE, Sergeev Y, Smith J, Rubin B, Schorderet DF (2005): Mutations in PIP5K3 are associated with François-Neetens mouchetée fleck corneal dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 77: 54-63.

Lo Nigro C, Cusano R, Scaranari M, Cinti R, Forabosco P, Morra VB, De Michele G, Santoro L, Davies S, Hurst J, Seri M (2000): A refined physical and transcriptional map of the SPG9 locus on 10q23.3-q24.2. *Eur. J. Hum. Genet.* 8: 777-782.

Lorenzo O, Urbé S, Clague MJ (2005): Analysis of phosphoinositide binding domain properties within the myotubularin-related protein MTMR3. *J. Cell. Sci.* 118: 2005-2012.

Mannan AU (2008): Response to Martignoni et al. *Am. J. Hum. Genet.* 83, 127–147.

Mannan AU, Boehm J, Sauter SM, Rauber A, Byrne PC, Neesen J, Engel W (2005): Spastin, the most commonly mutated protein in hereditary spastic paraplegia interacts with Reticulon 1 an endoplasmic reticulum protein. *Neurogenetics* 7: 93-103.

Mannan AU, Krawen P, Sauter SM, Boehm J, Chronowska A, Paulus W, Neesen J, Engel W (2006): ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 79: 351-357.

Mao Y, Nickitenko A, Duan X, Lloyd TE, Wu MN, Bellen H, Quijcho FA (2000): Crystal structure of the VHS and FYVE tandem domains of Hrs, a protein involved in membrane trafficking and signal transduction. *Cell* 100: 447-456.

Martignoni M, Riano E, Rugarli EI (2008): The role of ZFYVE27/protrudin in hereditary spastic paraplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 83: 127-128.

Mills IG, Jones AT, Clague MJ (1998): Involvement of the endosomal autoantigen EEA1 in homotypic fusion of early endosomes. *Curr. Biol.* 8: 881-884.

Misra S, Hurley JH (1999): Crystal structure of a phosphatidylinositol 3-phosphate-specific membrane-targeting motif, the FYVE domain of Vps27p. *Cell* 97: 657-666.

Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, Toh BH (1995): EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J. Biol. Chem.* 270: 13503-13511.

Nakanishi H, Takai Y (2008): Frabin and other related Cdc42-specific guanine nucleotide exchange factors couple the actin cytoskeleton with the plasma membrane. *J. Cell. Mol. Med.* 12: 1169-1176.

Pasteris NG, Cadle A, Logie LJ, Porteous ME, Schwartz CE, Stevenson RE, Glover TW, Wilroy RS, Gorski JL (1994): Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell* 79: 669-678.

Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P (2000): Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275: 992-998.

Pollak A, Skórka A, Mueller-Malesińska M, Kostrzewa G, Kisiel B, Waligóra J, Krajewski P, Ołdak M, Korniszewski L, Płoski R (2007): M34T and V37I mutations in GJB2 associated hearing impairment: evidence for pathogenicity and reduced penetrance. *Am. J. Med Genet. A.* 143A: 2534-2543.

Raiborg C, Bremnes B, Mehlum A, Gillooly DJ, D'Arrigo A, Stang E, Stenmark H (2001): FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J. Cell. Sci.* 114: 2255-2263.

Reid E (1997): Pure hereditary spastic paraplegia. *J. Med. Genetics* 34: 499-503.

Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Rubinsztein DC, Marchuk DA (2002): A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am. J. Hum. Genet.* 71: 1189-1194.

Salinas S, Proukakis C, Crosby A, Warner TT (2008): Hereditary spastic paraplegia: clinical features and pathogenetic mechanisms. *Lancet Neurol.* 7: 1127-1138.

Sankaran VG, Klein DE, Sachdeva MM, Lemmon MA (2001): High-affinity binding of a FYVE domain to phosphatidylinositol 3-phosphate requires intact phospholipid but not FYVE domain oligomerization. *Biochemistry* 40: 8581-8587.

Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bönsch D, Schöls L, Visbeck A, Papke T, Hopf HC, Engel W, Neesen J (2002): Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients in Germany with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Hum. Mutat.* 20: 127-132.

Sbrissa D, Ikononov OC, Shisheva A (1999): PIKfyve, a mammalian ortholog of yeast Fab1p lipid kinase, synthesizes 5-phosphoinositides. Effect of insulin. *J. Biol. Chem.* 274: 21589-21597.

Sbrissa D, Ikononov OC, Shisheva A (2002): Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J. Biol. Chem.* 277: 6073-6079.

Shirane M, Nakayama KI (2006): Protrudin induces neurite formation by directional membrane trafficking. *Science* 314: 818-821.

Shisheva A (2008): PIKfyve: Partners, significance, debates and paradoxes. *Cell. Biol. Int.* 32: 591-604.

Shisheva A, Sbrissa D, Ikononov O (1999): Cloning, characterization, and expression of a novel Zn²⁺-binding FYVE finger-containing phosphoinositide kinase in insulin-sensitive cells. *Mol. Cell. Biol.* 19: 623-634.

Skre H (1974): Hereditary spastic paraplegia in Western Norway. *Clin. Genet.* 6: 165-183.

Stahelin RV, Long F, Diraviyam K, Bruzik KS, Murray D, Cho W (2002): Phosphatidylinositol 3-phosphate induces the membrane penetration of the FYVE domains of Vps27p and Hrs. *J. Biol. Chem.* 277: 26379-26388.

Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A (1996): Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J. Biol. Chem.* 271: 24048-24054.

Stenmark H, Aasland R (1999): FYVE-finger proteins--effectors of an inositol lipid. *J. Cell Sci.* 112: 4175-4183.

Stenmark H, Aasland R, Driscoll PC (2002): The phosphatidylinositol 3-phosphate-binding FYVE finger. *FEBS Lett.* 513: 77-84.

Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL (1998): SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* 95: 779-791.

Walker DM, Urbé S, Dove SK, Tenza D, Raposo G, Clague MJ (2001): Characterization of MTMR3, an inositol lipid 3-phosphatase with novel substrate specificity. *Curr. Biol.* 11:1600-1605.

Werdelin L (1986): Hereditary ataxias. Occurrence and clinical features. *Acta Neurol. Scand. Suppl.* 106: 1-124.

Wiedemann C, Cockcroft S (1998): Vesicular transport. Sticky fingers grab a lipid. *Nature* 394: 426-427.

Wurmser AE, Emr SD (2002): Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J. Cell. Biol.* 158: 761-772.

Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, Tükel T, Apak M, Heiman-Patterson T, Fink JK (2001): Mutations in a newly identified GTPase gene cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *Nat. Genet.* 29: 326-331.

7. Anhang

7.1 cDNA, kodierende Sequenz und Aminosäuresequenz der menschlichen ZFYVE27-Spleißvarianten

7.1.1 Transcript Variante 1 (Genbanknummer AK097945.1)

cDNA: 2746 bp

CDS: 956 bp

AS: 318

1	AGAGCGATTTCGCGTCCCGGAAGCGGCGGTGGCGGCCGCGGCGTAGGCGGAGCGGCGTTCA	
61	GGGAGATTTTCGGACCTGCGACTTCCGAACAACCCTGGCAGGAGGACCGGGGGAGGCCTG	
121	AAGAAACGCTCCGGGGCCAGTGGCTCTACCCCTGCTCCTGCCCCACCCTGCCGCCTCCC	
181	TCACGGAGCCAGCGGCCGGGATGCAGACATCAGAACGTGAGGGGAGTGGGCCGGAGCTGA	
	M Q T S E R E G S G P E L S	14
241	GCCCCAGCGTGATGCCCGAGGCTCCCCTGGAGTCTCCACCTTTTCTACCAAGTCCCCAG	
	P S V M P E A P L E S P P F P T K S P A	34
301	CGTTTGACTTTTCAACTTGGTTCTCTCCTACAAGAGGCTGGAGATCTACCTGGAACCCT	
	F D L F N L V L S Y K R L E I Y L E P L	54
361	TGAAGGATGCAGGTGATGGTGTTCGATACTTGCTCAGCTTGATCCAGCTGGAGGCCTTCC	
	K D A G D G V R Y L L S L I Q L E A F L	74
421	TGAGCCGCCTGTGCTGCACATGTGAAGCCGCCTACCGCGTGTGCTGCACTGGGAGAACCCCG	
	S R L C C T C E A A Y R V L H W E N P V	94
481	TCGTGTCCTCACAGTTCTATGGGGCTCTTCTGGGCACAGTCTGCATGCTGTATTTGCTGC	
	V S S Q F Y G A L L G T V C M L Y L L P	114
541	CACTCTGCTGGGTTCTCACCCTTTTAAACAGCACGCTCTTTCTGGGGAATGTGGAGTTCT	
	L C W V L T L L N S T L F L G N V E F F	134
601	TCCGAGTTGTGTCTGAGTACAGGGCATCTCTGCAGCAGAGGATGAACCCAAAGCAGGAAG	
	R V V S E Y R A S L Q Q R M N P K Q E E	154
661	AGCATGCCTTTGAGAGTCCTCCACCACCAGATGTTGGGGGAAGGATGGTCTGATGGACA	
	H A F E S P P P P D V G G K D G L M D S	174
721	GCACGCCTGCCCTCACACCCACGGAGGACCTCACACCGGCAGCGTGGAGGAGGCTGAGG	
	T P A L T P T E D L T P G S V E E A E E	194

781	AGGCTGAGCCAGATGAAGAGTTTAAAGATGCGATTGAGGAGGATGATGAGGGCGCCCCGT	
	A E P D E E F K D A I E E D D E G A P C	214
841	GCCCAGCAGAGGATGAGCTGGCCCTGCAGGACAACGGGTTCCTGAGCAAGAATGAGGTGC	
	P A E D E L A L Q D N G F L S K N E V L	234
901	TGCGCAGCAAGGTGTCTCGGCTCACGGAGCGGCTCCGCAAGCGCTACCCCACCAACAACACT	
	R S K V S R L T E R L R K R Y P T N N F	254
961	TCGGGAAGTGCACGGGCTGCTCGGCCACCTTCTCAGTGTGAAGAAGAGGCGGAGCTGCA	
	G N C T G C S A T F S V L K K R R S C S	274
1021	GTAATTGTGGAAACAGCTTCTGCTCTCGATGCTGCTCCTTCAAGGTGCCCAAGTCTCCA	
	N C G N S F C S R C C S F K V P K S S M	294
1081	TGGGGGCCACAGCCCTGAAGCCCAGAGGGAGACTGTGTTTGTGTGTGCCTCGTGTAAAC	
	G A T A P E A Q R E T V F V C A S C N Q	314
1141	AGACCTTGAGCAAGTGAAGAAGAGAGGCCAGGGTCCAACCAGGCACCCGTCCTTGGGACCA	
	T L S K *	318
1201	GCAGTAGACCCCCACTCTCCCCACCCCTGGCCACTGTGGTGTGTGCTGGGCAAATGTG	
1261	GCCTGAATGCTAGGTAGGCTTCCCCTTCCTTCCTCACTCTCTCCAGCTGGATTCTGGAGC	
1321	TGTTCTCCATCCATGAGAGTGGCTGGCAATGGCTGCTCTCAATCCCTTGAGGGAGAAGAG	
1381	CCCCTGGAGGGCCTGGCATGTTTGTCTGCTCTGCCTGGGACTGAGCGAGTGGACTTAGG	
1441	GCTGGGCAGGCAGTAGCCACCAGAGGGCAGCAGCGAACTAGGCCAGGCCTGACTGGGGTC	
1501	TGAAGATCAGGGTCAGTGTGGCTGTGCCTGGGAATTCAGACCTGAGGTTGGGAAAAGAG	
1561	GTTTTTCTCCTGCAGGGTACTGGGCCAGGCCCTCAGCCTCAGAGAGCTTGAGAAGGGCT	
1621	TGGGAGTGCCACCCCCATCTCTGCTGATTGAATGTCCCTCCAGGCACCAGGATCTCATC	
1681	ATTTCCCACATCAGAGGGTGTGGCCAGGCCTAACAAAGACCATGGGTGCTTCTAGAAACAGG	
1741	GTTGAATTTCCAGATTCCCTGAGAGGAGAATGTGTATAGGAGGGTTTGGCTGAGTCCTT	
1801	CAGCGTAAAGTGGAGGAAAGCTTGGGGAAGCCCCAATAGCTGGACAGACCTCGGCCTCCCC	
1861	TCGAAGACACCTCAATTCACAGACTCTCAGCCACACAATGCCCCAGTGTCCCAGCTCC	
1921	GCTGGAGCAGCTGCAGGGCACTTGGATCACAACCTTCTGCACCCCTCTGTCCAGAGTCTAGG	
1981	GCAGTCTCCTCAGTGGCCAGCACTCCAGTTTCCCTTCCCTGCCTCTTGTCCAATGGAGTG	
2041	GGAGGCCAGGTGAGTGGAGCAGAGGTCTGAAGCCCTTGACCCCTGGGGGCTGGGTAGT	
2101	GTAGGATCTCGCTGGGCTGGGTCTGGATTCCAGGGCTATTCCCTGGAGGACAGTCTCAG	
2161	TTATGGGATAAGGCCCCCTGGGGTCTCCATTTCTTTCCAACAGTTTCATGTTCACTACT	
2221	GGACTCTTACGGGCTCAGTATCTCTCCCTTAGCCATGAGCTGGCTCAGGCATCCCTTCCC	
2281	TTCCCTGGAGCTGCCCTGCCTTCTCAAGTATTTATTTATTTATTTATTCATGGTTCTGGGA	
2341	ACATGTGGCACAAGTAATGGGATGAGGAGGAATTGGGGGTGGGGTCTTCTACCTAGGAC	
2401	TCTTCCCTGGAGTCATGGGCTGCCTGGGACCCAGGACCCATGAGGGGGCTGAGAGGTTTC	
2461	TACTCTGAGGAGCAGGGTCCAGAGAGGCAGGCTGGGGAGGCAAGGGACCCATCCTAGG	
2521	CCCGCTTCTTGCCGAGCCAAGCAGCTTAGCTGGGGCTGTGCAGCCAGGGGCTTACCCAG	
2581	GCCAGTGGAGGTGCCACAGCCCTGGGGAGCCAGACAGGCTTTGGTATCGTATCGCCTCTG	
2641	TGTCCTTTTAAAGAGAGGAGAGTTTCACTACCCCGTCTTTCTTTTACACTGGAAAGGAACTA	
2701	AAAGGATCTCTGTGTCTATGGAGAATTGTCAATAAAAAGGCCTCAAGCTT	2751

7.1.2 Transcript Variante 2 (Genbanknummer NM_001002262.2)

cDNA: 3010 bp

CDS: 1415 bp

AS: 404

1	AGAGCGATTTCGCGTCCCGGAAGCGGCGGTGGCGGCCGCGGCGTAGGCGGAGGAGATTTTC	
61	GGACCTGCGACTTCCGAACAACCCTGGCAGGAGGAGCGGCGTTCAGCCGGGGGAGGCCTG	
121	AAGAAACGCTCCGGGGCCAGTGGCTCTACCCCTGCCTCCTGCCCCACCCTGCCGCCTCCC	
181	TCACGGAGCCAGCGGCCGGATGCAGACATCAGAACGTGAGGGGAGTGGGCCGGAGCTGA	
	M Q T S E R E G S G P E L S	14
241	GCCCCAGCGTGATGCCCGAGGCTCCCCCTGGAGTCTCCACCTTTTCTACCAAGTCCCCAG	
	P S V M P E A P L E S P P F P T K S P A	34
301	CGTTTGACCTTTTCAACTTGGTTCTCTCCTACAAGAGGCTGGAGATCTACCTGGAACCCT	
	F D L F N L V L S Y K R L E I Y L E P L	54
361	TGAAGGATGCAGGTGATGGTGTTCGATACTTGCTCAGGTGGCAGATGCCTTTGTGTTCT	
	K D A G D G V R Y L L R W Q M P L C S L	74
421	TGCTGACCTGCCTGGGCCTCAACGTCTTGTTCCTCACTTTGAATGAGGGTGCATGGTACT	
	L T C L G L N V L F L T L N E G A W Y S	94
481	CAGTAGGTGCCCTGATGATTTTCAGTGCCCGCCCTGCCTGGGCTACCTTCAGGAGGTTTGCC	
	V G A L M I S V P A L L G Y L Q E V C R	114
541	GGGCACGGCTGCCTGATTCGAGCTGATGCGGAGGAAGTATCATAGCGTGAGGCAGGAGG	
	A R L P D S E L M R R K Y H S V R Q E D	134
601	ACCTGCAGAGAGGTGCGCTGTCTCGTCCCGAGGCCGTGGCTGAGGTGAAGAGCTTCTTGA	
	L Q R G R L S R P E A V A E V K S F L I	154
661	TCCAGCTGGAGGCCTTCCCTGAGCCGCCTGTGCTGCACATGTGAAGCCGCCTACCGCGTGC	
	Q L E A F L S R L C C T C E A A Y R V L	174
721	TGCACTGGGAGAACCCCGTCGTGTCCTCACAGTTCTATGGGGCTCTTCTGGCACAGTCT	
	H W E N P V V S S Q F Y G A L L G T V C	194
781	GCA TGCTGTATTTGCTGCCACTCTGCTGGGTTCTCACCCTTTTAAACAGCAGCTCTTTC	
	M L Y L L P L C W V L T L L N S T L F L	214
841	TGGGGAATGTGGAGTTCTTCCGAGTTGTGTCTGAGTACAGGGCATCTCTGCAGCAGAGGA	
	G N V E F F R V V S E Y R A S L Q Q R M	234
901	TGAACCCAAAGCAGGAAGAGCATGCCTTTGAGAGTCTCCACCACCAGATGTTGGGGGGA	
	N P K Q E E H A F E S P P P P D V G G K	254
961	AGGATGGTCTGATGGACAGCACGCCTGCCCTCACACCCACGGAGGACCTCACACCGGGCA	
	D G L M D S T P A L T P T E D L T P G S	274
1021	GCGTGGAGGAGGCTGAGGAGGCTGAGCCAGATGAAGAGTTTAAAGATGCGATTGAGGAGG	
	V E E A E E A E P D E E F K D A I E E D	294

1081	ATGATGAGGGCGCCCCGTGCCCAGCAGAGGATGAGCTGGCCCTGCAGGACAACGGGTTCC	
	D E G A P C P A E D E L A L Q D N G F L	314
1141	TGAGCAAGAATGAGGTGCTGCGCAGCAAGGTGTCTCGGCTCACGGAGCGGCTCCGCAAGC	
	S K N E V L R S K V S R L T E R L R K R	334
1201	GCTACCCACCAACAACCTTCGGGAAGTGCACGGGCTGCTCGGCCACCTTCTCAGTGCTGA	
	Y P T N N F G N C T G C S A T F S V L K	354
1261	AGAAGAGGCGGAGCTGCAGTAATTGTGGAAACAGCTTCTGCTCTCGATGCTGCTCCTTCA	
	K R R S C S N C G N S F C S R C C S F K	374
1321	AGGTGCCCAAGTCTCCATGGGGGCCACAGCCCTGAAGCCCAGAGGGAGACTGTGTTTG	
	V P K S S M G A T A P E A Q R E T V F V	394
1381	TGTGTGCCTCGTGTAACCAGACCTTGAGCAAGTGAAGAAGAGAGGCCAGGGTCCAACCAGG	
	C A S C N Q T L S K *	411
1441	CACCCGTCCCTTGGGACCAGCAGTAGACCCCCACTCTCCCCACCCCTGGCCCACTGTGGT	
1501	GTGTGCTGGGCAAATGTGGCCTGAATGCTAGGTAGGCTTCCCCTTCCCTCCTCACTCTCT	
1561	CCAGCTGGATTCTGGAGCTGTTCTCCATCCATGAGAGTGGCTGGCAATGGCTGCTCTCAA	
1621	TCCCTTGAGGGAGAAGAGCCCCTGGAGGGCCTGGCATGTTTGTCTGCTCTGCCTGGGAC	
1681	TGAGCGAGTGGACTTAGGGCTGGGCAGGCAGTAGCCACCAGAGGGCAGCAGCGAACTAGG	
1741	CCAGGCCTGACTGGGGTCTGAAGATCAGGGTCAGTGTGGCTGTGCCTGGGAATTCCAGAC	
1801	CTGAGGTTGGGAAAAGAGTTTTTCTCCTGCAGGGTACTGGGCCAGGCCCTCAGCCTCAG	
1861	AGAGCCTGCAGAAGGGCTTGGGAGTGCCACACCCCATCTCTGCTGATTGAATGTCCCTCC	
1921	AGGCACCAGGATCTCATCATTTCCCCTCAGAGGGTGTGGCCAGGCCTAACAAGACCATG	
1981	GGTGCTTCTAGAAACAGGGTTGAAGTCCCAGATTCCCTGAGAGGAGAATGTGTATAGGA	
2041	GGGTTTGGCTGAGTCCCTCAGCGTTAAGTGGAGGAAAGCTTGGGGAAGCCCCAATAGCTG	
2101	GACAGACCTCGGCCTCCCCTCGAAGACACCTCAATTCACAGACTCTCAGCCCACACAATG	
2161	CCCAGTGTCCCAGCTCCGCTGGAGCAGCTGCAGGGCACTTGGATCACAACCTTCTGCAC	
2221	CCTCTGTCCAGAGTCTAGGGCAGTCCCTCCACTGGCCAGCACTCCAGTTTCCTTTCCCTG	
2281	CCTCTTGTCCAATGGAGTGGGAGGCCAGGTGAGTGGAGCAGAGGTCTGAAGCCCTTGAC	
2341	CCCTGGGGGCCTGGGTAGTGTAGGATCTCGCTGGGCTGGGTCTGGATTCCAGGGCTATT	
2401	CCCTGGAGGACAGTCTCAGTTATGGGATAAGGCCCCCTGGGGGTCTCCATTTCTTTCCAA	
2461	CAGTTTCATGTTCACTACTGGACTCTTACGGGCTCAGTATCTCTCCCTTAGCCATGAGCT	
2521	GGCTCAGGCATCCCTTCCCTTCCCTGGAGCTGCCCTGCCTTTCTCAAGTATTTATTTATT	
2581	TATTGCATGGTTCCCTGGGAACATGTGGCACAAGTAATGGGATGAGGAGGAATTGGGGGTG	
2641	GGGGTCTTCTACCTAGGACTCTTCCCTGGAGTCATGGGCTGCCTGGGACCCAGGACCCAT	
2700	GAGGGGGCTGAGAGTTTTCTACACTCGAGGAGCAGGGTCCAGAGAGGCAGGCTGGGGAG	
2761	GCAAGGGACCCATCCTAGGCCCGCTTTCTTGGCCGAGCCAAGCAGCTTAGCTGGGGCTGTG	
2821	CAGCCAGGGGCTTACCCAGGCCAGTGGAGGTGCCACAGCCCTGGGGAGCCAGACAGGCTT	
2881	TGGTATCGTATCGCCTCTGTGTCTTTTAAGAGAGGAGAGTTCAGTACCCCGTGCTTTCT	
2941	TTACACTGGAGAGGAACATAAAGGATCTCTGTGTCTATGGAGAATTGTCAATAAAAAGGC	
3001	CTCAAGCTTC	

7.1.3 Transcript Variante 3 (Genbanknummer: NM_144588)

cDNA: 3031 bp

CDS: 1436 bp

AS: 411

1	AGAGCGATTTCGCGTCCCGGAAGCGGCGGTGGCGGCCGCGGCGTAGGCGGAGGAGATTTTC	
61	GGACCTGCGACTTCCGAACAACCCTGGCAGGAGGAGCGGCGTTCAGCCGGGGGAGGCCTG	
121	AAGAAACGCTCCGGGGCCAGTGGCTCTACCCCTGCCTCCTGCCCCACCCTGCCGCCTCCC	
181	TCACGGAGCCAGCGGCCGGATGCAGACATCAGAACGTGAGGGGAGTGGGCCGGAGCTGA	
	M Q T S E R E G S G P E L S	14
241	GCCCCAGCGTGATGCCCGAGGCTCCCCCTGGAGTCTCCACCTTTTCTACCAAGTCCCCAG	
	P S V M P E A P L E S P P F P T K S P A	34
301	CGTTTGACCTTTTCAACTTGGTTCTCTCCTACAAGAGGCTGGAGATCTACCTGGAACCCT	
	F D L F N L V L S Y K R L E I Y L E P L	54
361	TGAAGGATGCAGGTGATGGTGTTCGATACTTGCTCAGGTGGCAGATGCCTTTGTGTTCT	
	K D A G D G V R Y L L R W Q M P L C S L	74
421	TGCTGACCTGCCTGGGCCTCAACGTCTTGTTCCTCACTTTGAATGAGGGTGCATGGTACT	
	L T C L G L N V L F L T L N E G A W Y S	94
481	CAGTAGGTGCCCTGATGATTTCACTGCCCCGCCCTGCCTGGGCTACCTTCAGGAGGTTTGCC	
	V G A L M I S V P A L L G Y L Q E V C R	114
541	GGGCACGGCTGCCTGATTCGAGCTGATGCGGAGGAAGTATCATAGCGTGAGGCAGGAGG	
	A R L P D S E L M R R K Y H S V R Q E D	134
601	ACCTGCAGAGAGGTGCGCTGTCTCGTCCCGAGGCCGTGGCTGAGGTGAAGAGCTTCTTGA	
	L Q R G R L S R P E A V A E V K S F L I	154
661	TCCAGCTGGAGGCCTTCCCTGAGCCGCCTGTGCTGCACATGTGAAGCCGCCTACCGCGTGC	
	Q L E A F L S R L C C T C E A A Y R V L	174
721	TGCACTGGGAGAACCCCGTCGTGTCCTCACAGTTCTATGGGGCTCTTCTGGCCACAGTCT	
	H W E N P V V S S Q F Y G A L L G T V C	194
781	GCATGCTGTATTTGCTGCCACTCTGCTGGGTTCTCACCCTTTTAAACAGCAGCTCTTTC	
	M L Y L L P L C W V L T L L N S T L F L	214
841	TGGGGAATGTGGAGTTCTTCCGAGTTGTGTCTGAGTACAGGGCATCTCTGCAGCAGAGGA	
	G N V E F F R V V S E Y R A S L Q Q R M	234
901	TGAACCCAAAGCAGGAAGAGCATGCCTTTGAGAGTCTCCACCACCAGATGTTGGGGGGA	
	N P K Q E E H A F E S P P P P D V G G K	254
961	AGGATGGTCTGATGGACAGCACGCCTGCCCTCACACCCACGGAGGACCTCACACCGGGCA	
	D G L M D S T P A L T P T E D L T P G S	274
1021	GCGTGGAGGAGGCTGAGGAGGCTGAGCCAGATGAAGAGTTTAAAGATGCGATTGAGGAGA	
	V E E A E E A E P D E E F K D A I E E T	294

7.1.4 Transcript Variante 4 (Genbanknummer NM_001002261.2)

cDNA: 3046 bp

CDS: 1451 bp

AS: 416

1	AGAGCGATTTCGCGTCCCGGAAGCGGCGGTGGCGGCCGCGGCGTAGGCGGAGGAGATTTTC	
61	GGACCTGCGACTTCCGAACAACCCTGGCAGGAGGAGCGGCGTTCAGCCGGGGGAGGCCTG	
121	AAGAAACGCTCCGGGGCCAGTGGCTCTACCCCTGCCTCCTGCCCGACCCTGCCGCTCCC	
181	TCACGGAGCCAGCGGCCGGGATGCAGACATCAGAACGTGAGGGGAGTGGGCCGGAGCTGA	
	M Q T S E R E G S G P E L S	14
241	GCCCCAGCGTGATGCCCCGAGGCTCCCCCTGGAGTCTCCACCTTTTCTACCAAGTCCCCAG	
	P S V M P E A P L E S P P F P T K S P A	34
301	CGTTTGACCTTTTCAACTTGGTTCTCTCCTACAAGAGGCTGGAGATCTACCTGGAACCCT	
	F D L F N L V L S Y K R L E I Y L E P L	54
361	TGAAGGATGCAGGTGATGGTGTTCGATACTTGCTCAGGTGGCAGATGCCTTTGTGTTCT	
	K D A G D G V R Y L L R W Q M P L C S L	74
421	TGCTGACCTGCCTGGGCCTCAACGTCTTGTTCCTCACTTTGAATGAGGGTGCATGGTACT	
	L T C L G L N V L F L T L N E G A W Y S	94
481	CAGTAGGTGCCCTGATGATTTTCAGTGCCCGCCCTGCCTGGGCTACCTTCAGGAGGTTTGCC	
	V G A L M I S V P A L L G Y L Q E V C R	114
541	GGGCACGGCTGCCTGATTCGAGCTGATGCGGAGGAAGTATCATAGCGTGAGGCAGGAGG	
	A R L P D S E L M R R K Y H S V R Q E D	134
601	ACCTGCAGAGAGGTGCGCTGTCTCGTCCCGAGGCCGTGGCTGAGGTGAAGAGCTTCTTGA	
	L Q R G R L S R P E A V A E V K S F L I	154
661	TCCAGCTGGAGGCCTTCCCTGAGCCGCCTGTGCTGCACATGTGAAGCCGCCTACCGCGTGC	
	Q L E A F L S R L C C T C E A A Y R V L	174
721	TGCACTGGGAGAACCCCGTCGTGTCCTCACAGTTCTATGGGGCTCTTCTGGGCACAGTCT	
	H W E N P V V S S Q F Y G A L L G T V C	194
781	GCATGCTGTATTTGCTGCCACTCTGCTGGGTTCTCACCCTTTTAAACAGCAGCTCTTTC	
	M L Y L L P L C W V L T L L N S T L F L	214
841	TGGGGAATGTGGAGTTCTTCCGAGTTGTGTCTGAGTACAGGGCATCTCTGCAGCAGAGGA	
	G N V E F F R V V S E Y R A S L Q Q R M	234
901	TGAACCCAAAGCAGGAAGAGCATGCCTTTGAGAGTCTCCACCACCAGATGTTGGGGGGA	
	N P K Q E E H A F E S P P P P D V G G K	254
961	AGGATGGTCTGATGGACAGCACGCCTGCCCTCACACCCACGGAGAGTCTCTTCCCAGG	
	D G L M D S T P A L T P T E S L S S Q D	274
1021	ACCTCACACCGGCAGCGTGGAGGAGGCTGAGGAGGCTGAGCCAGATGAAGAGTTTAAAG	
	L T P G S V E E A E E A E P D E E F K D	294

7.2 cDNA, kodierende Sequenz und Aminosäuresequenz von *zfyve27* (Genbanknummer NM_177319.2)

cDNA: 5581 bp

CDS: 1043 bp

AS: 347

	GGCAGACGGTTCCCGGGTGGACCTGCGACTTCGGAGCGTCGGTGGGAGGTGGCGTGGCCT	
61	GGCGTGGGGTGGGGCGGGCCTGGCCTGAGGGACCGCTCCGGGGCTTGGTGGCCCTTCTGT	
121	CCCCCTGGCCGTTCCTGTCTCTTCCTTTCCCTGGGACAGCGTCCGGAATGCAGACTTCGGA	
181	TCGGGACCTGAGTGGGCCGGAGGCGAGCCCCAGCGGGATGCCTGAGGTTCTCTCTGAGTG	
241	TCCACCTGCCCCACCAAGTCAGCAGCGTTTGATCTCTTCAACCTGGTCCCTGTCCCTACAA	
301	GAGGCTGGAGATCTACCTGGAACCCCTGAAGGATGCAGGGGACGGTGTTCGATACTTGCT	
361	AAGGTGGCAGATGCCTTTGTGTTCCCTTGCTGACTTGCCTGGGCCTCAACATCTTGTTCCT	
	M P L C S L L T C L G L N I L F L	17
421	CACTTTGAACGAGGTGCGTGGTACTCCATGGGTGCCTTGATGATCTCGGTGCCTGCCCT	
	T L N E G A W Y S M G A L M I S V P A L	37
481	ACTGGGCTACCTTCAGGAGGTGTGCCGGGACAGCTGCCAGAGTCGGAGCTGATGCGGAG	
	L G Y L Q E V C R G Q L P E S E L M R R	57
541	GAAGTACCACAGCATAAGGCAGGAAGACCTGCAGAGAGTTTCGCCTTTCCCGAGTGCACCT	
	K Y H S I R Q E D L Q R V R L S R V H L	77
601	TTCCCGCCCTGAGGCTGTTGCTGAGGTGAAGAGCTTCTTGATCCAACCTGGAAGCCTTCTT	
	S R P E A V A E V K S F L I Q L E A F L	97
661	GGCCCGCTGTGCTATACCTGCGAGTCAGCCTACCGTGTACTTCACTGGGAGAACCCCGT	
	A R L C Y T C E S A Y R V L H W E N P V	117
721	GGTGTCTCACAGTTCTATGGCGCTCTTCTGGGCATGGTGTGCATGCTCTACCTGCTACC	
	V S S Q F Y G A L L G M V C M L Y L L P	137
781	GCTCTGCTGGGTCCCTCGCCCTGTTAAATAGCACACTCTTCCCTGGGAAATGGGGACTTCTT	
	L C W V L A L L N S T L F L G N G D F F	157
841	CCGAGTGGTGTGTGAGTACAGGGCCTGCCTGCAGCGGAGGATGAACCCCGGCAGGAAGA	
	R V V C E Y R A C L Q R R M N P R Q E E	177
901	GTGTGCCTGTGAGAGCTCAGCACTGCAGGGGGCCGGAGGGAGGGGCCTGCTGGACAGCTC	
	C A C E S S A L Q G A G G R G L L D S S	197
961	GCCTGCCCCACACCCACCGAGGACCTCACGCCAGGCAGTGTGGAGGAAGCTGAGGAGGC	
	P A P T P T E D L T P G S V E E A E E A	217
1021	TGAGCCAGATGAGGAGTTCAAAGATGCAATTGAGGAGACCCACCTGGTGGTGTCTGGAGGA	
	E P D E E F K D A I E E T H L V V L E D	237
1081	TGAAGAGGGCACCCCGTGCCAGCAGAGGATGAGCTGACCCTGCAGGACAATGGATTTCCT	
	E E G T P C P A E D E L T L Q D N G F L	257

1141	CAGCAAGAATGAGGTGCTGCGCAGCAAGGTGTCCCGGCTTACAGAGCGGCTTCGCAAGCG	
	S K N E V L R S K V S R L T E R L R K R	277
1201	TTACCCAACCAATAACTTCGGGAATTGTGCAGGCTGTGCCGCTACGTTCTCCGTGCTGAA	
	Y P T N N F G N C A G C A A T F S V L K	297
1261	GAAGAGGCGGAGCTGCAGCAACTGTGGGAACAGCTTCTGCTCGCGGTGTTGCTCCTTCAA	
	K R R S C S N C G N S F C S R C C S F K	317
1321	GGTGCCCAAGTCTCTATGGGAGCCACAGCTCCTGAAGCCCAGAGAGAGACTGTGTGTGT	
	V P R S S M G A T A P E A Q R E T V C V	337
1381	GTGCGCCTCCTGCAATCAGACCCTGAGCAAA TGA GAAGAGAAGCCAGGCTCCAACCTGTCC	
	C A S C N Q T L S K *	347
1441	TGGGGCCAGCAGTGACCCTACTGTCCCAACTCTGGGCCTCTGAGGCCTGTGCTGGGCAAA	
1501	CGTAGCCTGACAGCTAGGTCTCTCCCTGCCCTTCCCCTGCTGCCTCCAGCTGGGCTGGTGT	
1561	GCTCTAAGGCCAGGGGAGAGGCCCTGGGGTCCCAGGCTCTTGGTTCTGCTCTATCC	
1621	TATACCCTGTTAACTCAGGGCTAGCGAGGGAGTGTCCACCAGAGGGCAGAATTGAGCACA	
1681	GCCTGCTCTCATCTGGGCTCTGGTCGTCAAGGTCAGGCTGGCTAGACCTTAGGATCCAAG	
1741	AGACTTGAGGTTGGAAAAGAGGTTCTTCCCCTGTTGGGTACTTGTGAGTCTCTCAGCCCCA	
1801	GAGAGCCTGCGAGGGGACTTAGAGCTCCATGGCCTGCCTTTTGCCTTTTGAATAGCCTCAG	
1861	GACTGGCGTTCCAGGTGTCCCAAGGAGAGGGAAGGTGAGGGTGTGCTCAAGTCCTTCA	
1921	GTGTCAAGTGATGGCAGGATGGGGAAGCTCTGCTTACAGAATCTTAACTCCCATGGTTC	
1981	TCTGGTGTCTCAGCCCTGCTGGGGTGGCTACAGGACCTCACATCACTCTTCCATCCTG	
2041	CTCTGAGTCTAGGGCACCCACCTTTCTCCCACTGCCACATATCTCTAGCCCTTATCTCA	
2101	TGGAACATGCGGCCAGGTGAGTGGAGCAGAGAGACTGCAAGCCTTTGAGGTCCAGGGACG	
2161	TGTAGGACTGCCCCGATTTTCAAGGCTGTTCCTGGAGTAGAGATAGCATTGTAGGATAGGG	
2221	TCAGTCACATGGCCAGTTTTATGTTCCCTCTGACCTGCCAAGGGTGTGCTGTGCCTCTTCTT	
2281	AAGCCATGAGCTGGCTCAGGCCCCCTTCCCCTGGAGCTTTTTTTCAGAGTATTTATTTATTTA	
2341	TTTCATGGTTCTCCTGAGAGCACGCAGCACAGGGTAGGATGAAGAAGACAAGGGGCTTCTGC	
2401	CTGAGACCCTTCTGCAGTCATGGACTGCCCTTGGAGCTGATCTTCAGGAACTGTTTCTGC	
2461	TGCCCAGTCATGGGTGTGGTGCCACACCTGAACCATTTGAGGTCTCCTTGCTGATAGG	
2521	CCACACACACACAGCAGTAGAGCACTGAGGGTTTTGGCAGTGGGGACCAAGCAGGTGAGGT	
2581	GTACTCCTTTGTCCTGGTGAGAGATGCTCACCTCTGCGTATTTATACTGTAGAGCAGTAG	
2641	ACAGGAACGCTGTGGAGAAATGTCAATAAAAAGCCCCATGCTTATGGTTTTGTGAGGTCT	
2700	CCTAGTGCTGTTTCAAGTCTTTCATGTTGCCAGGGTGGGCTGTAGGTGGGCTTTCACAC	
2761	CTCCTGTGGCAATTCGTGAGCCAGCCAGGCCAGTGGAAAGCTGTGCCTTATCAACAGGA	
2821	GGGGTGGGCTTTATCTTGTGACCAGACCCACGGTCTTGGATTGAGGTGGGACCAGAACT	
2881	TAACTATAAAATAATGCAGGCTTCAGAATGGAAAGTTTTTAGCTAATCCTCTGGGAAAGAC	
2941	AGAAAAGCCAGCGCTGCAGGAGGCTGAGAGCTGGTAAGCAGGTTTTCTGGTGGGGTGGGTT	
3001	GCAAGTTGGCCCTGTGATCAGGCTAGGCTGGAGCTGGGCACCTGCACACATTATGTTAGCG	
	CTGGCACCAAGCTCATGAGGTAGGCTCTGTTTTCCACATGGTAAGGCCGGCAGTGCACAG	
	CAGCAGCACTGTGAGCCAGCTCTGAGCTCAGCCCCACCTACCAAGGACCCATGTGCTATC	
	ATCCTGTAGCCTTTAGAAAAGAAATGCACATCTGTCTGTGCTTATAGCAAAAAGCCACTG	

7.3 Ergebnisse der Real-Time-PCR-Messungen

Exon	13	14	15	16	17	17-x
WT-1 A	1,18	1,10	0,86	1,35	0,85	1,28
WT-1 B	1,03	0,97	0,76	1,15	0,92	0,97
Mittelwert	1,10	1,03	0,81	1,24	0,98	1,18
Abweichung	0,07	0,06	0,04	0,10	0,06	0,10
WT-2 A	0,93	0,88	0,93	0,95	0,90	0,90
WT-2 B	0,98	0,95	1,02	1,04	0,95	0,95
Mittelwert	0,95	0,91	0,97	0,99	0,92	0,92
Abweichung	0,02	0,03	0,04	0,04	0,02	0,02
19544 A	2,10	2,37	1,00	0,54	1,41	1,25
19544 B	1,39	1,52	1,11	0,51	1,17	1,12
Mittelwert	1,74	1,94	1,05	0,52	1,28	1,18
Abweichung	0,35	0,42	0,05	0,01	0,11	0,06
19545 A	1,08	1,11	1,06	0,62	0,99	0,90
19545 B	0,94	1,22	1,14	0,59	1,05	0,95
Mittelwert	1,01	1,16	1,09	0,60	1,01	0,92
Abweichung	0,07	0,05	0,03	0,01	0,02	0,02
19549 A	0,76	0,94	1,18	0,52	1,11	1,01
19549 B	0,64	0,98	1,34	0,50	1,22	1,01
Mittelwert	0,69	0,95	1,26	0,50	1,16	1,01
Abweichung	0,06	0,02	0,07	0,01	0,05	0,01
21962 A	0,91	0,92	1,04	0,49	0,78	1,23
21962 B	1,43	1,02	1,01	0,46	0,98	0,91
Mittelwert	1,16	0,97	1,02	0,47	0,88	1,07
Abweichung	0,26	0,05	0,01	0,01	0,09	0,16
21969 A	0,92	1,47	1,10	0,39	0,75	1,16
21969 B	0,87	1,77	1,15	0,33	0,85	1,08
Mittelwert	0,89	1,62	1,12	0,36	0,79	1,12
Abweichung	0,02	0,14	0,02	0,03	0,05	0,04
21940 A	0,89	0,51	0,42	0,64	0,64	0,90
21940 B	1,08	0,60	0,51	0,51	0,76	1,22
Mittelwert	0,98	0,55	0,46	0,572	0,70	1,05
Abweichung	0,09	0,04	0,04	0,06	0,06	0,16