

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

**Molekulare Charakterisierung
des *COPS5*-Gens und seines Genproduktes
als Kandidat für die Spastische Spinalparalyse**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
André Eisenberg

aus
Hildesheim

Göttingen 2009

D e k a n: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wilichowski

Tag der mündlichen Prüfung: 07.03.2011

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Hereditäre Spastische Paraplegien	1
1.1.1 Überblick.....	1
1.1.2 Klinisches Bild.....	1
1.1.3 Genetik.....	2
1.2 Spastin.....	4
1.3 Mutationen in putativen Interaktionspartnern des Spastins als Ursache einer HSP	5
1.4 Ziele dieser Arbeit.....	7
2 MATERIAL UND METHODEN	8
2.1 Material	8
2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien	8
2.1.2 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)	9
2.1.3 Gebrauchswaren.....	10
2.1.4 Geräte	10
2.1.5 Vektoren.....	11
2.1.6 Oligonukleotide.....	11
2.1.7 Antikörper	12
2.1.8 Bakterienstämme.....	12
2.1.9 Bakterienkulturmedien und LB-Platten	13
2.1.9.1 Bakterienkulturmedien	13
2.1.9.2 LB-Platten	13
2.1.10 Zelllinien und Zellkulturmedien	13
2.1.10.1 Zelllinien	13
2.1.10.2 Zellkulturmedien	14
2.1.11 Puffer und Lösungen.....	14
2.1.12 Sterilisation	14
2.1.13 Datenbanken.....	14

2.2	Methoden	15
2.2.1	Isolierung von Nukleinsäuren	15
2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	15
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	16
2.2.1.3	Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA	17
2.2.1.4	Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks	18
2.2.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
2.2.2	Aufreinigung von Nukleinsäuren	18
2.2.2.1	Ethanol-fällung von DNA	18
2.2.2.2	Aufreinigung von PCR-Produkten über Microcon-PCR-Säulen	19
2.2.2.3	Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	19
2.2.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren	20
2.2.3.1	Analytische Restriktion	20
2.2.3.2	Ligation von DNA-Fragmenten	21
2.2.3.3	TA-Klonierung mit dem pGEM-T-Easy-Vektor-System	21
2.2.4	Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA	22
2.2.5	Gelelektrophorese	22
2.2.5.1	Analytische Gelelektrophorese	22
2.2.5.2	Präparative Gelelektrophorese	23
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
2.2.6.1	PCR an humaner genomischer DNA	24
2.2.6.2	PCR an Plasmid-DNA	26
2.2.6.3	Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)	27
2.2.6.4	Nested-PCR	28
2.2.7	DNA-Sequenzierung	30
2.2.8	Transfer bakterieller Nukleinsäuren auf Nylonfilter	31
2.2.9	Radioaktive Techniken	32
2.2.9.1	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	32
2.2.9.2	Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden	32
2.2.10	Zellkulturtechniken	34
2.2.10.1	Kultivierung von NIH3T3-Zellen	34
2.2.10.2	Transfektion von NIH3T3-Zellen	34
2.2.10.3	Isolierung von Zellkultur-Proteinen	35
2.2.11	Analyse von Fluoreszenzproteinen	36

2.2.12	Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Zellen	36
2.2.13	Co-Immunopräzipitation	37
2.2.14	Proteinchemische Techniken	38
2.2.14.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.2.14.2	Western-Blot (Semi-dry Blot)	39
2.2.14.3	Immunologische Detektion membrangebundener Proteine	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	Expressionsanalyse von <i>Cops5</i> in der Maus durch RT-PCR	42
3.2	Charakterisierung von <i>Cops5</i> als Interaktionspartner des Spastins in NIH3T3-Zellen	44
3.2.1	Synthese der kodierenden Sequenz von <i>Cops5</i> und Klonierung in den pGEM-T-Easy-Vektor	45
3.2.2	Generierung von <i>Cops5</i> -Konstrukten mithilfe bakterieller Expressionssysteme	45
3.2.2.1	Klonierung von <i>Cops5</i> aus pGEM-T-Easy in pQM-NTag/A- Intron	46
3.2.2.2	Klonierung von <i>Cops5</i> aus pGEM-T-Easy in pEGFP-C1	48
3.2.2.3	Klonierung von <i>COPS5</i> aus pGEM-T-Easy in pDsRed2-N1	50
3.2.3	Generierung von Spastin-Konstrukten mithilfe bakterieller Expressionssysteme	52
3.2.4	Subzelluläre Lokalisation des <i>Cops5</i> -Proteins in NIH3T3-Zellen mittels direkter Fluoreszenzanalyse	53
3.2.5	Subzelluläre Lokalisation des Spastin-Proteins in NIH3T3-Zellen mittels immunzytochemischer Fluoreszenzanalyse	54
3.2.6	Interaktionsstudien	56
3.2.6.1	Co-Lokalisation von <i>Cops5</i> und Spastin in NIH3T3-Zellen mittels direkter und immunzytochemischer Fluoreszenzanalyse	56
3.2.6.2	Co-Immunopräzipitation von <i>Cops5</i> und Spastin nach Isolierung aus NIH3T3-Zellen	58
3.3	Sequenzierung des <i>COPS5</i> -Gens von Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP	60
3.3.1	Identifizierung der Exon/Intron-Übergänge und Amplifizierung der Exons von <i>COPS5</i>	61
3.3.2	Veränderungen der <i>COPS5</i> -Sequenz auf DNA-Ebene	61

4	DISKUSSION	63
4.1	Problemstellung	63
4.2	COPS5 als Interaktionspartner des Spastins	64
4.2.1	Struktur, Isoformen und subzelluläre Lokalisation von Spastin	64
4.2.2	COPS5	66
4.2.3	Subzelluläre Lokalisation von Cops5	68
4.2.4	Cops5 interagiert mit Spastin	69
4.2.5	Physiologische Relevanz der COPS5 - Spastin Interaktion	69
4.3	DNA-Analyse von Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP	72
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	ANHANG	76
6.1	<i>Spastin</i> (Homo sapiens) – Kodierende Sequenz für die Isoform II	76
6.2	Spastin (Homo sapiens) – Aminosäuresequenz für die Isoform II	78
6.3	<i>COPS5</i> (Homo sapiens) – Kodierende Sequenz	79
6.4	<i>Cops5</i> (Mus musculus) – Kodierende Sequenz	80
6.5	COPS5 (Homo sapiens) – Aminosäuresequenz	81
6.6	Cops5 (Mus musculus) – Aminosäuresequenz	81
6.7	Aminosäuren-Alignement	82
7	LITERATURVERZEICHNIS	83

Abkürzungsverzeichnis

α	Alpha
AAA	ATPase associated with diverse cellular activity
Abb.	Abbildung
ARHSP	autosomal-rezessive HSP
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3Indoylphosphat
BLAST	engl.: <i>basic local alignment serch tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
cM	centiMorgan
cm ²	Quadratzenimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
COPS5	homo sapiens cop9 constitutive morphogenic homolog subunit 5
CSN	COP9 Signalosome
CSN5	COP9 Signalosome Subunit 5
Cy3	5,5'-disulfo-1,1'di(-carbopentenyl)-3,3,3',3'- Tetramethylinolocarboyanin (cyanin Cy3.18)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP	Dimethylpimelimidatdihydrochlorid

DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ε	Epsilon
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylen-di-amin-tetraessigsäure
EGFP	GFP-Molekül mit den Mutationen F64L und S65T für verbesserte Fluoreszenz-Eigenschaften (Cormack et al., 1996)
et al.	et alii (und andere)
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm, Erdbeschleunigung ($1 \times g = 9.81 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HSP	Hereditäre Spastische Paraplegie
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-b-thiogalactopyranosid
JAB1	Jun Activation Domain-Binding Protein 1
JAMM	Jab1/MPN domain metalloenzyme
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
μ	mikro = 10^{-6}
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromol
m	milli = 10^{-3}
M	Molar
mA	Milliampère
MCS	engl.: <i>multiple cloning site</i> (Polylinker)
mg	Milligramm

min	Minute
MIT	Microtubule Interacting and Trafficking
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOPS	3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure
MPN	Mpr1-Pad1-N-terminal
mRNA	messenger RNA
MT	Mikrotubuli
n	nano = 10^{-9}
NaCl	Natrium-Chlorid
NaOH	Natrium-Hydroxid
NBT	Nitrobalu-Tetrazolium-Chlorid
NCBI	engl. <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NES	nuclear export signal
ng	Nanogramm
NLS	Nuclear Localization Signal
nm	Nanometer
p	piko = 10^{-12}
P	Phosphat
Pa	Pascal
PB	Natriumphosphat Puffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PBT	Phosphat-Tris-gepufferte Solzlösung
PCI	proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3
PCR	engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pmol	Picomol
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	<i>Retinitis pigmentosa</i>
RPGR	<i>Retinitis-pigmentosa-GTPase-Regulator</i>
rpm	engl. <i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur

RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SPG	Spastische Paraplegie
SSC	standard saline citrat
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TM	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodamin-Iso-Thiocyanat
U	engl. <i>Unit</i> = definierte Enzymeinheit
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
x	Mal
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Galaktopyranosid
Y2H	Yeast-two-Hybrid

Symbole für Aminosäuren

A	-	Alanin
C	-	Cystein
D	-	Asparaginsäure
E	-	Glutaminsäure
F	-	Phenylalanin
G	-	Glycin
H	-	Histidin
I	-	Isoleucin
K	-	Lysin
L	-	Leucin
M	-	Methionin
N	-	Asparagin
P	-	Prolin
Q	-	Glutamin
R	-	Arginin
S	-	Serin
T	-	Threonin
V	-	Valin
W	-	Tryptophan
Y	-	Tyrosin

Symbole für Nukleinsäuren

A	-	Adenin
C	-	Cytosin
G	-	Guanin
T	-	Thymin
U	-	Uracil

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung der murinen *Cops5*-Exonstruktur
Seite 42
- Abbildung 3.2:** RT-PCR-Produkt von *Cops5* in murinen Organen und embryonalem Gewebe aufgetrennt in 0,8 %igen Agarosegel
Seite 43
- Abbildung 3.3:** Schematische Darstellung der 1084 bp großen kodierenden Sequenz von *Cops5*
Seite 45
- Abbildung 3.4:** Klonierung von *Cops5* in pQM-NTag/A-Intron
Seite 47
- Abbildung 3.5:** Klonierung von *Cops5* in pEGFP-C1
Seite 49
- Abbildung 3.6:** Klonierung von *COPS5* in pDsRed2-N1
Seite 51
- Abbildung 3.7:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von *Cops5* in NIH3T3-Zellen
Seite 54
- Abbildung 3.8:** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Spastin in NIH3T3-Zellen
Seite 55
- Abbildung 3.9:** Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Co-Lokalisation von *COPS5* mit Spastin in NIH3T3-Zellen
Seite 57

- Abbildung 3.10:** Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Co-Lokalisation von Cops5 mit Spastin in NIH3T3-Zellen
Seite 58
- Abbildung 3.11:** Schematische Darstellung der Co-Immunopräzipitation
Seite 59
- Abbildung 3.12:** Co-Immunopräzipitation von Cops5 und Spastin nach Isolierung aus NIH3T3-Zellen
Seite 60
- Abbildung 3.13:** Basenaustausch im *COPS5*-Gen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP
Seite 62
- Abbildung 4.1:** Schematische Darstellung der Spastin-Struktur
Seite 64
- Abbildung 4.2:** Schematische Darstellung der COPS5-Struktur
Seite 67

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der Genloci und der entsprechenden Genprodukte im Zusammenhang mit der Spastischen Paraplegie

Seite 3

Tabelle 1.2: Lokalisation der vier Gene der putativen Interaktionspartner des Spastins und ihr assoziierter HSP-Locus

Seite 6

Tabelle 3.1: Übersicht der Veränderungen im *COPS5*-Gen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Hereditärer Spastischer Paraplegie

Seite 62

Tabelle 4.1: Übersicht der Spastinisoformen und ihrer Molekulargewichte

Seite 66

Tabelle 4.2: Übersicht der autosomal-rezessiven Genloci und der entsprechenden Genprodukte im Zusammenhang mit der Spastischen Paraplegie

Seite 73

1 Einleitung

1.1 Hereditäre Spastische Paraplegien

1.1.1 Überblick

Die Hereditären Spastischen Paraplegien (HSP) bilden eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Neben anderen Synonymen sind sie nach ihren Erstbeschreibern auch unter dem Begriff Strümpell-Lorrainsche Erkrankung bekannt. Der Leipziger Neurologe Adolf Strümpell lieferte 1880 die erste ausführliche Darstellung des Krankheitsbildes.

Hauptkennzeichen ist eine progrediente spastische Tonuserhöhung mit Hyperreflexie der unteren Extremitäten (Bruyn und Scheltens, 1991). Diese Symptomatik findet ein neuropathologisches Korrelat in einer Degeneration der kaudalen Pyramidenbahn und der Hinterstränge des Rückenmarks (Harding, 1984).

Die epidemiologische Datenlage zur HSP ist schwach und scheint regionale Unterschiede zu zeigen. In West-Norwegen wird die Prävalenz auf 14/100 000 Einwohner geschätzt (Skre, 1974), während sich in Dänemark eine Prävalenz von 0,9/100 000 Einwohner fand (Werdelin, 1986).

Da die Erkrankung einer kausalen Therapie noch nicht zugänglich ist, beschränkt sie sich auf eine rein symptomatische Behandlung mit Physiotherapie und Antispastika (Paulus et al., 2002).

1.1.2 Klinisches Bild

Die HSP zeigt zwei erkennbare zeitliche Krankheitsgipfel. Der erste liegt vor dem sechsten Lebensjahr, der zweite zwischen dem zweiten und vierten Lebensjahrzehnt (Paulus et al., 2002). Weitere Symptome neben einer Muskelschwäche sind ein positives Babinski-Zeichen, Blasenentleerungsstörungen und ein reduziertes Vibrationsempfinden in den unteren Extremitäten (Bruyn und Scheltens, 1991).

Man unterscheidet zwischen einer unkomplizierten bzw. reinen und einer komplizierten Form der HSP. Bei letzterer treten zusätzliche neurologische

Symptome in Erscheinung. Dazu zählen Taubheit, Optikusatrophie, Demenz und mentale Retardierung (Fink, 2002).

Harding (1981) unterteilte die unkomplizierte autosomal-dominante HSP klinisch anhand des Alters bei Symptomaufreten in einen vor dem 35. Lebensjahr auftretenden Typ 1 und einen nach dem 35. Lebensjahr auftretenden Typ 2. Neben dem unterschiedlich starken Hervortreten von Spastik und Muskelschwäche unterscheiden sich diese durch eine raschere Progredienz und vermehrte Begleitsymptomatik beim Typ 2. Allerdings ist Auftreten und Ausprägung der Symptomatik einer inter- und intrafamiliären Variabilität unterworfen (Sauter et al., 2002).

1.1.3 Genetik

Das Vererbungsmuster der HSP folgt, sowohl für die reinen als auch die komplizierten Formen, autosomal-dominanten, autosomal-rezessiven und X-chromosomal-rezessiven Erbgängen.

Die häufigste Form ist mit bis zu 80 % die autosomal-dominante HSP (Tallaksen et al., 2001). Während auf die autosomal-rezessive Form etwa 20 % entfallen, ist die X-chromosomale HSP selten und nur in einzelnen Familien anzutreffen. Insgesamt konnten bis dato 39 Loci mit HSP assoziiert und 16 Genprodukte identifiziert werden (Tab. 1.1). Das zum Locus 2p21-24 gehörige *SPG4*-Gen konnte 1999 von Hazan et al. isoliert und Mutationen in diesem bei Patienten mit autosomal-dominanter HSP gezeigt werden. Das aus 17 Exons bestehende Gen erstreckt sich dabei über einen Bereich von etwa 90 kb und kodiert für das Genprodukt Spastin. Mutationen in diesem Gen sind für ungefähr 40 % der gesicherten autosomal-dominanten HSP verantwortlich (Sauter et al., 2002).

	Genlocus	Genprodukt	Vererbung	HSP-Form
<i>SPG1</i>	Xq28	L1-CAM	X-chromosomal	rein und kompliziert
<i>SPG2</i>	Xq22	PLP	X-chromosomal	rein und kompliziert
<i>SPG3A</i>	14q11-q21	Atlastin	autosomal-dominant	rein
<i>SPG4</i>	2p21-p24	Spastin	autosomal-dominant	rein und kompliziert
<i>SPG5</i>	8q12-q13	noch unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG6</i>	15q11	NIPA 1	autosomal-dominant	rein
<i>SPG7</i>	16q24.3	Paraplegin	autosomal-rezessiv	rein und kompliziert
<i>SPG8</i>	8q24.13	KIAA0196	autosomal-dominant	rein
<i>SPG9</i>	10q23.3-q24.2	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
<i>SPG10</i>	12q13	KIF5A	autosomal-dominant	rein
<i>SPG11</i>	2q33.1	Spatacsin	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG12</i>	19q13	unbekannt	autosomal-dominant	rein
<i>SPG13</i>	2q24-q34	HSP60	autosomal-dominant	rein
<i>SPG14</i>	3q27-q28	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG15</i>	14q22-q24	Spastizin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG16</i>	Xq11.2	unbekannt	X-chromosomal	rein und kompliziert
<i>SPG17</i>	11q12-q14	Seipin (BSCL2)	autosomal-dominant	kompliziert
<i>SPG18</i>	Reserviert	-----		-----
<i>SPG19</i>	9q33-q34	unbekannt	autosomal-dominant	rein
<i>SPG20</i>	13q12.3	Spartin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG21</i>	15q22.31	Maspardin	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG22</i>	Reserviert	-----		-----
<i>SPG23</i>	1q24-q32	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG24</i>	13q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein

<i>SPG25</i>	6q23.3-q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG26</i>	12p11.1-12q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG27</i>	10q22.1-q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG28</i>	14q21.3-q22.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG29</i>	1p31.1-1p21.1	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
<i>SPG30</i>	2q37.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG31</i>	2p11.2	REEP1	autosomal-dominant	rein
<i>SPG32</i>	14q.12-q21	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG33</i>	10q24.2	ZFYVE27	autosomal-dominant	rein
<i>SPG34</i>	Xq25	unbekannt	X-chromosomal	rein
<i>SPG35</i>	16q21-q23.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG36</i>	12q23-24	unbekannt	autosomal-dominant	rein
<i>SPG37</i>	8p21.1-q13.3	unbekannt	autosomal-dominant	rein
<i>SPG38</i>	Reserviert	-----		-----
<i>SPG39</i>	19p13	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert

Tab. 1.1: Übersicht der Genloci und der entsprechenden Genprodukte im Zusammenhang mit der Spastischen Paraplegie. SPG = Spastische Paraplegie.

1.2 Spastin

Das 616 Aminosäure lange Genprodukt Spastin gehört zu den Proteinen der AAA-Familie (Hazan et al., 1999). Diese auch AAA-Kassette (ATPase associated with diverse cellular activity) genannte Region stellt eine hochkonservierte ATPase-Domäne da. Mitglieder dieser Familie zeichnen sich durch eine Beteiligung an zellulären Prozessen wie Zellzyklusregulation, Proteolyse im 26S-Proteasomensystem und Vesikeltransport aus (Patel und Latterich, 1998).

Mittlerweile sind über 100 Spastinmutationen beschrieben, darunter eine Vielzahl von Missensemutationen, Nonsensemutationen, Leserahmenverschiebungen und

Spleißmutationen, sowie weniger häufig Deletionen (Reid, 2003). Die Mutationen liegen verteilt über das gesamte Gen, wobei die am häufigsten auftretenden Missensemutationen eine Akkumulation in dem für die AAA-Kassette kodierenden Bereich zeigen (Bürger et al., 2000; Fonknechten et al., 2000; Lindsey et al., 2000; Sauter et al., 2002). Eine Ausnahme bildet hier das Exon 4 des *SPG4*-Gens, in dem bisher keine Mutationen identifiziert werden konnten. Im Blut und Gehirn konnten alternativ gespleißte Varianten des *SPG4*-Transkriptes nachgewiesen werden. Insbesondere im Rückenmark finden sich *SPG4*-Transkripte ohne das Exon 4 (Svenson et al., 2001; Proukakis et al., 2002).

Die subzelluläre Lokalisation des Spastins ist ebenso wie seine Funktion noch Diskussionsgegenstand. Während eine Studie die Lokalisation von Spastin im Nukleus postulierte (Charvin et al., 2003), demonstrierten Beetz et al. (2004) eine Expression auch im Zytoplasma. Zusätzlich fand sich eine komplexe subzelluläre Lokalisation in Abhängigkeit vom Zellzyklus (Errico et al., 2004). Studien zeigten, dass Spastin an der Dynamik des Zytoskeletts beteiligt ist. Durch die in der N-terminalen Region gelegene MIT (Microtubule Interacting and Trafficking)-Domäne interagiert Spastin mit den Mikrotubuli des Zytoskeletts (Errico et al., 2002). Demgegenüber wird auch auf eine mögliche Rolle des Spastins im intrazellulären Membranverkehr verwiesen (Reid et al., 2005).

1.3 Mutationen in putativen Interaktionspartnern des Spastins als Ursache einer HSP

Die autosomal-dominant vererbte Form der HSP ist mit Abstand die häufigste. Innerhalb dieser Gruppe wiederum haben Mutationen im *SPG4*-Gen einen Anteil von 40 %, Mutationen im *SPG3A*-Gen von 10 % (Zhao et al., 2001). Das bedeutet, eine molekulargenetische Analyse dieser beiden Gene in klinisch diagnostizierten Patienten mit HSP deckt etwa die Hälfte der ursächlichen Mutationen auf. Jedoch lässt sich bei den anderen Patienten so die zugrunde liegende Mutation nicht finden. Hier besteht die Möglichkeit, dass andere mit HSP assoziierte Gene ursächlich sind, ein als genetische Heterogenität bezeichnetes Prinzip.

Heterogenität findet sich auch bei der *Retinitis pigmentosa* (RP), einer Erkrankung mit Nachtblindheit und fortschreitender Einschränkung des Gesichtsfeldes

(Heckenlively, 1988). Sie beruht auf einer progressiven Degeneration von Photorezeptorzellen durch Apoptose (Portera-Cailliau et al., 1994). Ähnlich wie bei der HSP ist das Vererbungsmuster in den meisten Fällen autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal. Inzwischen sind 45 Genorte und eine Vielzahl von Genprodukten bekannt (Hamel, 2006). Meindl et al. konnten 1996 das *RP3*-Gen identifizieren, das ein RPGR (*Retinitis-pigmentosa*-GTPase-Regulator) genanntes Protein codiert. Mittels des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnte ein Interaktionspartner von RPGR, ein folglich RPGR-interacting protein 1 genanntes Genprodukt, identifiziert werden. Dieses verursacht im Falle von Mutationen ebenfalls eine RP (Roepman et al., 2000).

Ableitend aus dieser Tatsache ließ sich postulieren, dass auch Interaktionspartner des Spastins Kandidaten einer HSP sein könnten. Unter Verwendung des Yeast-Two-Hybrid-Systems konnten im Rahmen einer Diplomarbeit vier putative Interaktionspartner des Spastins als mögliche Kandidatengene für die HSP identifiziert werden (Böhm, 2003). Auffällig ist, dass diese vier Loci in Bereichen lokalisierten, die direkt oder in der Nachbarschaft von HSP-assoziierten Loci liegen. Diese sind in Tabelle 1.2 aufgeführt.

Putativer Interaktionspartner	Genlocus	Assoziierter HSP-Locus
COPS5	8q12.3	<i>SPG5</i>
FLJ40626	10q23.3-24.2	<i>SPG9</i>
Reticulon1	14q22	<i>SPG15</i>
Reticulon3	11q13	<i>SPG17</i>

Tab. 1.2: Lokalisation der vier Gene der putativen Interaktionspartner des Spastins und ihr assoziierter HSP-Loci (nach Böhm 2003).

1.4 Ziele dieser Arbeit

Zu den bisher bekannten HSP-Loci sind bis dato nur weniger als die Hälfte der entsprechenden Genprodukte identifiziert. Daher kommen Mutationen in Genen für putative Interaktionspartner des Spastins, wie *COPS5*, als genetische Ursache für eine HSP in Frage. Würde sich diese Hypothese als richtig erweisen, könnte eine molekulargenetische Analyse dieser Gene etabliert werden und so einem weiteren Teil der HSP-Patienten helfen, ihre Krankheitsursache zu definieren. Daher waren die Ziele dieser Arbeit:

1. Transkriptanalyse des murinen *Cops5* in verschiedenen Organen von Wildtyp-Mäusen mittels RT-PCR.
2. Co-Lokalisationsstudien und Interaktionsstudien von *Cops5* mit Spastin mittels Immunfluoreszenz und Co-Immunopräzipitation zur Verifikation der Interaktion.
3. Sequenzierung des *COPS5*-Gens von Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP, bei denen Mutationen im *SPG4*- und *SPG3A*-Gen nicht detektiert werden konnten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Bioreagenzien

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	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
Agarose	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Ampicillin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BCIP	Boehringer, Mannheim
Blocking Reagenz	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
BSA (Faktor V)	Biomol, Hamburg
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Coomassie-Brilliant-Blau R250	Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen
DEPC	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
DMEM	Gibco/BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
dNTPs	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

Glycerin	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
IPTG	Biomol GmbH, Hamburg
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Lachsspermien-DNA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
NBT	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
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
T4-DNA-Ligase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Tris Base	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Tween-20	Fluka, Deisenhofen
Vectashield Mounting® Medium	Paesel & Lorei GmbH & Co., Hanau
X-βGal	Biomol GmbH, Hamburg

2.1.2 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme („Kits“)

DYEnamic ET-Terminator Mix	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Hexalabel™ DNA Labeling Kit	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
HotStar Taq-Mastermix	QIAGEN GmbH, Hilden
Lipofectamin2000™ Transfection Reagenz	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pGEM®-T Easy Vector System	Promega GmbH, Mannheim
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAGEN EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
ROCHE® One Step RT-PCR Kit	Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim

2.1.3 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 Nitrocellulose	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
MicroSpin TM S-200 H	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Montage®PCR filter devices	Millipore GmbH, Schwalbach
Plastikwaren	Greiner, Solingen und Falcon, Heidelberg
Röntgenfilm Hyperfilm TM MP	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg
Sterilfilter	Sartorius AG, Göttingen
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

2.1.4 Geräte

Entwicklungsgerät Gevomatic 110 U	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 TM	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel

2.1.5 Vektoren

pGEM-T Easy	Promega, Mannheim
pDsRed2-N1	BD Clontech, Heidelberg
pEGFP-C1	BD Clontech, Heidelberg
pQM-NTag/A intron	Abcam, Cambridgeshire, UK

2.1.6 Oligonukleotide

Die folgend aufgeführten Primer (Länge in Basenpaaren) wurden durch die Firma Qiagen (Hilden) synthetisiert und nach Erhalt mit dH₂O auf eine Konzentration von 100 pmol/μl gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Name	Sequenz 5' – 3'	Länge
Cop-1F	CGT CAT GTC CCG GAA AGG TCC CTG TCT TC	29
Cop-1R	GTC GGT GAA AGC TCT TCA CCC CTT TCA C	28
Cop-2F	GTA GTC TAC ACT CCC TTT CCA TCG CTC T	28
Cop-2R	CAG GCT TTT AAT CTC GTA CAT TTT ACA TAT	30
Cop-3F	GCC CAT AGA TTT CGC ATC TGG GCT GAG	27
Cop-3R	GTC CCA GCT TCT AAG AGA TGG AAT TCA C	28
Cop-4F	CTG TGA GAC ACT TAT ATT ACC CTC TTA CTG	30
Cop-4R	GAG TTG GCT TGA GCC TAG GCG ATG AAG GCT G	31
Cop-5F	GCC TCC GAA AGT TAA TAA TCC TAT TAT TAG	30
Cop-5R	GGA CTG GTT GAT ATC TAA GGT TTC TTT AGG	30
Cop-6F	GTA GGA GAT TTG GAT CCA CAA CCC TTG AAG	30
Cop-6R	GGC CAA GTC AGG TAT AGC CTT TCT GTG	27
Cop-7F	CCT CAC TGA CTA TTC ACT CAG ATT TTA CAG	30
Cop-7R	CAG GTA CCA TTC TAA GTT GTA ACT AAC TTG	30
Cop-8F	GGA GTT ACA TGG ATG GAT TGG GGC TGA TC	29
Cop-8R	CCG TAA TGG ATA CTA GAA AAA TAT TGC G	28
F1-cops5	GGA AGG TCC AAA GCC CGC ACG CTG AGG C	28
F2-cops5	TCT TGA TTG TGG AGC GAC AGC TTC TCC GGT	30
R1-cops5	TTT TAT TAC AGT GCT AAT ACT CAG GAC A	28
R2-cops5	TTC CTT CCA CAC ACC AGC TTT GAG AAG T	28
R3-cops5	CCG AGC ATC AAA CCC ATC ACT TCC AAG T	28
R4-cops5	AGC AAC GTT AAT CTG ATT AAA CAG TTT AT	29
F1-COPS5	ATA ATT TTC CGA GAC AAG ATG TTC TCA TTT	30
F2-COPS5	TCC CGT GGT GCG GAG GGT CAA GGC CCA CAC	30
R1-COPS5	GGA CAC TTC AGA GCA CCT TAT ACT TCT AAT	30

R2-COPS5	CTG TCT TTC AGG TAA AGT ACT TCT CAG AGA	30
F-Redhuman	CAA GCT TTC GGC GAT GGC GGC GTC CGG G	28
R-Redhuman	GGG ATC CGG AGA GAT GTT AAT TTG ATT	27
(F)-EGFP	CAA GCT TCC GCA GCT TCC GGG AGT GGT ATG	30
(R)-EGFP	GAG ATC TCT AAG CAA CGT TAA TCT GAT T	28
(F)-pQM-NTag	CAA GCT TGC AGC TTC CGG GAG TGG TAT G	28
(R)DsRed2-N1	CAC GGT GCC CTC CAT GCG CAC CTT GAA	27
(F)pEGFP-C1	CGA TCA CAT GGT CCT GCT GGA GTT CGT	27
(F)pQM-NTag/A-I.	TCT AGA GCC ATG GGT TCA AGT ACT TCT	27

2.1.7 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen:

monoklonales Kaninchen-Anti-Myc-IgG

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Cy3-Konjugat

Ziege-Anti-Maus-IgG-FITC-Konjugat

Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat

Der folgende Antikörper wurde von der Firma Acris GmbH (Hiddenhausen) bezogen:

monoklonales Maus-Anti-E2-IgG

2.1.8 Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden wurden kompetente Bakterien vom Stamm *Escherichia coli* K12 DH 5 α der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

Genotyp: F⁻ ϕ 80d *lacZ* Δ M15 *endA1 recA1 hsdR17* (*r_K*⁻, *m_K*⁺) sup E44 *thi-1 d-gyrA96* Δ (*lacZYA-arg*)

2.1.9 Bakterienkulturmedien und LB-Platten

2.1.9.1 Bakterienkulturmedien

LB (Luria Bertani) -Medium (pH 7,5)	1 % (w/v) Pepton
	0.5 % (w/v) Hefe Extrakt
	0.5 % (w/v) NaCl

Das Medium wurde mit dH₂O angesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf etwa 50°C wurden optional Antibiotika aus einer Stammlösung nach u.g. Schema zur selektiven Anzucht hinzugegeben.

Ampicillin Medium	50 mg/ml Stammlösung auf eine Endkonzentration von 50 µg/ml
-------------------	---

Kanamycin Medium	25 mg/ml Stammlösung auf eine Endkonzentration von 25 µg/ml
------------------	---

2.1.9.2 LB-Platten

Für die Herstellung von LB-Platten wurde entsprechendes LB-Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % (w/v) Agar versetzt und zusammen mit 1mM IPTG und 2 % X-Gal in Petrischalen gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Platten, ebenso wie das Flüssigmedium, bei 4°C gelagert.

2.1.10 Zelllinien und Zellkulturmedien

2.1.10.1 Zelllinien

Bei der zur Transfektion genutzten Zelllinie handelt es sich um embryonale Mausfibroblasten (NIH3T3-Zellen).

[Swiss 3T3, American Type Culture Collection, Rockville, USA “NIH Swiss Mouse”]

2.1.10.2 Zellkulturmedien

Als Medium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS), 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 % Natrium Pyruvat, sowie 2 mM L-Glutamin versetzt.

2.1.11 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. Sie sind, sofern nicht vom Hersteller stammend, in ihrer Zusammensetzung direkt mit der jeweiligen Methode beschrieben.

2.1.12 Sterilisation

Gebrauchsgüter, Lösungen und Kulturmedien wurden je nach Eignung, in der Regel bei 121°C und 10⁵ Pa für mindestens 20 min im Dampfdruckautoklaven (Webco, Bad Schwartau) autoklaviert oder für 8 - 12 Stunden bei 180°C hitzesterilisiert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden sterifiltriert (Sterilfilter mit Porengröße 0,2-0,45 µm).

2.1.13 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.

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

Die sog. Minipräp erlaubt die schnelle Isolierung einer geringen Menge von Plasmid-DNA zum Zwecke ihrer Analyse.

Hierfür wurden 5 ml LB-Medium, mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums (zumeist Ampicillin oder Kanamycin), mit einer *E. coli* Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler bei 160 rpm inkubiert. Nach Abnahme von 500 µl der Übernachtskultur zur Herstellung eines Glycerinstocks wurde der Rest der Bakterienkultur in einem E-Cup bei 4000 x g für 10 min pelletiert und der Überstand dekantiert. Resuspendiert und gevortext in 200 µl P1-Lösung wurden die Bakterienzellen mittels 200 µl P2-Lösung unter kurzem vorsichtigem Schwenken und Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur lysiert. Die Lyse wurde anschließend durch Zugabe von 200 µl P3-Lösung gestoppt. Zentrifugation bei 14.000 x g für 20 min bewirkte eine Abtrennung von Proteinen, Membranbestandteilen und bakterieller genomischer DNA, während die Plasmid-DNA im klaren Überstand in Lösung blieb. Überführt in ein neues E-Cup wurde aus dem Überstand die DNA durch 700 µl kaltes Isopropanol, sowie nochmaliger Zentrifugation bei 14000 x g für 20 min präzipitiert. Nach erneutem Verwurf des Überstandes wurde das Pellet mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen. Nach der letztmaligen Zentrifugation bei 14000 x g für 10 min und Trocknen des Pellets wurde die Plasmid-DNA in 20 µl Ampuwa Wasser gelöst und konnte nach Testung der Präparationseffizienz mittels gelelektrophoretischer Auftrennung bei -20°C gelagert werden.

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

2.2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Mittels der sog. Midipräp wurden größere Mengen Plasmid-DNA unter Verwendung des Qiagen Midi Plasmid Kits in Anlehnung an das Protokoll des Herstellers präpariert. Die Methode beruht auf einer Modifikation der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und anschließender Aufreinigung über eine Anionenaustauschersäule.

Eine *E.coli* Kolonie wurde in 200 ml LB-Medium, versetzt mit einem entsprechenden Selektionsantibiotikum, inokuliert und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen der Übernachtskultur wurden bei 5000 x g für 20 min und 4°C abzentrifugiert und das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 4 ml RNase-haltiger P1-Lösung aufgenommen. Im Anschluss an eine Überführung der Suspension in ein Zentrifugenröhrchen wurden zur Lyse der Zellen 4 ml P2-Lösung zugegeben und nach kurzem Invertieren 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4 ml P3-Lösung zur Neutralisation wurde der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation der Zelltrümmer bei 10000 x g für 20 min bei 4°C. Zeitgleich wurde eine Anionenaustauschersäule mit 4 ml QBT-Lösung äquilibriert. Diese wurde mit dem plasmidhaltigen Zentrifugationsüberstand beladen, so dass die Plasmid-DNA nach Durchlaufen der Lösung an das Säulenmaterial gebunden hatte. Nach zweimaligem Waschen mit 10 ml QC-Lösung wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml QF-Lösung eluiert. Eine Zugabe von 3,5 ml Isopropanol und anschließende Zentrifugation bei 10000 x g für 20 min bei 4°C bewirkte eine Fällung und Sedimentierung der DNA. Abschließend wurde das Pellet mit 2 ml 70 % Ethanol gewaschen und bei 10000 x g für 10 min bei 4°C letztmalig zentrifugiert. Nach Trocknen des Pellets wurde dieses in 200 µl Ampuwa Wasser aufgenommen und konnte nach photometrischer Messung der DNA-Konzentration bei -20°C gelagert werden.

QBT-Lösung (Äquilibrierungspuffer):	750 mM NaCl
	50 mM Mops, pH 7
	15 % (v/v) Ethanol
	0,15 % (v/v) Triton X-100

QC-Lösung (Waschpuffer):	1 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % (v/v) Isopropanol
QF-Lösung (Elutionspuffer):	1,25 M NaCl 50 mM Tris/HCl pH 8,5 15 % (v/v) Isopropanol

2.2.1.3 Endotoxin-freie Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung Endotoxin-freier Plasmid-DNA wurde das EndoFree Plasmid Maxi Kit der Firma Qiagen benutzt. Hierbei ist ein Schritt zur Entfernung der Endotoxine enthalten, ansonsten entspricht das Protokoll der Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.

Zur Transfektion kultivierter Zellen ist es notwendig, Endotoxine nahezu restlos aus der DNA-Lösung zu entfernen. Als Endotoxine werden Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellwand gramnegativer Bakterien (wie *E. coli*) bezeichnet. Während des Lyseprozesses gelangen diese in das Lysat und könnten später die Transfektion sensitiver eukaryontischer Zellen beeinflussen. Ein erhöhter Gehalt an LPS senkt dabei die Transfektionsrate erheblich.

Anzucht und Lyse der Bakterienzellen erfolgte wie unter 2.2.1.2 beschrieben, nur wurde das Lysat jetzt nach Zugabe des Neutralisierungspuffers (P3-Lösung) in eine QIAfilter-Kartusche überführt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Abtrennung des sich dabei sammelnden Präzipitats aus Proteinen, genomischer DNA und Detergens wurde dann der Verschluss der Kartusche entfernt und die Probe unter ständigem Druck durch die Filtrationseinheit in ein Zentrifugenröhrchen filtriert. Nach Zugabe von 2,5 ml ER-Lösung, eines Puffers zur Entfernung von Endotoxinen, wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Der Inkubation folgend wurde die Probe auf eine, zwischenzeitlich mit 10 ml QBT-Lösung äquilibrierte Qiagen-tip-500-Säule, gegeben. Die ER-Lösung verhinderte hierbei die Bindung der LPS an das Material der Säule. Nach zweimaligem Waschen mit 30 ml QC-Lösung wurde die nun Endotoxin-freie DNA mit 15 ml QN-Lösung eluiert. 10,5 ml Isopropanol und 30 minütige Zenrifugation bei 15000 x g und 4°C führten zur Pelletierung der

DNA, die abschließend mit 70 % Ethanol gewaschen wurde. Nach Trocknung wurde das Pellet in einem Endotoxin-freien Trägermedium resuspendiert und konnte nach einer photometrischen Konzentrationsmessung bei -20°C gelagert werden.

ER-Lösung:	Zusammensetzung nicht bekannt
QN-Lösung (Elutionspuffer):	1,6 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7 15 % (v/v) Isopropanol

2.2.1.4 Herstellung von Bakterien-Glycerinstocks

Zur langfristigen Aufbewahrung von Bakterienkulturen wurden Glycerinstocks angelegt. 500 µl einer Bakteriensuspension wurden mit 500 µl sterilem Glycerin versetzt und konnten nach Durchmischen bei -80°C gelagert werden.

2.2.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um gewonnene DNA zu quantifizieren, wurden 2 µl der Probe mit 398 µl dH₂O verdünnt und in eine Präzisionsküvette aus Quarzglas (Hellma) pipettiert. Mit dem auf Xenon-Spektrallinienbasis arbeitenden BioPhotometer der Firma Eppendorf konnte anschließend die Nukleinsäurekonzentration ermittelt werden. Diese basierte auf einer Extinktionsmessung bei 260 nm.

2.2.2 Aufreinigung von Nukleinsäuren

2.2.2.1 Ethanolfällung von DNA

Die Ethanolfällung wurde als Reinigungsschritt eingesetzt um DNA von niedermolekularen Kontaminationen zu befreien und so einer effizienten enzymatischen Weiterverarbeitung zugänglich zu machen.

Zugabe von 1/10 des Ansatzvolumens an 3 M Natriumacetat pH 4,8 sowie des 2,4fachen Volumens an 100 % Ethanol zur DNA mit anschließender Inkubation von 20 min bei -80°C führten zur Präzipitation. Nach Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 % Ethanol einem Waschschrift mit letztmaliger Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, unterzogen. Das getrocknete Pellet wurde abschließend in 20 µl dH₂O aufgenommen.

2.2.2.2 Aufreinigung von PCR-Produkten über Microcon-PCR-Säulen

Um PCR-Produkte von Enzymen, Salzen und Kontaminationen sowie überschüssigen Primern abzuscheiden, wurden diese mittels eines Microcon-PCR-Ultrazentrifugationsröhrchens (Millipore) gefiltert.

Zunächst wurde mittels Agarosegelelektrophorese an einem Aliquot des PCR-Ansatzes überprüft, ob die Amplifikation erfolgreich war. Anschließend wurde der restliche Ansatz auf die Membran einer in einem 1,5 ml Cup sitzende Säule gegeben, mit dH₂O auf 500 µl aufgefüllt und für 15 min bei 3500 x g zentrifugiert. Die Säule wurde gewendet, in ein neues Cup gestellt, mit dem gewünschten Volumen dH₂O befüllt und durch erneute Zentrifugation bei 2000 x g für 5 min die DNA eluiert.

2.2.2.3 Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die vollständige Aufreinigung von aus Agarosegelen isolierten DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraction Kits (Hilden). Zugrunde liegendes Prinzip dieser Methode ist eine durch hohe Salzkonzentrationen reversible Adsorption der DNA an eine Silikatsuspension, während die Salze gleichzeitig die Wasserstoffbrückenbindungen der Agarosepolymere lösen. Am Ende führt ein Absenken der Salzkonzentration wieder zur Elution der DNA.

Das nach elektrophoretischer Auftrennung mittels Skalpell isolierte Gelstück wurde in einem E-Cup gewogen, mit QX1-Lösung sowie mit 10 µl einer Silikonsuspension versetzt und gemischt. Dabei wurde pro 1 mg Gewicht 3 µl Lösung hinzugefügt.

Inkubation des Ansatzes bei 50°C für 10 min auf dem Thermoschüttler bewirkte ein Auflösen der Agarose und binden der DNA an die Silikatpartikel. Zentrifugation bei 10000 x g für 30 sec führte zur Pelletierung der Glasmilch. Nach Abnahme des Überstandes wurde einmalig mit 500µl QXI gewaschen sowie zur Entfernung aller Salze und Verunreinigungen zweimalig mit 500 µl ethanolhaltiger PE-Lösung. Anschließend wurde das Pellet getrocknet und in 20µl Ampuwa Wasser aufgenommen. Der Ansatz wurde nach 5 min Elution der DNA bei Raumtemperatur letztmalig unter selbiger Kondition zentrifugiert und der Überstand in ein neues Cup überführt. Zur Maximierung der Ausbeute konnte dieser Schritt wiederholt werden. 2 µl des Eluats wurden abschließend zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und getestet.

2.2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Analytische Restriktion

Zur Analyse durch Plasmidpräparation gewonnener DNA kann diese mittels geeigneter Restriktionsendonukleasen gespalten und die entstandenen DNA-Fragmente nach gelelektrophoretischer Auftrennung beurteilt werden. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die für das jeweilige Enzym spezifische, in der Regel palindromische Nukleotidsequenzen erkennen und die doppelsträngige DNA spalten.

Für analytische Restriktionen wurden ca. 1 µg DNA in einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl verwandt. Ein typischer Ansatz setzt sich dabei zusammen aus:

1 – 2 µl	DNA
2 µl	10 x Reaktionspuffer (vom Hersteller)
1 – 2 µl	Restriktionsenzym (10 U/µl)
ad 20 µl	dH ₂ O

Die Inkubation des Restriktionsansatzes erfolgte für 2 – 3 h bei für das jeweilige Enzym optimaler Temperatur. Der 10 x Reaktionspuffer wird, nach Vorgabe des

Herstellers, zur Optimierung der Reaktionsbedingungen hinzugefügt und beträgt 1/10 Volumen im Ansatz.

2.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation wurde benutzt, um restriktionsenzymatisch gespaltene und isolierte DNA-Fragmente in linearisierte Vektoren zu integrieren.

Das zu klonierende Fragment sollte dabei in 3fachem molaren Überschuß im Verhältnis zum Vektor dem Ansatz beigefügt werden. Dabei ergab sich folgender 10 µl Ligationsansatz:

50 ng	Vektor-DNA
150 ng	Insert-DNA
1 µl	T4-DNA-Ligase
1 µl	10 x Ligationspuffer (vom Hersteller)
ad 10 µl	dH ₂ O

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.3.3 TA-Klonierung mit dem pGEM-T-Easy-Vektor-System

Zum Einbringen von PCR-Produkten in einen Vektor wurde auf das pGEM-T-Easy-Vektor-System zurückgegriffen. Ausgenutzt wird hierbei die matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität, der für die PCR eingesetzten Taq-Polymerase, die am 3'-Ende ein einzelnes Nukleotid dATP anfügt. Ein T-Überhang am 5'-Ende des pGEM-T Easy-Vektros ermöglicht so die Ligation eines PCR-Produkts zur Klonierung, ohne das kompatible Enden mittels Restriktion erst generiert werden müssen. Der Ansatz erfolgte dabei analog zu 2.2.3.2 .

2.2.4 Transformation kompetenter Zellen mit Plasmid-DNA

Als Transformation bezeichnet man die Übertragung genetischer Information in einen Organismus.

Für die Transformation wurden 5 µl eines über Nacht inkubierten Ligationsansatzes vorsichtig in ein 50 µl Aliquot kompetenter DH5α-Zellen pipettiert und für 30 min unter gelegentlichem Mixen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 sec einem Hitzeschock bei 37°C ausgesetzt und wiederum auf Eis für 2 min abgekühlt. Nach Hinzufügen von 300 µl LB-Medium erfolgte eine 45 minütige Inkubation bei 37°C unter Schütteln auf dem Thermomixer. Abschließend wurden 200 µl des Ansatzes auf spezifisch mit Antibiotika versetzten Agarplatten, für das der Vektor eine Resistenz kodierte, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Wurde das pGEM-T-Easy-Vektor-System verwandt, wurde der Agarplatte neben dem Antibiotikum noch IPTG und X-Gal zur Blau-Weiß-Selektion zugesetzt. Klone mit Insert konnten kein funktionelles Enzym mehr bilden, welches X-Gal zu einem blauen Farbstoff umsetzt, und konnten so selektiert werden.

2.2.5 Gelelektrophorese

2.2.5.1 Analytische Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von PCR-Produkten oder mit Restriktionsenzymen gespaltener DNA diente die Gelelektrophorese mit in Abhängigkeit der Länge der aufgetrennten DNA-Fragmente verschieden konzentrierten Agarosegelen. Färbung mit Ethidiumbromid erlaubte unter dem UV-Transilluminator eine spätere Sichtbarmachung der DNA.

Gewöhnlich wurde 1 g Agarose durch Aufkochen in der Mikrowelle in 100 ml 0,5 x TBE-Puffer (1 %) gelöst und nach Abkühlung auf 60°C mit 10 µl Ethidiumbromid (5 mg/ml) versetzt. Die Agaroselösung wurde so in einen zuvor abgedichteten Gelschlitten mit Probenkamm gegossen und, nach Aushärten zu einem Gel, in eine horizontale Elektrophoresekammer gelegt. Nach Überschichten des Gels mit 0,5 x TBE-Puffer konnten die mit 1/3 Volumen Probenpuffer

versetzten DNA-Proben in die Geltaschen auf Höhe der Kathode aufgetragen werden. Zur Abschätzung der Fragmentgröße wurde gleichzeitig ein Marker als Längenstandard (1Kb-Ladder) mit aufgetragen. Die eingesetzte Spannung variierte, betrug aber zumeist um die 100 V. Die Zeitdauer belief sich abhängig von der Größe der DNA-Fragmente auf 30 bis 60 min.

Beruhend auf dem Prinzip der DNA-Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid, konnte die DNA durch Bestrahlung mittels UV-Licht (= 320 nm) unter einem Transilluminator sichtbar gemacht werden. Im Anschluss erfolgte die photographische Dokumentation.

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

2.2.5.2 Präparative Gelelektrophorese

Die präparative Gelelektrophorese diente der Auftrennung und Isolierung mittels restriktionsenzymatischer Prozesse gewonnener Plasmid-Inserts. Zumeist wurden 1 % Agarosegele verwendet. Nach Abschluss des Laufes wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht mittels eines sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgetrennt, in ein E-Cup überführt und das Gewicht des Gelstücks ermittelt. Die anschließende Aufreinigung erfolgte mit dem QIAEX II Gelextraktion Kit.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

(Mullis und Faloona, 1987)

Mittels der PCR (Polymerase Chain Reaction) können aus geringsten Mengen genetischen Materials innerhalb weniger Stunden spezifische Abschnitte *in vitro* exponentiell amplifiziert werden. Als Vorlage kommen z.B. genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA usw. in Frage.

Die Reaktion beruht auf zwei synthetischen Oligonukleotiden, die den zu amplifizierenden Bereich an beiden Enden flankieren und an den jeweiligen komplementären Strang nach vorheriger Denaturierung binden. Diese in entgegengesetzter Richtung orientierten Strukturen dienen als Ausgangspunkt für die DNA-Synthese mittels einer thermostabilen DNA-Polymerase (isoliert aus dem Archaeobakterium *Thermus aquaticus*), die den Bereich zwischen den Oligonukleotiden neu bildet.

Das Prinzip ist die Wiederholung eines Zyklus von Denaturierung, Primeranlagerung und Synthese des Zweitstranges. Da jeder neu gebildete Strang als Matrize für die Synthese eines weiteren dient, kommt es im theoretisch optimalsten Fall zu einer Verdoppelung der Sequenz und damit im Verlauf zu einer exponentiellen Vervielfältigung des Materials.

2.2.6.1 PCR an humaner genomischer DNA

Vor der Sequenzierung der Exons sowie flankierender Bereiche des *COPS5*-Gens mussten diese mittels spezifischer Primer amplifiziert werden. Nachstehender Reaktionsansatz kam dabei in einem 200 µl PCR-Tube zur Anwendung:

300 - 500 ng	humane genomische DNA
1 µl	„forward primer“ (10 pmol)
1 µl	„reverse primer“ (10 pmol)
25 µl	Hotstart Taq-Polymerase Mix (Qiagen)
ad 50 µl	dH ₂ O

Dieser wurde anschließend gemischt, zentrifugiert und in einem Thermocycler platziert. Folgendes Thermocycler-Programm wurde verwendet:

Initiale Denaturierung	96°C	15 min
Denaturierung	94°C	40 sec
Anlagerung	60°C	50 sec
Verlängerung	72°C	1min
letzter Verlängerungsschritt	72°C	10min.

Die initiale Denaturierung diente auch der Aktivierung der Taq-Polymerase. Der letzte Verlängerungsschritt erfolgte zur Vervollständigung der Synthese begonnener PCR-Produkte nur einmal. Die Schritte Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung hingegen wurden in 35 Zyklen wiederholt.

Nach der Amplifikation wurden 5 µl des PCR-Produktes in einem 1 % Agarosegel aufgetrennt und bezüglich der Größe der Fragmente beurteilt. Die restlichen 45 µl des PCR-Ansatzes wurden durch Aufreinigung einer anschließenden Sequenzierung zugänglich gemacht.

2.2.6.2 PCR an Plasmid-DNA

Die PCR an Plasmiden hatte entweder die Amplifikation des ganzen oder nur von Teilen des Inserts zum Ziel. Ganze Inserts wurden mit Hilfe zweier auf beiden Seiten flankierender vektorspezifischer Primer vervielfältigt. Wurde nur ein Teil des Inserts amplifiziert, geschah dies mit zwei für das Insert spezifischen Primern oder aber mit einem für das Insert spezifischen und einem vektorspezifischen Primer.

Das Reaktionsschema sah dabei wie folgt aus:

3 - 5 ng	Plasmid-DNA
1 µl	“forward primer” (10 pmol)
1 µl	“reverse primer” (10 pmol)
25 µl	Hotstart Taq-Polymerase Mix (vom Hersteller)
ad 50 µl	dH ₂ O

Nach 15 min initialer Denaturierung bei 96°C schlossen sich 35 Zyklen des folgenden Thermocycler Programms an:

Denaturierung	94°C	40 sec
Anlagerung	60°C	50 sec
Verlängerung	72°C	45 – 90 sec.

Die Dauer der Verlängerung variierte je nach Größe des erwarteten PCR-Produktes. Abschließend erfolgte der letzte Elongationsschritt bei 72°C für 10 min. Analog der genomischen DNA wurde eine Kontrolle des Reaktionsproduktes durchgeführt, der sich eine Sequenzierung nach Aufreinigung oder Isolierung anschloss.

2.2.6.3 Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR)

(Kogan et al., 1987)

Die RT-PCR-Technik ist eine Methode, die zum einen einen qualitativen Nachweis einer Genexpression erlaubt, zum anderen ermöglicht sie die Generierung einer cDNA-Sequenz zur weiteren Analyse.

Der RT-PCR dient als Ausgangsprodukt RNA, von der mittels einer Reversen Transkriptase ein der mRNA komplementärer Strang cDNA synthetisiert wird. Daran anschließend wird mittels spezifischer Primer und der cDNA als Matrize in einer PCR das gewünschte DNA-Fragment amplifiziert.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Analysen und Erzeugung humaner sowie muriner cDNA wurde das ROCHE® Titan OneStep RT-PCR Kit verwendet. Dies bietet den Vorteil, dass sowohl Reverse Transkription als auch die PCR in einem Ansatz erfolgen.

1 µg	Gesamt-RNA
10 µl	5 x ROCHE® Titan OneStep RT-PCR Puffer
1 µl	„forward primer“ (10 pmol)
1 µl	“reverse primer“ (10 pmol)
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

Um mögliche Kontaminationen zu erkennen, wurde bei Transkriptionsnachweis eines Gens in Geweben stets eine Nullkontrolle mitgeführt, in der RNA durch Wasser ersetzt wurde.

Das Programm der in einem Thermocycler Applied Biosystems von Perkin Elmer ablaufenden RT-PCR gliederte sich wie folgt. Zunächst wurde die Reverse Transkription bei 50°C für 30 min mit Erzeugung einer einzelsträngigen cDNA durchgeführt. Anschließend nach Aktivierung der Polymerase bei 94°C für 2 min, schlossen sich 10 Zyklen des folgenden Programms an:

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

Nach diesen 10 Zyklen schlossen sich noch einmal 25 Zyklen mit jeweils einer Ausdehnung des Verlängerungsschrittes um 5 sec an, um den sukzessiven Wirkungsverlust der Polymerase zu kompensieren. Abschließend erfolgte ein letzter Verlängerungsschritt bei 68°C für 7 min. Nach Reaktionsende wurden Aliquots der PCR-Produkte im Agarosegel analysiert.

2.2.6.4 Nested-PCR

Ist die Ausgangsmenge an genetischem Material sehr gering, so existieren grundsätzlich zwei Möglichkeiten, eine ausreichende Amplifikatmenge zu erhalten: erstens die Steigerung der Anzahl der Zyklen, hier besteht aber eine steigende Wahrscheinlichkeit von Fehlhybridisierungen; zweitens eine Nested-PCR durchzuführen.

Mittels dieser Methode ist es möglich die Spezifität und Effizienz einer PCR weiter zu erhöhen, da das PCR-Produkt einer ersten Amplifikation als Vorlage für eine zweite PCR verwendet wird. Diese zweite PCR wird mit neuen spezifischen Primern durchgeführt, die innerhalb der Fragmente der ersten PCR liegen. Der folgende Ansatz wurde verwendet:

1 µl	PCR-Produkt
1 µl	“forward primer 2” (10 pmol)
1 µl	“reverse primer 2” (10 pmol)
25 µl	Hotstart Taq-Polymerase Mix (vom Hersteller)
ad 50µl	dH ₂ O

An 15 min initialer Denaturierung und Enzymaktivierung bei 96°C schlossen sich 35 Zyklen im Thermocycler des folgenden Programms an:

Denaturierung	94°C	40 sec
Anlagerung	60°C	50 sec
Verlängerung	72°C	1 min
letzter Verlängerungsschritt:	72°C	10 min.

Dem letzten zur Vervollständigung der Synthese begonnener PCR-Produkte nur einmal durchgeführten Verlängerungsschritt folgte die Auftrennung von 5 µl des PCR-Produktes in einem 1 % Agarosegel. Die restlichen 45 µl des PCR-Ansatzes wurden durch Aufreinigung einer anschließenden Sequenzierung zugänglich gemacht.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Modifiziert, nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger et al. (1977), ermöglicht die Sequenzierung die Ermittlung der Basenabfolge eines DNA-Fragments. Grundlegendes Prinzip ist der statistisch an jeder Stelle erfolgende Abbruch der Strangsynthese durch die Zugabe fluoreszenzfarbstoffmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs).

Identisch einer PCR bindet ein sequenzspezifischer Primer an die denaturierte DNA, um einer Polymerase als Startpunkt für die Synthese eines komplementären Stranges unter Einbau der vier Desoxynukleotide (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) zu dienen. Anders als bei der PCR bewirkt nun aber die limitierte Zugabe der ddNTPs einen basenspezifischen Synthesestopp für den Fall ihres Einbaus. Mittels der Fluoreszenzmarkierung können an den resultierenden Fragmenten unterschiedlicher Länge, im Anschluss an eine elektrophoretische Auftrennung, durch die Fluorographie die Position des Kettenabbruchs sichtbar gemacht werden und so auf die Sequenz geschlossen werden.

Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte die Sequenzanalyse mit Hilfe eines auch für die vorausgegangene PCR-Reaktion benutzten Primers. Folgender Ansatz lag dabei der Reaktion zugrunde:

1 µg	Plasmid DNA
oder	
0,5 µg	aufgereinigtes PCR-Produkt
1 µl	spezifischer Primer (10 pmol)
4 µl	DYEnamic ET-Terminator-Mix (vom Hersteller)
ad 20µl	dH ₂ O

Die Reaktion erfolgte nach 5 min initialer Denaturierung der DNA-Fragmente bei 95°C für 25 Zyklen in einem Thermocycler nach folgendem Sequenzierprogramm:

Denaturierung	95°C	20 sec
Anlagerung	55°C	30 sec
Verlängerung	60°C	2 min.

Einem letzten Verlängerungsschritt von 10 min bei 75°C folgte die Aufreinigung der DNA-Fragmente in einer Sephadex-Säule, bevor diese mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers vom Modell MegaBace1000 (Amersham Bioscience, Freiburg) ausgewertet wurden.

2.2.8 Transfer bakterieller Nukleinsäuren auf Nylonfilter

Um möglichst schnell und effektiv nach einer Transformation eine größere Anzahl von Bakterienkolonien auf eine Plasmidintegration hin zu überprüfen, wurde die Koloniehybridisierung eingesetzt.

Ein Optitran BA-S85 Nylonfilter wurde mit einem 9 x 9 Felder großen Quadrat beschriftet und auf eine, mit einem Antibiotikum der Bakterienresistenz entsprechende, Agarplatte gelegt. Analog wurde eine zweite Platte ohne Nylonfilter beschriftet. So konnten bis zu 81 Kolonien mit sterilen Zahnstochern erst auf dem Filter, dann in dem korrespondierenden Quadrat auf der Agarplatte ohne Filter ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert werden. Am nächsten Tag wurde der Nylonfilter auf getränktem Blottingpapier wie folgt inkubiert:

5 min	10 % (w/v) SDS
3 min	Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH 1,5 M NaCl
10 min	Neutralisierungslösung: 1,5 M NaCl 0,5 M tris/HCl, pH 7,4
2 x 5 min	2 x SSC.

Abschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht im UV-Stratalinker auf dem Filter fixiert. Der Filter konnte so direkt für eine Hybridisierung mittels ³²P radioaktiv markierter DNA-Sonden genutzt werden oder wurde luftgetrocknet bei 4°C gelagert.

2.2.9 Radioaktive Techniken

2.2.9.1 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Mit ^{32}P radioaktiv markierte DNA-Sonden wurden für eine anschließende Koloniehybridisierung generiert. Das Verfahren wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers mit dem Hexalabel™ DNA Labeling Kit durchgeführt.

Grundlage des Verfahrens bildet das „random priming“ nach Feinberg und Vogelstein (1983). Kurze Oligonukleotide, die mit hoher Wahrscheinlichkeit in jeder denaturierten DNA-Sequenz binden, dienen als zufälliger Startpunkt einer Polymerase für die Synthese des komplementären DNA-Stranges. Der Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (Desoxycytosintriphosphat mit dem α -ständigen Phosphorisotop ^{32}P) bewirkt die Radioaktivität der Sonde.

Zunächst wurden etwa 30 – 50 ng der zu markierenden DNA und 10 μl 5 x Hexanukleotid-Puffer mit dH_2O auf ein Gesamtvolumen von 40 μl aufgefüllt und für 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Nach 3 min Inkubation auf Eis wurden 3 μl MixC (dNTPs ohne dCTP), 1 μl Klenow Fragment sowie 3 μl $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ hinzugegeben und bei 37°C für 10 min inkubiert. Unter gleicher Bedingung wurde die Synthese des komplementären Stranges nach Zugabe von 4 μl dNTP-Mix weitere 5 min fortgesetzt. Das Hinzufügen von 150 μl dH_2O beendete die Reaktion und der Ansatz konnte auf eine MicroSpin™-Aufreinigungssäule gegeben werden, um vor allem nicht eingebautes radioaktives dCTP zu entfernen. Im Anschluß an die Zentrifugation bei 800 x g für 2 min wurde das Eluat bei 95°C für 10 min zur Erzeugung der einzelsträngigen Sonden denaturiert und konnte nach Abkühlung für 3 min auf Eis für die Koloniehybridisierung genutzt werden.

2.2.9.2 Hybridisierung radioaktiv markierter Sonden

Die Hybridisierung beschreibt einen Vorgang, bei dem sich an einen Einzelstrang einer Nukleinsäure ein komplementärer Nukleinsäureeinzelstrang anlagert. Sie erlaubt mit Hilfe einer zuvor markierten Sonde z. B. die spezifische Detektierung membranfixierter Nukleinsäuren.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wird zunächst zur Verringerung unspezifischer Bindungen der Sonde eine Prähybridisierung durchgeführt. Der Nitrocellulosefilter wurde mit 2 x SSC äquilibriert und mit der nukleinsäurebehafteten Seite nach innen in ein mit 2 x SSC gefülltes Hybridisierungsgefäß eingebracht. Die Flüssigkeit wurde dekantiert, so dass der Filter luftblasenfrei an der Wand des Reaktionsgefäßes zum Liegen kam und 10 ml „rapid-hyb buffer“ sowie 300 µl denaturierte Lachsspermien-DNA zugegeben. Die Prähybridisierung erfolgte für mindestens 2 h bei 65°C.

Für die Hybridisierung wurde anschließend die mit ³²P radioaktiv markierte Sonde hinzugefügt und über Nacht bei 65°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 2 x 10 min in Waschlösung I bei 65°C im Wasserbad geschwenkt und nachfolgend bei selbiger Temperatur in Waschlösung II inkubiert bis die Hintergrundaktivität ausreichend reduziert werden konnte. Der Filter wurde nachfolgend luftgetrocknet und in Folie laminiert. Danach mit einem Röntgenfilm in eine Autoradiographiekassette gelegt und bei -80°C je nach Aktivität variierend von Stunden bis Tage exponiert. Abschließend wurde der Film in einem automatischen Entwickler gegeben und positive Klone konnten lokalisiert werden. Die während des Transfers der bakteriellen Nukleinsäure auf den Nylonfilter angelegte zweite korrespondierende Agarplatte stellte die gewünschten rekombinanten Klone zur weiteren Bearbeitung zur Verfügung.

Waschlösung I	0,2 % (w/v) SDS in 2 x SSC
Waschlösung II	0,2 % (w/v) SDS in 0,2 x SSC

2.2.10 Zellkulturtechniken

2.2.10.1 Kultivierung von NIH3T3-Zellen

Für eine Transfektion wurden NIH3T3-Zellen in der Zellkultur gehalten. Die gesamten Arbeiten mit Zellkulturen wurden in einer Umluft-Sterilbank der Firma Heareus mit sterilen Glas- oder Plastikpipetten durchgeführt.

Bei NIH3T3-Zellen handelt es sich um adhärent wachsende Mausfibroblasten, die in Gewebekulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium 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 eines Trypsin/EDTA-Gemisches abgelöst. Zur Inaktivierung der Trypsin/EDTA-Lösung wurden wiederum 5 ml Medium hinzugegeben. 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.

2.2.10.2 Transfektion von NIH3T3-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 Mausfibroblasten wurden wie in 2.2.10.1 beschrieben 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 μ l 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 NIH3T3-Zellen mit 10 ml PBS gewaschen sowie nach Entfernung des PBS mit 1 ml OptiMEM-1-Medium bedeckt. Nach Ablauf der 20 minütigen 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 h Dauer. 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 h konnten die transfizierten Zellen zur Isolierung der exprimierten Proteine herangezogen werden.

2.2.10.3 Isolierung von Zellkultur-Proteinen

Nach erfolgter Transfektion wurde die Zellkultur geerntet, mit dem Ziel die exprimierten Proteine für eine Co-Immunopräzipitation nutzbar zu machen.

Die kultivierten Zellen wurden etwa 48 h nach erfolgter Transfektion zwei Mal mit 10 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 150 μ l Lysispuffer der folgenden Zusammensetzung bedeckt:

50 mM	Tris-HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 %	NP-40
1 mM	DTT
2,5 mM	EDTA
1 μ M	Aprotinin
1 μ M	Leupeptin
1 mM	PMSF

Daraufhin wurden das Zellmaterial mit einem sterilen Plastik-Schaber vom Boden der Kulturflasche gekratzt, in ein E-Cup überführt und unter mehrmaliger Inversion 30 min auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte ein Zentrifugation des Lysats für 10

min bei 4°C und Überführung der sich nun im Überstand befindenen isolierten Proteine in eine neues E-Cup. Nach Abnahme von 50 µl als späteren Proteinstandart konnten die Lysate direkt verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.11 Analyse von Fluoreszenzproteinen

Mit für Fluoreszenzproteine codierenden Plasmiden zuvor transfizierte Zellen wurden für 48 h bei 37°C wie unter 2.2.10.1 beschrieben kultiviert. Statt Zellkulturflaschen wurden Objektträger mit zwei kleinen Zellkammern verwendet. Nach 10 min Fixierung auf dem Objektträger mittels Methanol wurden diese für 5 min in PBT inkubiert. Nach Beträufeln mit DAPI enthaltenden Vectashield Mounting® Medium, welches an DNA bindet und somit den Zellkern fluoreszieren lässt, wurden die Träger noch 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 bildbearbeitenden Software (SIS) archiviert werden.

2.2.12 Immunfluoreszenzfärbung von NIH3T3-Zellen

Die über Nacht auf Objektträgern 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, an FITC oder Cy3 konjugiertes von der Ziege stammendes Anti-Kaninchen- oder Anti-Maus-IgG 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 Slides gegeben und diese mit einem Deckgläschen abgedeckt. Analog zur Analyse von Fluoreszenzproteinen 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 (vom Hersteller)

2.2.13 Co-Immunopräzipitation

Die Co-Immunopräzipitation ist eine immunologische Technik zum Interaktionsnachweis zweier Moleküle. In der Regel handelt es sich um zwei Proteine.

Gegen ein zu untersuchendes Protein (Antigen) wird ein spezifischer Antikörper dem Zellysate hinzugefügt. Über eine vorherige Kopplung an magnetische Partikel erfolgt eine Separierung der Antikörper-Antigen-Komplexe vom restlichen Zellysate. Putative Interaktionspartner, die an das zu untersuchende Protein binden, werden so zusammen mit diesem separiert. Anschließend kann der vermutete Interaktionspartner durch proteinchemische Techniken mit Hilfe eines nun für diesen spezifischen zweiten Antikörpers nachgewiesen und damit eine Interaktion gezeigt werden.

NIH3T3-Zellen wurden mit zwei Expressionsvektoren codierend für Proteine deren Interaktion untersucht werden sollte co-transfiziert und die Gesamtproteine nach 48 h Wachstum, wie unter 2.2.10.3 beschrieben, isoliert. Für die Immunopräzipitation mussten zuerst 100 µl Dynabeads gemäß dem Protokoll des Herstellers 3 x mit 500 µl 0,1 M Natriumphosphat-Puffer (PB) gewaschen werden. Dynabeads sind magnetische Teilchen, die über einen Magneten eine wiederholte Pelletierung erlauben und an Protein A oder G kovalent gebunden sind. Beide Proteine besitzen eine Bindungsstelle für die Fc-Region von Immunglobulinen, sie weisen aber eine unterschiedliche Affinität zu den Immunglobulinen und Subtypen verschiedener Spezies auf. Die Bindung der Dynabead-Protein-Komplexe an 5 µl des ersten Antikörpers erfolgte mittels Inkubation für 1 h bei RT. Es wurde dann 1 ml Cross-Linking-Lösung hinzugefügt und weitere 30 min bei RT unter Bewegung inkubiert. Die Reaktion wurde durch abschließende Inkubation mit 1 ml Tris/HCl (pH 7,5) für 15 min bei RT gestoppt. Nach 3 x Waschen in 500 µl PB konnten die jetzt fest verbundenen Antikörper-Dynabead-Protein-Komplexe für die Immunpräzipitation

verwandt werden. Dazu wurden diese mit 400 µl Zellysate über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die mittels Magneten pelletierten, an das Antigen gebundenen Dynabead-Antikörper-Einheiten wurden 3 x mit 500 µl PB gewaschen. Bevor sie als reine Antigen-Antikörper-Komplexe der SDS-PAGE zugeführt werden konnten, mussten die magnetischen Partikel durch Kochen für 10 min bei 95°C in 50 µl 1 x SDS-Auftragspuffer wieder von den Komplexen separiert werden.

Cross-Linking-Lösung: 0,2 M Triethanolamin, pH 8,0
 5,4 mg Dimethylpimelimidatdihydrochlorid
 (DMP)

2.2.14 Proteinchemische Techniken

2.2.14.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE nach Laemmli et al. (1970) ist eine Methode Proteine abhängig von ihrem molekularen Gewicht aufzutrennen. Acrylamid und Bisacrylamid bilden dabei als Polymer ein molekulares Sieb. Dies führt dazu, dass durch SDS denaturierte und mit einer negativen Ladung versehene Proteine unter Anlage einer elektrischen Spannung ein von ihrer Masse abhängiges Laufverhalten zeigen. Für alle Experimente wurden Trenngel der Firma Invitrogen mit einem Acrylamidgehalt von 12 % verwendet.

Für die Elektrophorese wurde das Gel in der Elektrophoresekammer fixiert und die Kammer mit Glycin-Puffer befüllt. Die Proteinproben wurden für 10 min bei 95°C zusammen mit SDS-Auftragspuffer gekocht, bevor 20 µl der präparierten Proben und 10 µl des Protein-Markers in die Geltaschen geladen wurden. Zur Separierung der Proteine lief das Gel zu Beginn mit 70 Volt und wurde nach einer halben Stunde auf 120 Volt hoch reguliert. Anschließend konnten die im Gel aufgetrennten Proteine zur Immundetektion mittels eines Western-Blots verwandt werden.

Glycin-Puffer: 1,44 % (w/v) Glycin
 0,3 % (w/v) Tris-Base
 0,1 % (w/v) SDS

2 x SDS-Auftragspuffer:	4,8 % (w/v) SDS
	20 % (v/v) Glycerin
	10 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	100 mM Tris/HCl pH7,8

2.2.14.2 Western-Blot (Semi-dry Blot)

Nach Separation in einem SDS-Polyacrylamidgel können Proteine auf eine Membran transferiert und dadurch immobilisiert werden. Anschliessend kann ein Nachweis der Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers geführt werden. Als geeignete Trägermatrix dient eine PVDF-Membran, auf der die Proteine durch lipophile Wechselwirkungen binden. Der elektrophoretische Transfer erfolgt hier durch eine senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegten Spannung.

Zunächst wurden die Elektrodenplatten des Blotters mit dH₂O angefeuchtet und 9 Whatman GB004 Blottingpapiere auf die Größe eines Gels passend geschnitten. 3 Papiere wurden in Anode-I-Puffer getränkt und 3 wurden in Anode-II-Puffer getränkt, bevor sie auf die Anode des Semidry-Blotters gelegt wurden. Auf diese folgten die mit Methanol angefeuchtete PVDF-Membran und das Trenngel. Als abschließende Schicht wurden 3 in Kathoden-Puffer getränkte Papiere aufgelegt und mit der Graphit-Kathodenplatte die Kammer geschlossen. Luftblasen wurden vorher vorsichtig mit einem Handroller herausgewalzt. Nach einem Transfer von 1 h mit 3,5 mA pro cm² Membranfläche konnte die PVDF-Membran der immunologischen Detektion zugeführt werden.

Anode-I-Puffer:	0,3 M Tris/HCl, pH 10,4
	20 % (v/v) Methanol

Anode-II-Puffer:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4
	20 % (v/v) Methanol

Kathoden-Puffer: 40 mM ϵ -Aminocapronsäure
25 mM Tris/HCl, pH 9,4
20 % Methanol

2.2.14.3 Immunologische Detektion membrangebundener Proteine

Prinzip der Nachweismethode ist eine Antikörper vermittelte Enzymreaktion. Nach Bindung eines spezifischen Antikörpers an das membranfixierte Zielprotein, erfolgt die Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels eines zweiten Enzym-gekoppelten Antikörpers unter Zusatz eines Farbstoffgemisches.

Nach erfolgtem Western-Blot wurde der Proteinmarker von der PVDF-Membran abgetrennt. Zur Untersuchung mit verschiedenen Antikörpern wurde die Membran in Streifen getrennt. Dann wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen der Membran mit Block-Puffer unter Schwenken auf dem Schüttler für 1 h bei RT abgesättigt. Luftblasenfrei eingeschweißt in einem Plastikbeutel wurde die Membran bei 4°C über Nacht zusammen mit dem ersten Antikörper in einer Verdünnung von 1:500 unter Bewegung inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 x 5 min mit Wasch-Puffer gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Es folgte die Inkubation mit dem in 10 ml Wasch-Puffer auf 1:10000 verdünnten zweiten Antikörper für 1 h bei RT auf einem Schüttler. Dieser IgG-Antikörper ist mit dem Enzym alkalische Phosphatase gekoppelt. Die Membran wurde erneut für 3 x 5 min in Wasch-Puffer bewegt, sowie anschließend einmalig 5 min mit P3-Puffer. Für die Farbreaktion wurde das Substrat-Chromogengemisch, bestehend aus 45 μ l NBT- und 35 μ l BCIP-Lösung in 10 ml P3-Puffer, zusammen mit der Membran in einem luftblasenfrei eingeschweißten Plastikbeutel inkubiert. Die Farbstoffe bilden die Substrate für die alkalische Phosphatase, die katalytische Aktivität bewirkt eine Reduzierung des NBT und eine Abspaltung der Phosphatgruppe des BCIP, beides bewirkt einen bandenförmigen, blauvioletten Niederschlag der vorher schwach gelben Entwicklerflüssigkeit an den Stellen der Membran, an denen der zweite Antikörper gebunden ist. Die Farbreaktion wurde nach 2 – 3 min durch kurzes Waschen in dH₂O gestoppt und die Membran auf Filterpapier an der Luft getrocknet. Zur Konservierung wurde diese abschließend in einen Plastikbeutel eingeschweißt und konnte mit dem Proteinmarker verglichen werden.

10 x Wasch-Stammlösung:	1,4 M	NaCl
	100 mM	Tris/HCl, pH 7,5
	0,5 % (v/v)	Tween 20
Block-Puffer:	5 % (w/v)	Magermilchpulver in 1 x Wasch-Stammlösung
Wasch-Puffer:	2 % (w/v)	Magermilchpulver in 1 x Wasch-Stammlösung
P3-Puffer:	100 mM	NaCl
	50 mM	MgCl ₂
	100 mM	Tris/HCl, pH 9,5
NBT-Lösung:	75 mg/ml	NBT
	70 %	Dimethylformamid (DMF)
BCIP-Lösung:	50 mg/ml	BCIP in Dimethylformamid (DMF)

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von *Cops5* in der Maus durch RT-PCR

Zunächst sollte die organspezifische Expression von *Cops5* untersucht werden. Dazu wurde Gesamt-RNA von Organen aus Wildtyp-Mäusen mittels RT-PCR auf eine *Cops5*-Expression untersucht. Mutationen im für Spastin codierenden *SPG4*-Gen, dem putativen COPS5-Interaktionspartner, führen vorzugsweise zu einer gestörten Funktion der langen α -Motorneuronenfunktion. Daher bildete RNA aus neuronalem Gewebe einen Schwerpunkt der Analyse. Zusätzlich wurden embryonale RNA's verwendet. Im Rahmen einer OneStep RT-PCR-Reaktion wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und mit den Primern F1 bzw. R3 die *Cops5*-cDNA anschließend amplifiziert. Der R3 Primer wurde in den Übergang von Exon 2 zu Exon 3 gelegt (Abb. 3.1), um eine Kontamination des Ansatzes mit DNA ausschließen zu können. Das gewählte Primerpaar umfasste so einen Bereich von insgesamt 334 bp.

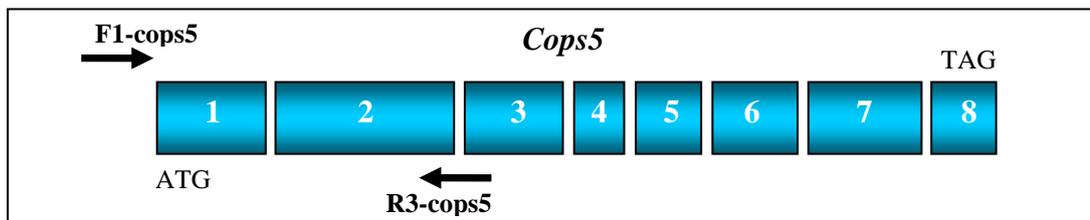
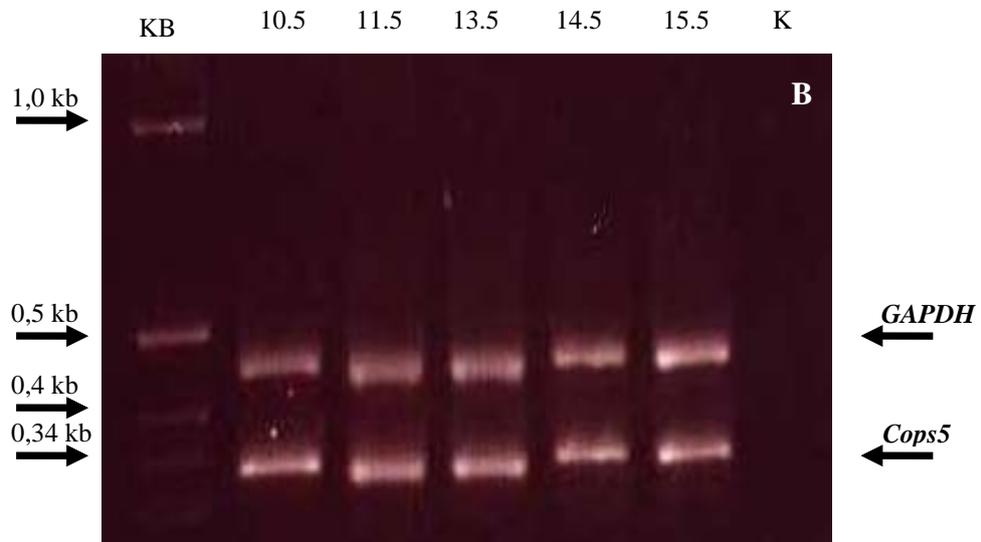
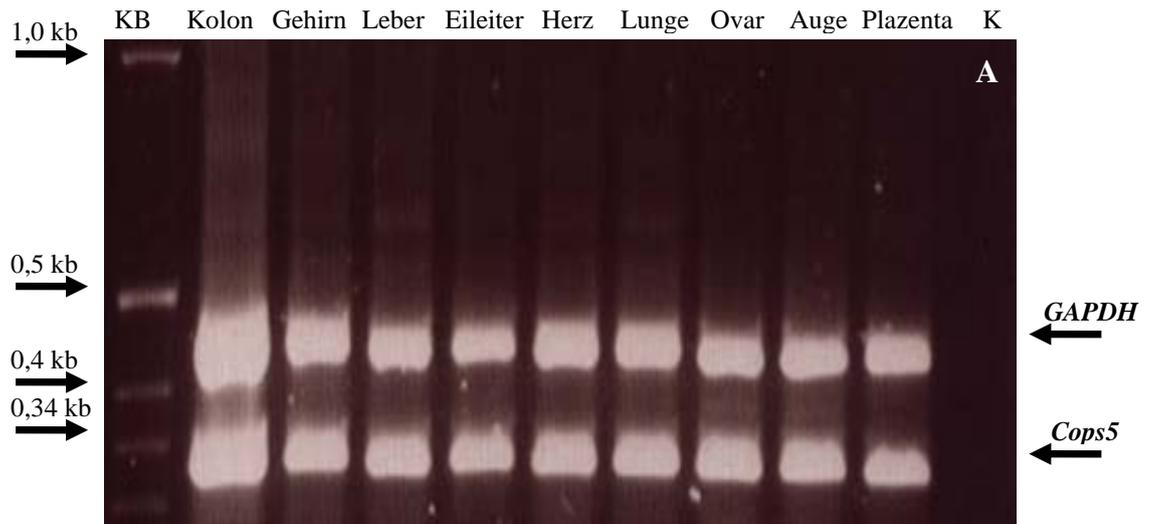


Abb. 3.1: Schematische Darstellung der murinen *Cops5*-Exonstruktur. Das vom *Cops5*-Gen abgeleitete Transkript besteht aus 8 Exons. Die für die RT-PCR verwendeten Primer F1-cops5 und R3-cops5 lokalisieren in der 5'UTR bzw. im Übergang von Exon 2 zu 3. Das erwartete Fragment hat damit eine Größe von 334 bp.

Zur Kontrolle wurde ein 438 bp GAPDH-Fragment amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 0,8 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.2). In allen untersuchten murinen Organen wurde das erwartete 334 bp große *Cops5*-Fragment nachgewiesen. Gleiches galt für die untersuchten Embryonalstadien. Insbesondere auch in den aufgrund des oben genannten Sachverhaltes ausgewählten

neuronalen Geweben – Hippokampus, Kleinhirn, Rückenmark und Resthirn - konnten die Fragmente und damit die Expression von *Cops5* nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund der somit demonstrierten Expression *in vivo* konnten nachfolgend Experimente zur subzellulären *Cops5*-Lokalisation und einer etwaigen Interaktion mit Spastin begonnen werden.



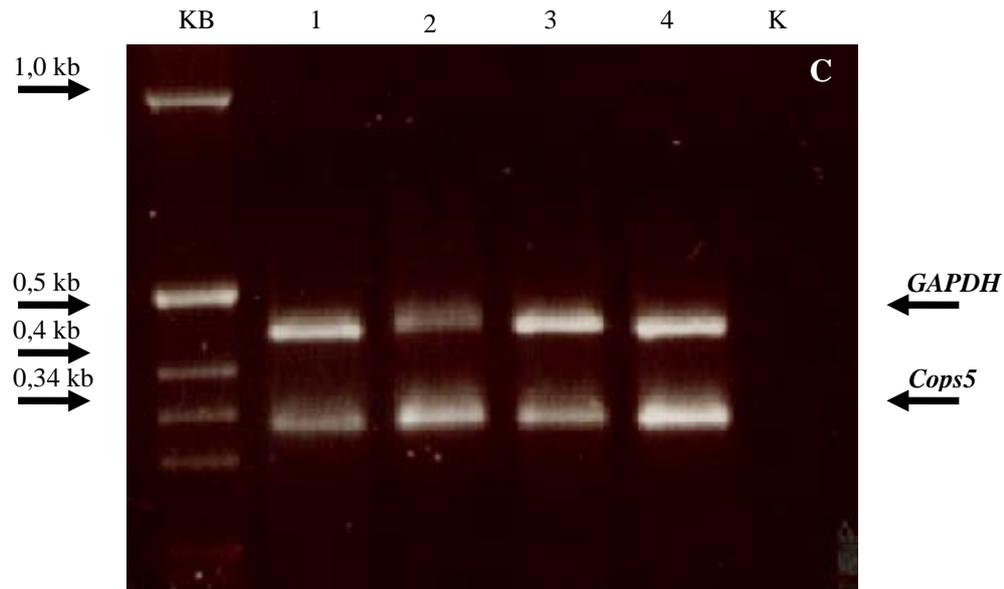


Abb. 3.2: RT-PCR-Produkt von *Cops5* in murinen Organen und embryonalem Gewebe aufgetrennt in 0,8 %igem Agarosegel. KB = 1Kb-Längenstandard, K = 0-Kontrolle, GAPDH = Positiv-Kontrolle **A:** Analyse von RNA aus adultem Gewebe. **B:** RNA aus murinen embryonalen Geweben zu verschiedenen Tagen der embryonalen Entwicklung. **C:** RNA aus neuronalem Gewebe. 1 = Hippokampus, 2 = Kleinhirn, 3 = Rückenmark, 4 = Resthirn

3.2 Charakterisierung von *Cops5* als Interaktionspartner des Spastins in NIH3T3-Zellen

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden mittels des Yeast-Two-Hybrid (Y2H)-Systems vier Proteine als putative Interaktionspartner des vom *SPG4*-Gen kodierten Spastins identifiziert. Eines dieser interagierenden Proteine ist *COPS5*. *In vitro* Experimente sollten daher nun *COPS5* auf subzellulärer Ebene charakterisieren und die im Y2H-System gefundene Interaktion zwischen *COPS5* und Spastin in Säugerzellen unabhängig verifizieren. Da es mit Ausnahme des pDsRed-N1-Vektors (3.2.2.3) nicht gelang, humane *COPS5*-Fusionskonstrukte zu generieren, wurden für diese Arbeit murine *Cops5*-Fusionskonstrukte untersucht. Mensch und Maus zeigen jedoch auf Peptidebene eine nahezu 100 %ige Übereinstimmung ihrer Sequenz (siehe Anhang).

3.2.1 Synthese der kodierenden Sequenz von *Cops5* und Klonierung in den pGEM-T-Easy-Vektor

Ausgehend von muriner Gesamt-RNA (Gehirn) konnte mittels OneStep RT-PCR und darauf folgender Nested-PCR die kodierende Sequenz von *Cops5* synthetisiert werden. Die dabei verwendeten Primer befanden sich jeweils in der untranslatierten Region der RNA und cDNA-Sequenz. Das generierte PCR-Produkt wurde anschließend gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 3.3).

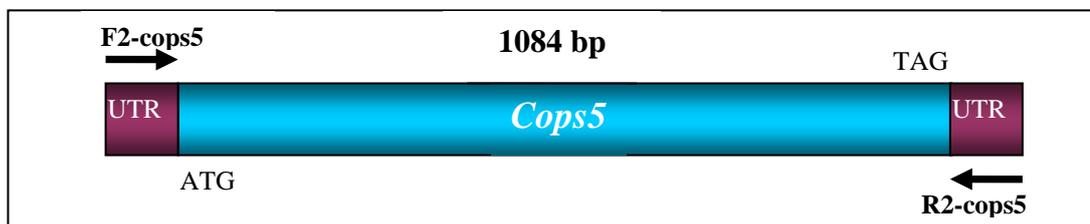


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung der 1084 bp großen kodierenden Sequenz von *Cops5*. UTR = Untranslatierte Region. ATG = Startcodon. TAG = Stoppcodon. Für die RT-PCR-Reaktion wurden die Primer F1-cops5 und R1-cops5 verwendet (hier nicht mit dargestellt), für die anschließende Amplifikation mittels Nested-PCR die Primer F2-cops5 und R2-cops5.

Die *Cops5*-Sequenz wurde nach Aufreinigung mit dem pGEM-T-Easy-Vektor ligiert und der Ligationsansatz in kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Eine Minipräparation erlaubte größere Mengen dieser erzeugten *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukte zu gewinnen, um deren Sequenz und Orientierung zu kontrollieren. Abschließend wurde ein so verifizierter Klon für weitere Experimente ausgewählt und zusätzlich als Glycerinstock konserviert.

3.2.2 Generierung von *Cops5*-Konstrukten mithilfe bakterieller Expressionssysteme

Zur Charakterisierung des *Cops5*-Proteins und seiner möglichen Interaktion mit Spastin wurde die *Cops5*-cDNA aus dem *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukt (3.2.1) in andere Vektoren kloniert, die eine Expression in Säugetierzellen ermöglichen

sollten. Die gewählten Vektoren besaßen zusätzlich so genannte „tags“ (kurze Erkennungssequenzen) am C-terminalen oder N-terminalen Ende. Je nach Art erlaubten diese Erkennungssequenzen mittels UV-Anregung eine direkte Detektierung des exprimierten Proteins oder eine indirekte bei zusätzlicher Unterstützung durch einen Antikörper. Voraussetzung war jeweils die Klonierung der *Cops5*-Sequenz in den korrekten Leserahmen.

3.2.2.1 Klonierung von *Cops5* aus pGEM-T-Easy in pQM-NTag/A-Intron

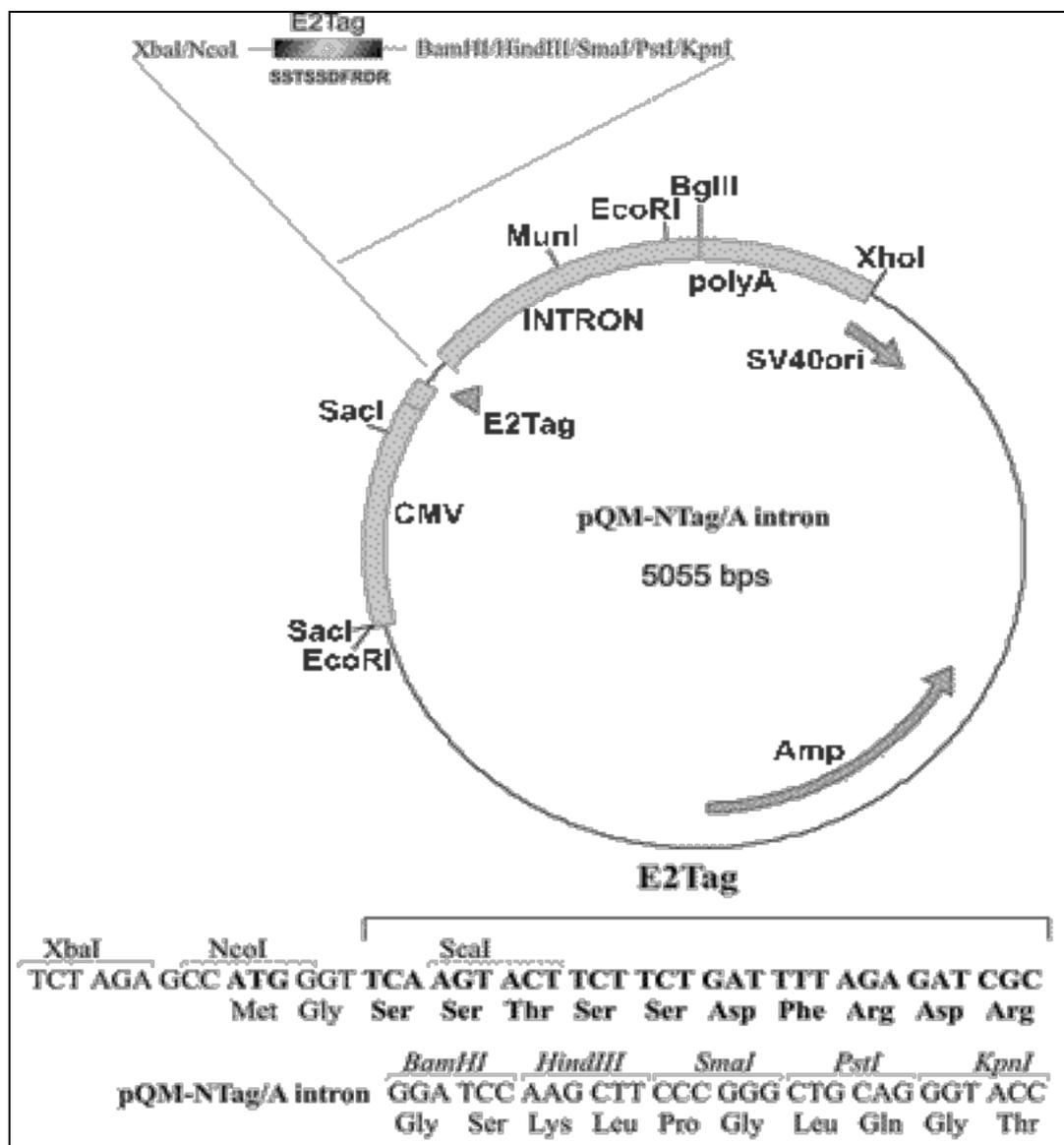
Der pQM-NTag/A-Intron-Vektor verfügt über eine E2-Erkennungssequenz, die eine Detektion des exprimierten Proteins durch einen monoklonalen Maus-Anti-E2-IgG-Antikörper ermöglichen sollte. Das generierte *Cops5*-E2-Konstrukt steht unter Kontrolle des CMV-Promotors. Es enthält die E2-Erkennungssequenz an seinem N-terminalen Ende im korrekten Leserahmen. Das Startcodon wurde zuvor aus der sonst vollständigen *Cops5*-cDNA entfernt (Abb. 3.4).

Ausgangspunkt der Generierung des *Cops5*-Inserts für den Vektor war eine PCR mit DNA des *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukts (3.2.1). Die dabei zur Synthese benutzten Primer verfügten über eine *HindIII*- bzw. eine *BglII*-Restriktionsschnittstelle, so dass eine spätere Klonierung in die korrespondierenden Restriktionsseiten des pQM-Vektors erfolgen konnte. Das erwartete Fragment wurde aufgereinigt und mit dem pGEM-T-Easy-Vektor ligiert. Zur Erzeugung einer größeren Menge dieser Konstrukte wurden diese in kompetente DH5^α-Zellen transformiert. Eine Minipräparation ermöglichte die Sequenzierung zur Kontrolle des *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukts mit den nun vorhandenen Restriktionsschnittstellen. Ein geeigneter Klon wurde daraufhin mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* bzw. *BglII* geschnitten und gelelektrophoretisch aufgetrennt, sowie das Insert aus dem Agarosegel isoliert.

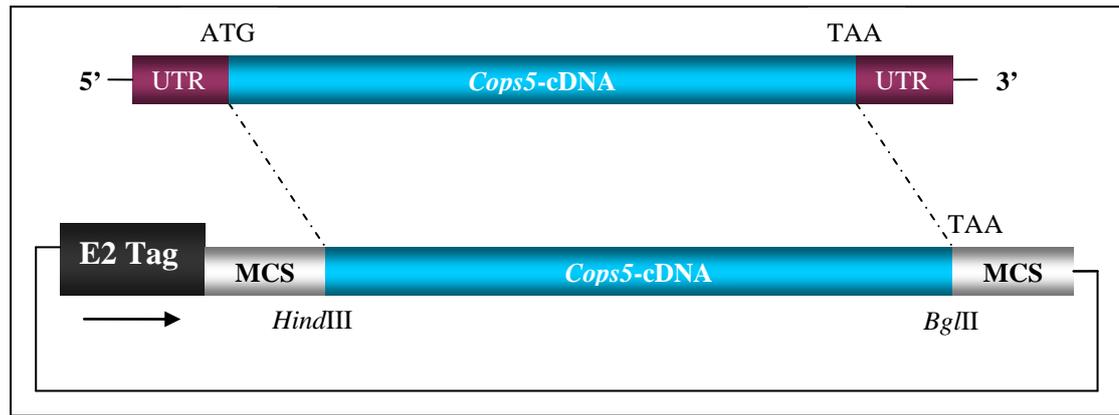
Zur Herstellung des pQM-Vektors wurden *Escherichia coli* (*E. coli*) Zellen mit dem Vektor transformiert und nach Minipräparation ebenfalls mit *HindIII* und *BglII* restringiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung konnte der jetzt linearisierte Vektor aus dem Agarose-Gel extrahiert werden.

Das aufgereinigte *Cops5*-Insert und der aufgereinigte pQM-NTag/A-Intron-Vektor wurden ligiert und der Ligationsansatz in kompetente Zellen transformiert. Durch

Koloniehybridisierung konnte schnell und effektiv eine größere Anzahl von Bakterienkolonien auf Plasmidintegration überprüft und Klone identifiziert werden, bei denen eine Klonierung der *Cops5*-cDNA in den pQM-Vektor erfolgreich war. Die Plasmid-DNA der rekombinanten Klone musste nach einer Minipräparation daraufhin noch durch Sequenzierung auf den richtigen Leserahmen und Basenaustausche getestet werden. Von einem als geeignet getesteten Klon wurde Endotoxin-freie Plasmid-DNA gewonnen, die für Interaktionsstudien von *Cops5* und Spastin in NIH3T3-Zellen genutzt werden konnte.



A



B

Abb. 3.4: Klonierung von *Cops5* in pQM-NTag/A-Intron. **A:** Vektorkarte des pQM-NTag/A-Intron-Vektors mit Restriktionsschnittstellen und Position des E2-Epitops (abcam 2009). **B:** Schematische Darstellung des generierten *Cops5*-E2-Konstrukts mit N-terminaler E2-Erkennungssequenz. Das 1008 bp große *Cops5*-Insert wurde über *HindIII*- und *BglII*-Schnittstellen in den Vektor ligiert.

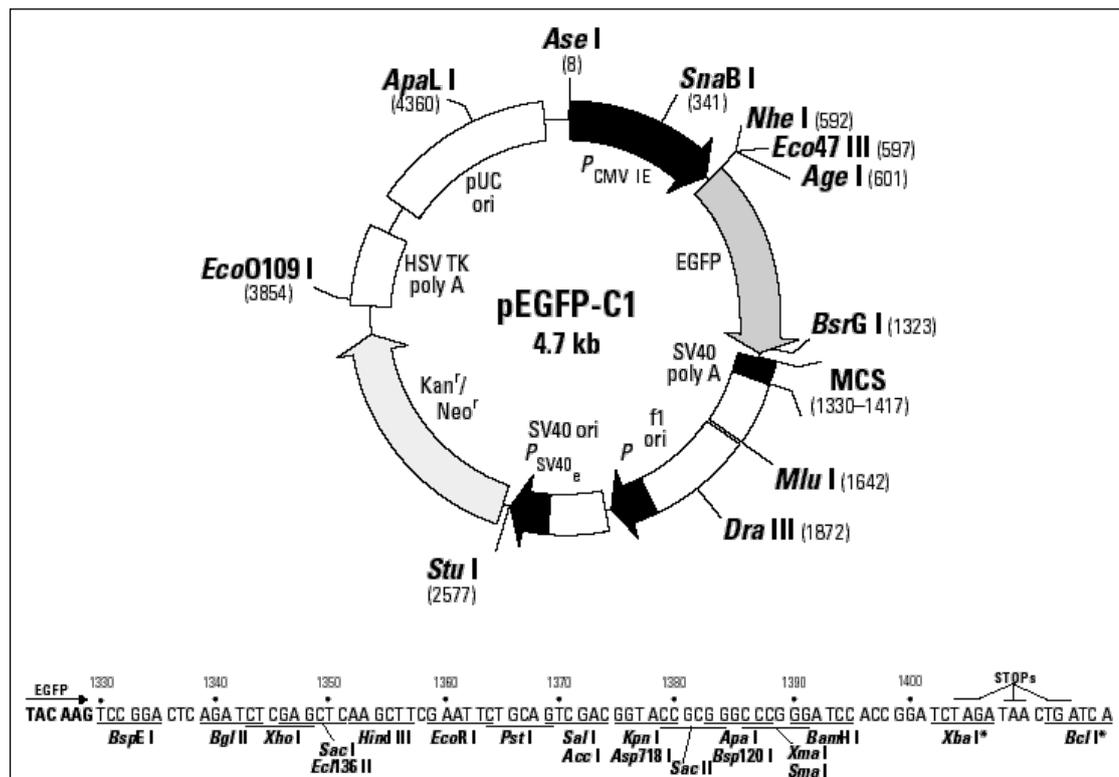
3.2.2.2 Klonierung von *Cops5* aus pGEM-T-Easy in pEGFP-C1

Der pEGFP-C1-Vektor verfügt über die EGFP-Erkennungssequenz. Diese erlaubt als Fluorophor eine Antikörper-unabhängige Lokalisation des exprimierten Fusionsproteins unter UV-Anregung. Das generierte *Cops5*-EGFP-Konstrukt steht unter Kontrolle des CMV-Promotors und enthält das EGFP-Polypeptid an seinem N-terminalen Ende. Das Startcodon wurde zuvor aus der sonst vollständigen kodierenden *Cops5*-cDNA entfernt (Abb. 3.5).

Unter Verwendung von Primern mit Restriktionsschnittstellen für *HindIII* bzw. *BglII* wurde die *Cops5*-cDNA eines *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukts (3.2.1) amplifiziert. Die gewählte *HindIII*-Restriktionsschnittstelle erlaubte eine spätere Subklonierung in die korrespondierende *HindIII*-Schnittstelle des pEGFP-C1-Vektors. Die *BglII*-Schnittstelle konnte hingegen aufgrund der resultierenden kompatiblen Enden durch Restriktion mit dem überhängenden Ende der *BamHI*-Schnittstelle des Vektors ligiert werden. Nach Aufreinigung der amplifizierten *Cops5*-Inserts wurden diese mit pGEM-T-Easy-Vektoren ligiert und in kompetente DH5 α -Zellen transformiert. Die Minipräparation erlaubte die Gewinnung von DNA der neuen *Cops5*-pGEM-T-Easy-Konstrukte. Ein für die neuen Schnittstellen positiver Klon wurde mit den Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BglII*

restringiert. Die präparative Gelelektrophorese diente der Auftrennung und Isolierung der gewonnenen Plasmid-Inserts.

Der pEGFP-C1-Vektor wurde ebenfalls in kompetente *E. coli* Zellen transformiert und nach Gewinnung der Plasmid-DNA im analytischen Maßstab mit den geeigneten Restriktionsendonukleasen *HindIII* und *BamHI* behandelt. Der linearisierte Vektor wurde analog den Inserts nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Agarosegel extrahiert. *Cops5*-Insert und pEGFP-C1-Vektor wurden aufgereinigt und ligiert, sowie in DH5 α -Zellen transformiert. Mittels Koloniehybridsierung wurde auf eine erfolgreiche Klonierung gescannt. Mehrere rekombinante Klone wurden nach Plasmidgewinnung im analytischen Maßstab abschließend durch Sequenzierung auf den richtigen Leserahmen und die korrekte Sequenz getestet. Für Co-Lokalisationsstudien von *Cops5* mit Spastin in der Zellkultur wurde ein so getesteter Klon ausgewählt und Endotoxin-freie Plasmid-DNA gewonnen.



A

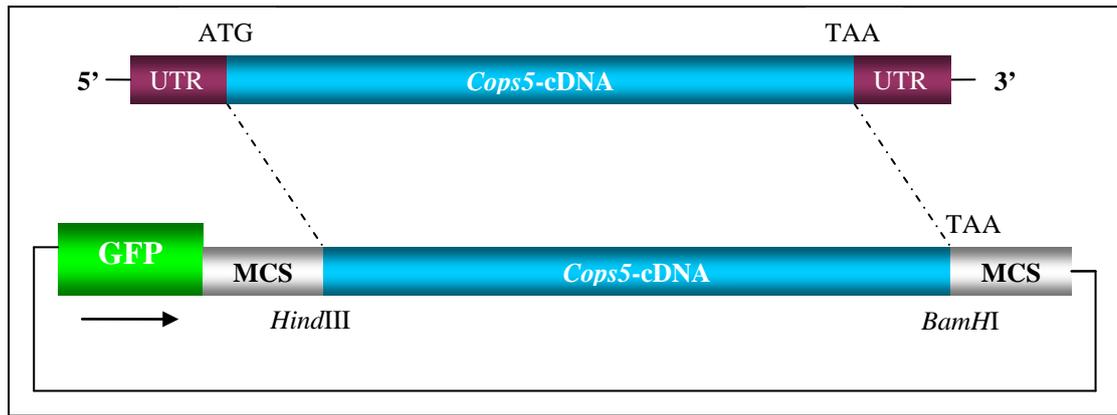
**B**

Abb. 3.5: Klonierung von *Cops5* in pEGFP-C1. **A:** Vektorkarte des pEGFP-C1-Vektors mit Restriktionsschnittstellen und Position des EGFP-Epitops (ClonTech 2002). **B:** Schematische Darstellung des generierten *Cops5*-EGFP-Konstrukts mit N-terminalem EGFP-Polypeptid. Das 1008 bp große *Cops5*-Insert wurde über *HindIII*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor ligiert.

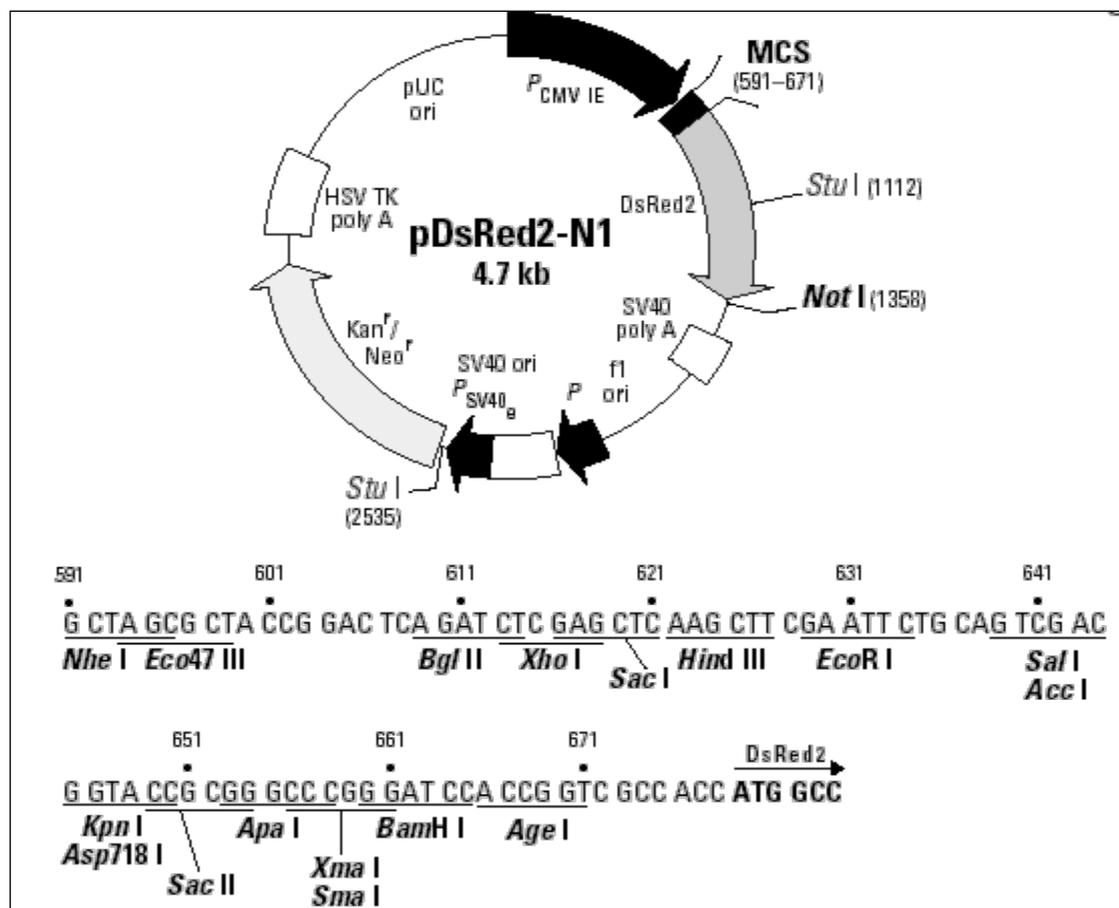
3.2.2.3 Klonierung von *COPS5* aus pGEM-T-Easy in pDsRed2-N1

Der pDsRed2-N1-Vektor enthält als Erkennungssequenz die codierende Sequenz für ein Fluorophor. Nach Klonierung der *COPS5*-cDNA in den Vektor konnte das rot fluoreszierende Fusionsprotein durch optische Anregung nachgewiesen werden. Das entstandene Konstrukt umfasste die gesamte kodierende *COPS5*-cDNA, kloniert in den korrekten Leserahmen, und trug die Erkennungssequenz C-terminal. Das *COPS5*-Stoppcodon wurde, um einen vorzeitigen Translationsabbruch und die Expression zweier getrennter Proteine zu vermeiden, entfernt (Abb. 3.6).

Um die *COPS5*-Sequenz in den pDsRed2-Vektor klonieren zu können, wurde *COPS5*-pGEM-T-Easy-Plasmid-DNA (3.2.1) mit Primern, die eine *HindIII*- bzw. *BamHI*-Restriktionsschnittstelle enthielten, amplifiziert. Nach Aufreinigung wurde das Fragment mit pGEM-T-Easy-Vektoren ligiert und in *E. coli* Zellen transformiert. Einer Isolierung von *COPS5*-cDNA schloss sich die enzymatische Spaltung mit *HindIII* bzw. *BamHI* an. Die Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und die Inserts aus dem Agarosegel eluiert.

Analog dem Vorgehen mit der *COPS5*-Sequenz wurde der pDsRed2-N1-Vektor nach Vervielfältigung in α DH5 -Zellen und Plasmidgewinnung mittels

Restriktionsendonukleasen gespalten. Durch Gelextraktion wurde der linearisierte Vektor im Anschluss an die Gelelektrophorese aus dem Trennmedium isoliert. Die aufgereinigten *COPS5*-Inserts wurden in den Transfer-Vektor ligiert und mittels Transformation in kompetente *DH5 α* -Zellen eingebracht. Positive Klone wurden durch Koloniehybridisierung selektiert und deren Plasmid-DNA isoliert. Die abschließende Sequenzierung erlaubte die Kontrolle der Basenfolge und des korrekten Leserahmens. Ein so getesteter Klon mit *COPS5*-Red-Konstrukt wurde für die Isolierung Endotoxin-freier Plasmid-DNA ausgewählt und für Co-Lokalisationsexperimente mit Spastin in Säugerzellen verwandt.



A

**B**

Abb. 3.6: Klonierung von *COPS5* in pDsRed2-N1. **A:** Vektorkarte des pDsRed2-N1-Vektors mit Restriktionsschnittstellen (Clontech 2003). **B:** Schematische Darstellung des generierten *COPS5*-Red-Konstrukts mit C-terminaler Red-Erkennungssequenz. Das 1008 bp große *COPS5*-Insert wurde über *HindIII*- und *BamHI*-Schnittstellen in den Vektor ligiert.

3.2.3 Generierung von Spastin-Konstrukten mithilfe bakterieller Expressionssysteme

Im Y2H war die Isoform II des humanen Spastins verwendet worden. Bei dieser Analyse war *COPS5* als möglicher Interaktionspartner identifiziert worden. In der weiteren Arbeit wurde ebenfalls die Isoform II des Spastins (65kDa) verwendet. Wenn im Folgenden SPG4 genannt wird, handelt es sich um diese Form der Polypeptidsequenz ohne die Bereiche, die durch das Exon 4 kodiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden ferner zur Expression von Spastin in Säugerzellen die Vektoren pCS2-3 und pEGFP-C1 eingesetzt. Der zuerst genannte Vektor besitzt eine c-myc-Erkennungssequenz. Diese ermöglicht die Detektierung des Expressionsproteins durch einen monoklonalen Kaninchen-Anti-Myc-Antikörper. Der pEGFP-C1-Vektor enthält hingegen eine EGFP-Erkennungssequenz und erlaubt so eine Antikörper-unabhängige Detektierung.

Die *SPG4*-cDNA war in die *EcoRI*-Restriktionsschnittstelle des pEGFP-C1-Vektors kloniert worden. Die Klonierung in den pCS2-3-Vektor war ebenfalls über die *EcoRI*-Schnittstelle des Vektors erfolgt. Das unter dem CMV-Promotor stehende *SPG4*-EGFP-Konstrukt enthielt den Tag C-terminal des Inserts. Dieses musste zur erfolgreichen Expression des Fusionsproteins in den korrekten Leserahmen

eingefügt werden. Das unter einem CMV-Promotor stehende *SPG4-c-myc*-Konstrukt enthielt den Tag hingegen N-terminal des Inserts und wurde ebenfalls in den passenden Leserahmen kloniert. Beide Konstrukte wurden durch enzymatische Spaltung getestet und für die weiteren Experimente in der Zellkultur DNA Endotoxin-frei isoliert.

3.2.4 Subzelluläre Lokalisation des Cops5-Proteins in NIH3T3-Zellen mittels direkter Fluoreszenzanalyse

Zur Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von Cops5 in Säugetierzellen wurden NIH3T3-Zellen mit dem *Cops5*-EGFP-Fusionskonstrukt (3.2.2.2) transfiziert und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 3.7).

Herangezogene NIH3T3-Zellen wurden mit 1 μ g *Cops5*-EGFP-Plasmiden transfiziert. Nach 48 h Kultivierung wurden die Zellen mit Methanol auf dem Objektträger fixiert und mit DAPI behandelt. Diese Behandlung erlaubt es, den Zellkern mittels DAPI-Filter des Mikroskops zu erkennen. Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Untersuchung zeigte, dass *Cops5*-Fusionsprotein überwiegend vesikulär im Zytoplasma der transfizierten NIH3T3-Zellen lokalisiert. Der grün fluoreszierende EGFP-Anhang des Konstrukts verdeutlicht darüber hinaus ein vorwiegend perinukleäres Verteilungsmuster der zytoplasmatischen Expression des *Cops5*-EGFP-Fusionskonstrukts.

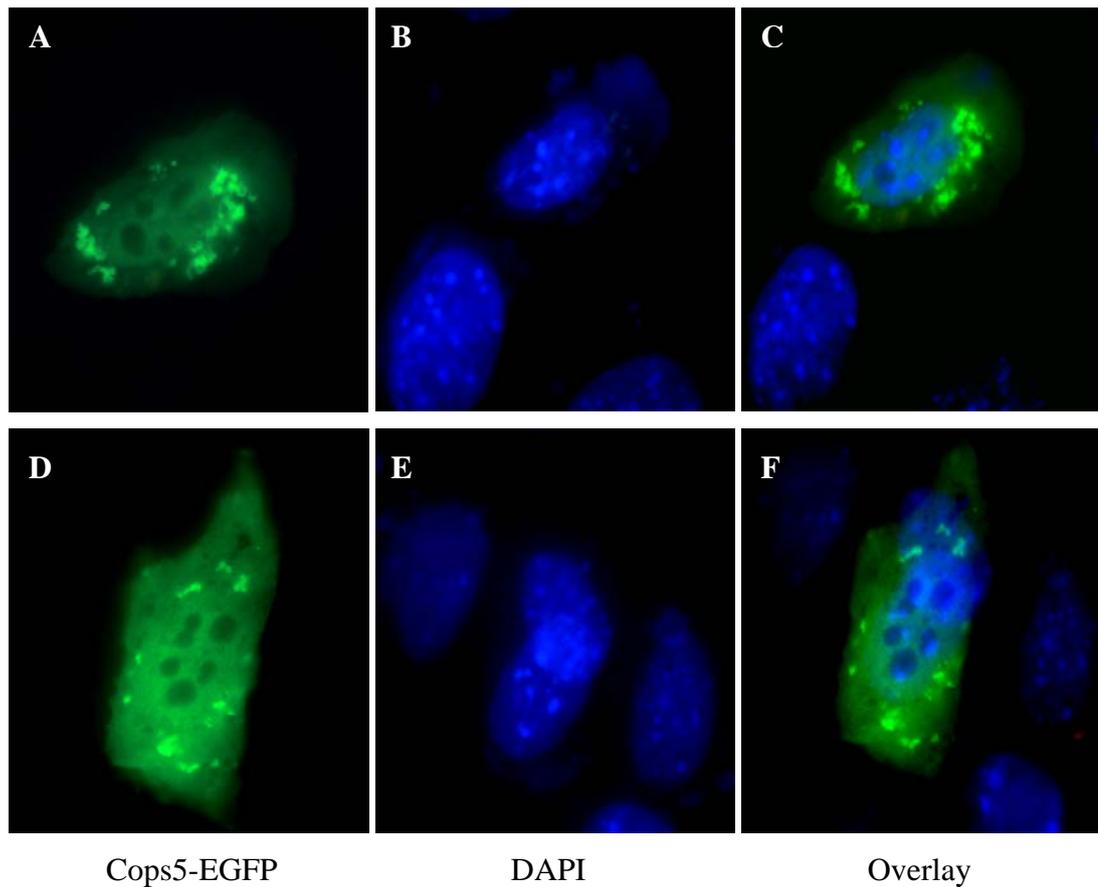


Abb. 3.7: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Cops5 in NIH3T3-Zellen. Filter: FITC = 450 – 490 nm für Cops5-EGFP-Fusionsproteine (grünes Signal), DAPI = 355 – 360 nm für DAPI gefärbte Nuklei (blaues Signal). **A,D:** Lokalisation des Cops5-EGFP-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **B,E:** Anfärbung der nukleären DNA, 600fache Vergrößerung. **C,F:** Digitale Übereinanderlagerung von FITC- (A + D) und DAPI-Signalen (B + E), 600fache Vergrößerung.

3.2.5 Subzelluläre Lokalisation des Spastin-Proteins in NIH3T3-Zellen mittels immunzytochemischer Fluoreszenzanalyse

Um die subzelluläre Lokalisation des Spastins in Säugetierzellen zu charakterisieren, wurden NIH3T3-Zellen mit einem *SPG4*-c-myc-Konstrukt (3.2.3) transfiziert und nach Immunfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abb. 3.8).

NIH3T3-Zellen wurden auf einem Zweikammerobjektträger kultiviert und mit 1 µg Plasmid-DNA des *SPG4*-c-myc-Fusionskonstrukts transfiziert. Nach 48 h Wachstum wurden die Zellen mit Methanol auf dem Objektträger fixiert. Zur

Lokalisationsuntersuchung war eine immunzytochemische Markierung der c-myc-Erkennungssequenz notwendig, daher wurden die Zellen mit monoklonalem Kaninchen-Anti-Myc-IgG und wiederum gegen dies gerichtetem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Cy3-Konjugat immunfluoreszenzgefärbt. Nach Zugabe des primären und sekundären Antikörpers sowie DAPI-Behandlung konnten die entstandenen Immunkomplexe fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht und analysiert werden. Die Untersuchung zeigte, vermittelt durch den rot fluoreszierenden sekundären Antikörper, eine großflächige zytoplasmatische und vesikuläre Lokalisation des Spastins in den transfizierten NIH3T3-Zellen.

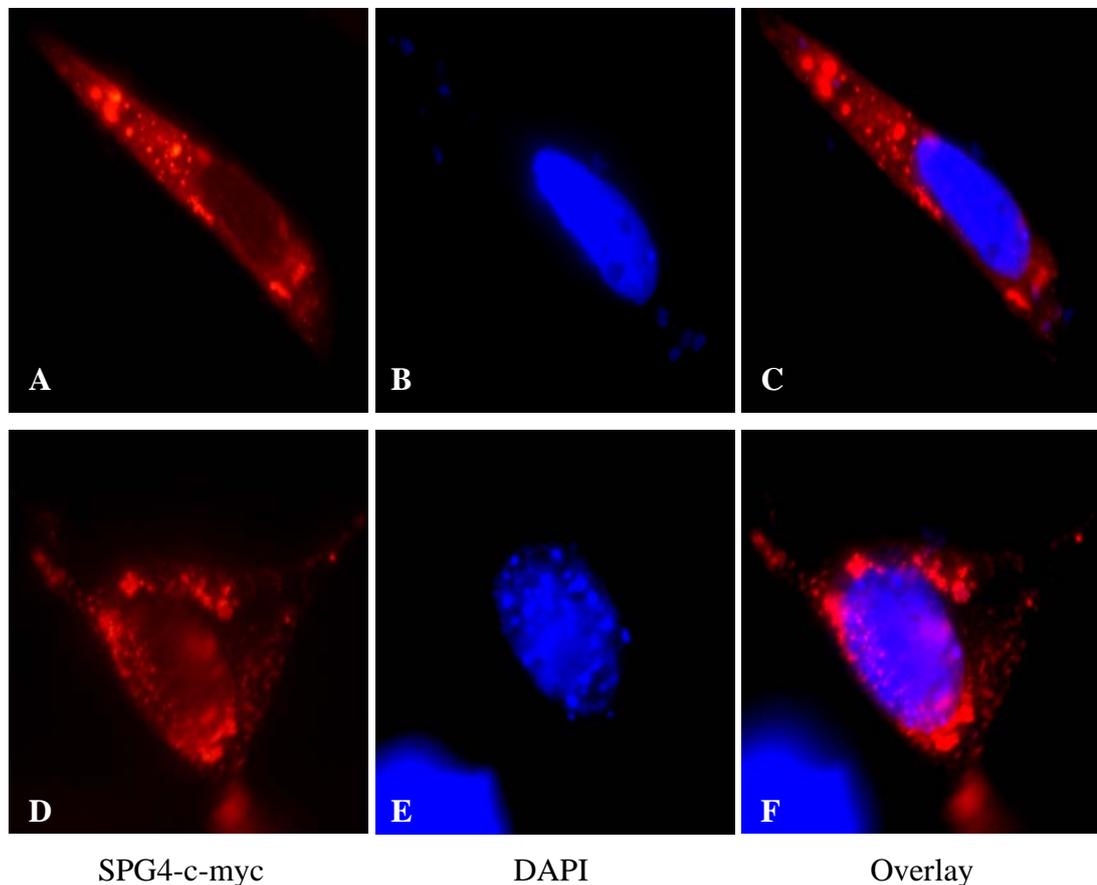


Abb. 3.8: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Lokalisation von Spastin in NIH3T3-Zellen. Filter: TRITC = 552 – 570 nm für SPG4-c-myc-Fusionsproteine (rotes Signal), DAPI = 355 – 360 nm für DAPI gefärbte Nuklei (blaues Signal). **A,D:** Lokalisation des SPG4-c-myc-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **B,E:** Anfärbung der nukleären DNA, 600fache Vergrößerung. **C,F:** Digitale Übereinanderlagerung von TRITC- (A + D) und DAPI-Signalen (B + E), 600fache Vergrößerung.

3.2.6 Interaktionsstudien

Nach Charakterisierung der subzellulären Lokalisation von Cops5 (3.2.4) und Spastin (3.2.5) in NIH3T3-Zellen sollte die putative Interaktion der beiden Proteine in Säugetierzellen mittels zweier biochemischer Experimente untersucht werden. Um die durch YH2-Versuche *in vitro* gezeigte Interaktion zu verifizieren, sollte diese zunächst durch Co-Lokalisationsstudien untersucht und anschließend durch eine Co-Immunopräzipitation bestätigt werden.

3.2.6.1 Co-Lokalisation von Cops5 und Spastin in NIH3T3-Zellen mittels direkter und immunzytochemischer Fluoreszenzanalyse

Die subzelluläre Co-Lokalisation von Cops5 und Spastin wurde sowohl mittels direkter als auch mittels immunzytochemischer Fluoreszenz überprüft. Die jeweils C-terminale bzw. N-terminale Lokalisation der mit den Proteinen fusionierten Erkennungssequenzen beinhaltete jedoch die Möglichkeit einer Co-Lokalisation, die letztlich nur auf Interaktion dieser Sequenzen beruhte. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die jeweilige Lage der Erkennungssequenz am C-terminalen oder N-terminalen Ende des Cops5 oder Spastin einen Einfluss auf deren subzelluläre Lokalisation hat (Abb. 3.9 und 3.10). Um diese Aspekte unwahrscheinlich werden zu lassen, wurde eine doppelte Studie durchgeführt. NIH3T3-Zellen wurden zum einen mit einem *COPS5*-Red- (3.2.2.3) und einem *SPG4*-EGFP-Konstrukt (3.2.3) co-transfiziert. In einer zweiten Studie wurde die Co-Transfektion hingegen mit einem *Cops5*-E2- (3.2.2.1) und einem *SPG4*-c-myc-Konstrukt (3.2.3) durchgeführt. Für die erste Studie wurden NIH3T3-Zellen auf einem Zweikammerobjektträger kultiviert und sowohl mit 1 µg Plasmid-DNA des *COPS5*-Red-Konstrukts als auch des *SPG4*-EGFP-Konstrukts co-transfiziert. Nach 48 h konnten diese auf dem Objektträger fixiert und analysiert werden. Die Untersuchung zeigte durch die unterschiedlichen Filter für FITC, TRITC und DAPI eine über das gesamte Zytoplasma verteilte vesikuläre Lokalisation der rot fluoreszierenden *COPS5*- und grün fluoreszierenden Spastin-Fusionsproteine. Das Expressionsmuster des *COPS5* ist dabei großenteils überlappend zu dem des Spastins, was auf eine mögliche Co-Lokalisation beider Fusionsproteine hindeutet.

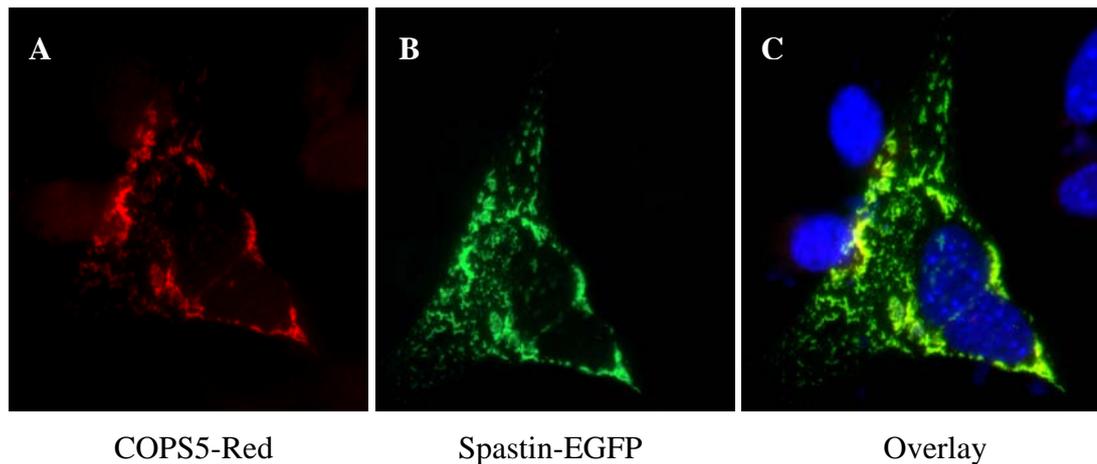


Abb. 3.9: Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Co-Lokalisation von COPS5 mit Spastin in NIH3T3-Zellen. Filter: TRITC = 546 nm für COPS5-Red-Fusionsproteine (rotes Signal), FITC = 450 – 490 nm für Spastin-EGFP-Fusionsproteine (grünes Signal), DAPI = 355 – 360 nm für DAPI-gefärbte Nuklei (blaues Signal) **A:** Lokalisation des COPS5-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **B** Lokalisation des Spastin-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **C:** Digitale Übereinanderlagerung der Signale mit Co-Lokalisation von COPS5 und Spastin, 600fache Vergrößerung.

Die zweite Co-Lokalisationsstudie erfolgte mit durch *Cops5-E2*- und *SPG4-c-myc*-Konstrukte transfizierten Zellen. Die subzelluläre Lokalisation musste daher immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht werden. Zur Detektierung mussten für die E2- und c-myc-Erkennungssequenz spezifische Antikörper verwendet werden. Der E2-Antikörper konnte anschließend durch einen FITC-konjugierten zweiten Antikörper, der Myc-Antikörper durch einen Cy3-konjugierten Antikörper unter dem Mikroskop visualisiert werden. Um eine gleichzeitige Präzipitation beider primärer Antikörper durch den sekundären Antikörper zu vermeiden, wurde ein Maus-Antikörperpaar (Maus-Anti-E2-IgG und Ziege-Anti-Maus-IgG-FITC) und ein Kaninchen-Antikörperpaar gewählt (Kaninchen-Anti-Myc-IgG und Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Cy3). Die nukleäre DNA wurde wieder durch DAPI sichtbar gemacht. Die so 48 h nach Co-Transfektion und Kultivierung behandelten Zellen zeigten ebenfalls das vesikuläre Verteilungsmuster der Cops5- und Spastin-Fusionsproteine im Zytoplasma der Zellen. Analog der Transfektion mit den Fluorophorfusionsproteinen der ersten Co-Lokalisationsstudie deutet auch hier das großteils überlappende Expressionsmuster auf eine Interaktion beider Proteine.

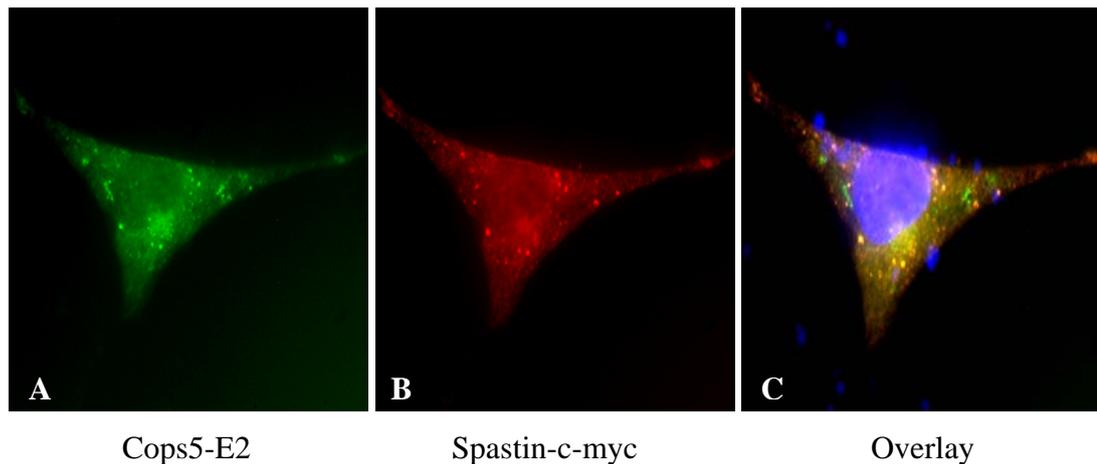


Abb. 3.10: Immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchung der subzellulären Co-Lokalisation von Cops5 mit Spastin in NIH3T3-Zellen. Filter: FITC = 450 - 490 nm für Cops5-Fusionsproteine (grünes Signal), TRITC = 552 - 570 nm für Spastin-c-myc-Fusionsproteine (rotes Signal), DAPI = 355 - 360 nm für DAPI gefärbte Nuklei (blaues Signal). **A:** Lokalisation des Cops5-E2-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **B** Lokalisation des Spastin-c-myc-Fusionsproteins im Zytoplasma der NIH3T3-Zellen, 600fache Vergrößerung. **C:** Digitale Übereinanderlagerung der Signale mit Co-Lokalisation von Cops5-E2-Fusionsprotein und Spastin-c-myc-Fusionsprotein, 600fache Vergrößerung.

3.2.6.2 Co-Immunopräzipitation von Cops5 und Spastin nach Isolierung aus NIH3T3-Zellen

Nach Demonstration der Co-Lokalisation von Cops5 und Spastin sollte mittels Co-Immunopräzipitation die putative Interaktion beider Proteine in Säugetierzellen verifiziert werden. Dazu wurden die generierten Fusionsproteine Cops5-E2 (3.2.2.1) und Spastin-c-myc (3.2.3) in einem gemeinsamen Ansatz verwandt. Das Prinzip bestand in der Isolierung eines Fusionsproteins mit Hilfe eines an magnetische Partikel gekoppelten Antikörpers aus dem Gesamtproteinextrakt (Abb. 3.11), der aus co-transfizierten NIH3T3-Zellen gewonnen wurde. Der mitisolierte putative Interaktionspartner konnte dann in einem weiteren Schritt durch einen zweiten gegen ihn gerichteten Antikörper nachgewiesen und visualisiert werden.

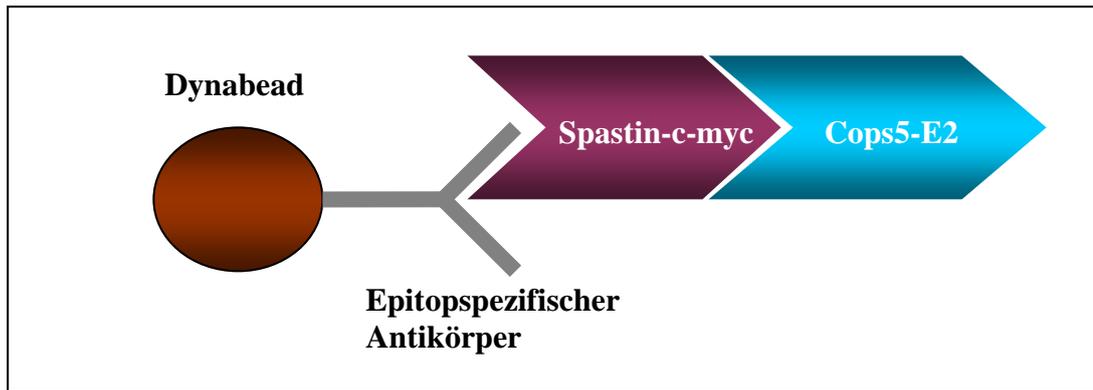


Abb. 3.11: Schematische Darstellung der Co-Immunopräzipitation.

Das Fusionsprotein wird durch sein Epitop mittels eines spezifischen, an einen magnetischen Partikel gekoppelten Antikörper präzipitiert. Im Falle einer Interaktion mit dem zweiten Fusionsprotein wird dieses mit präzipitiert und kann durch einen zweiten Antikörper anschließend visualisiert werden.

Kultivierte NIH3T3-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit jeweils 3 µg DNA der pQM-NTag/A-Intron-*Cops5*- und pCS2-3-*SPG4*-Vektoren co-transfiziert und nach 48 h die Proteine extrahiert. Anschließend erfolgte die eigentliche Co-Immunopräzipitation. Die pelletierten Fusionsprotein-Antikörperkomplexe wurden durch die SDS-PAGE aufgetrennt und konnten nach einem Western-Blot membrangebunden immunologisch detektiert werden. Die eingesetzten Konstrukte *Cops5*-E2 und *SPG4*-c-myc enthielten eine Sequenz für die antikörperspezifischen Epitope E2 bzw. c-myc. Mit einem monoklonalen Maus-Anti-E2-Antikörper wurde zuerst *Cops5* präzipitiert und anschließend auf der Membran *Spastin* mittels Kaninchen-Anti-Myc-Antikörper in Verbindung mit monoklonalem Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-Alkalische-Phosphatase-Konjugat detektiert (Abb. 3.12). Der so angefärbte Komplex hatte die erwartete Größe von 68 kDa. Das Ergebnis bestätigt die Interaktion von *Cops5* mit *Spastin* in NIH3T3-Zellen.

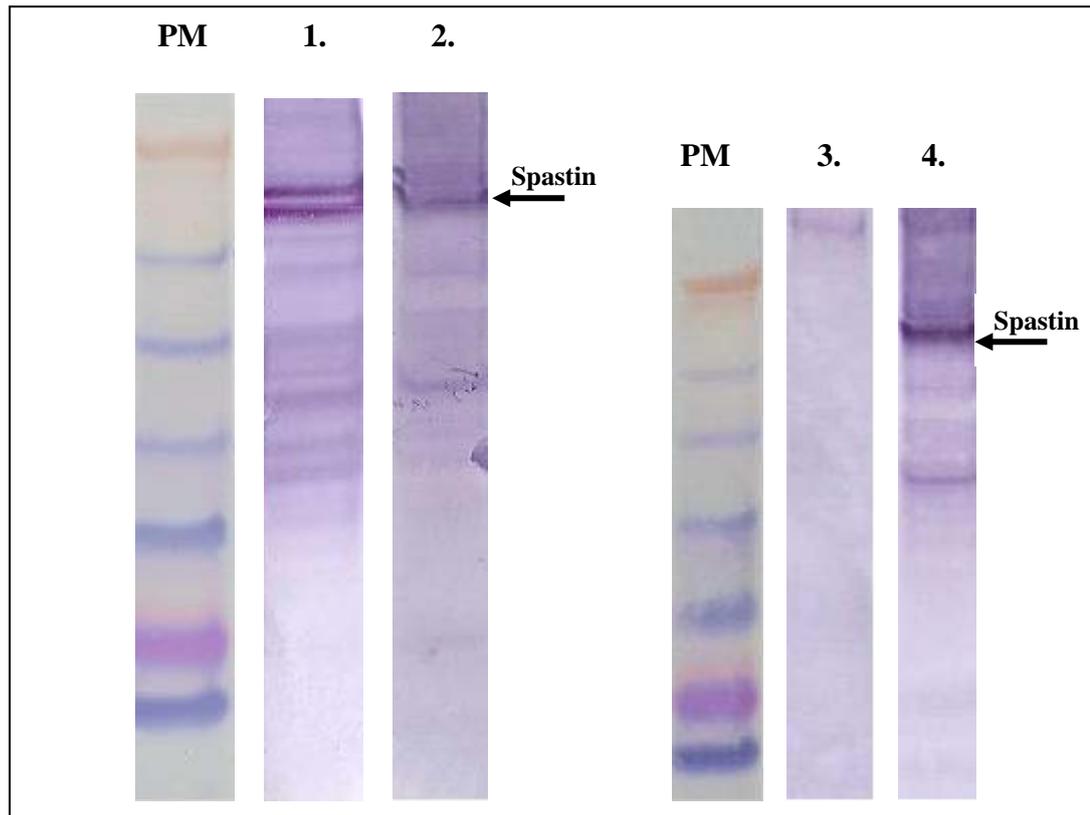


Abb. 3.12: Co-Immunopräzipitation von Cops5 und Spastin nach Isolierung aus NIH3T3-Zellen. Cops5-E2 wurde mittels spezifischen E2-Antikörper präzipitiert und das interagierende Spastin-c-myc anschließend durch einen spezifischen myc-Antikörper detektiert. PM = Proteinmarker. **1.** Positivkontrolle: Anhand des zur Detektion benutzten zweiten Antikörpers gegen die myc-Erkennungssequenz wurde Spastin-c-myc im Zelllysate co-transfizierter Zellen ohne vorherige Präzipitation nachgewiesen. **2. + 4.** Interaktion von Cops5 + Spastin: Präzipitation im Zelllysate der co-transfizierten NIH3T3-Zellen durch den ersten Antikörper gegen die E2-Erkennungssequenz des Cops5 und anschließende Detektion von Spastin mittels eines zweiten Antikörpers gegen die myc-Erkennungssequenz. **3.** Negativkontrolle: Keine Detektion von Spastin im Zelllysate nicht transfizierter Zellen.

3.3 Sequenzierung des *COPS5*-Gens von Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP

Die HSP bilden eine genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Klinisch lassen sich diese noch in eine reine und in eine komplizierte Form mit zusätzlichen neurologischen Symptomen klassifizieren. Für beide Formen kann die Vererbung autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal-rezessiv erblich folgen. Dabei entfallen nahezu 80 % der Fälle

auf die autosomal-dominante und etwa 20 % auf die autosomal-rezessive Form. Zu den bis dato 39 bekannten chromosomalen Loci sind erst 16 Genprodukte identifiziert worden. So besteht die Möglichkeit, dass ein Interaktionspartner des Spastins ebenfalls kausal für eine HSP sein kann. Im Rahmen der Charakterisierung von Cops5 durch diese Arbeit (3.2) konnte die Interaktion mit Spastin validiert werden. Auffällig ist, dass der chromosomale Locus von COPS5 in der Nähe des HSP-Locus SPG5 liegt. Für diesen Locus wurde bisher kein Genprodukt identifiziert. Daher wurden mittels Sequenzanalyse die DNA-Proben von 20 Patienten mit einer klinisch diagnostizierten HSP und Ausschluß von Veränderungen in den für SPG3A und SPG4 kodierenden Genen auf Mutationen im Gen für *COPS5* untersucht.

3.3.1 Identifizierung der Exon/Intron-Übergänge und Amplifizierung der Exons von *COPS5*

Die Exon/Intron-Übergänge der *COPS5*-DNA-Sequenz auf genomischer Ebene wurden mithilfe des NCBI-Programms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ermittelt. *COPS5* besteht aus 8 Exons, das Startcodon lokalisiert im ersten Exon, das Stopcodon im letzten Exon. Um auch die Exon/Intron-Übergänge sequenzieren zu können, wurden spezifische, die Exons flankierende Primer generiert. Nach Etablierung eines PCR-Programms an genomischer DNA zur Amplifizierung aller Exons mit ihren Intron-Übergängen unter Verwendung der generierten Primer konnten die 8 Exons sequenziert werden. Dafür kamen die gleichen spezifischen Primer zum Einsatz. Zunächst wurde mit einem Forward-Primer sequenziert und im Falle einer Veränderung auf DNA-Ebene ebenfalls mit einem Reverse-Primer. Das Ergebnis ist jeweils durch eine wiederholte Amplifizierung und Sequenzierung des betreffenden Exons verifiziert worden.

3.3.2 Veränderungen der *COPS5*-Sequenz auf DNA-Ebene

Durch Sequenzierung der Exon-Bereiche einschließlich der angrenzenden intronischen Übergänge von 20 Patienten konnten 3 Veränderungen (Tab 3.1) im

COPS5-Gen gefunden werden. Die Veränderungen betreffen zum einen die 5'-UTR, zum anderen aber auch den exonischen und intronischen Bereich (Abb. 3.13). Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes bedingt die gefundene Veränderung im Bereich des zweiten Exons an der letzten Stelle eines Triplets jedoch keinen Austausch einer Aminosäure.

Bereich	Veränderung	Aminosäure
5'UTR	5'UTR-49A>G	-
Exon 2	c.371A>G	A124A
Intron 3	IVS3+75T>C	-

Tab. 3.1: Übersicht der Veränderungen im *COPS5*-Gen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter Hereditärer Spastischer Paraplegie.

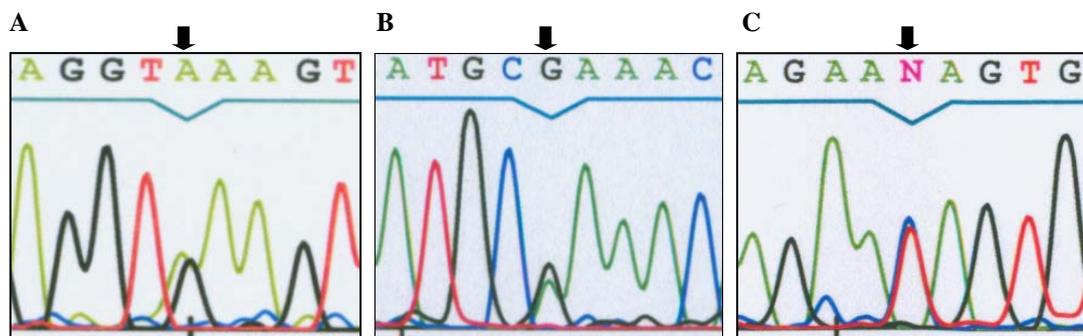


Abb. 3.13: Basenaustausch im *COPS5*-Gen bei Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP. **A:** Veränderung in der 5'UTR. An Position -49 unterscheiden sich bei 6 Patienten beide DNA-Stränge in einer Base und führen so zu einem übereinander gelagerten Signal. **B:** Basenaustausch an Pos. 371 im Exon 2. Bei einem Patienten fand sich ein heterozygoter Tausch A>G. Da es die letzte Base des Triplets GCA ist, kodiert das veränderte Triplett GCG ebenfalls für die Aminosäure Alanin. **C:** Veränderung im intronischen Bereich 3. Ein heterozygoter Basentausch im Intron 3 an Pos. +75 von Thymin zu Cytosin konnte bei 11 Patienten demonstriert werden.

4 Diskussion

4.1 Problemstellung

Die Hereditären Spastischen Paraplegien als neurodegenerative Erkrankungen bilden eine heterogene Gruppe mit derzeit weit über 30 identifizierten Genloci. Die ursächlichen Gene und Genprodukte sind jedoch nur für 16 Loci bekannt. Mit der Hypothese, dass mittels direkter Wechselwirkung die intrazelluläre Funktion des Spastins durch Interaktionspartner beeinflusst wird und diese Partner damit selbst eine pathophysiologische Relevanz als Kandidaten für eine HSP besitzen, wurde mit einem Yeast-Two-Hybrid-System nach möglichen interagierenden Proteinen gesucht. Vier putative Partner als mögliche Kandidaten konnten mittels dieser Methode identifiziert werden: COPS5, RTN1, RTN3 und FLJ40626 (Böhm, 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine molekulare Charakterisierung des *COPS5*-Gens und seines Genproduktes als Kandidatengen für die Hereditäre Spastische Paraplegie.

In einem ersten Schritt sollte das COPS5-Genprodukt auf subzellulärer Ebene charakterisiert sowie die zuvor *in vitro* gefundene Interaktion mit Spastin verifiziert werden. Unabhängig von diesen Studien wurden in einem zweiten Schritt Mutationsanalysen in Bezug auf das *COPS5*-Gen bei HSP-Patienten durchgeführt, bei denen keine Mutation im *SPG3A*- und *SPG4*-Gen nachgewiesen werden konnte.

4.2 COPS5 als Interaktionspartner des Spastins

4.2.1 Struktur, Isoformen und subzelluläre Lokalisation von Spastin

Spastin wird in die Subgruppe 7 der AAA-ATPasen (ATPasen associated with various cellular activities) eingeteilt (Frickey und Lupas, 2004). Die AAA-Proteinfamilie zeichnet sich durch die Beteiligung an verschiedenen zellulären Prozessen aus. Neben der Genese von Zellorganellen und der Funktion in Proteasomen zählen hierzu auch der Transport an Membranen und die Regulation von Mikrotubuli (Vale, 2000).

Spastin enthält mehrere große Domänen (Abb. 4.1), neben der am C-Terminus lokalisierten AAA-Domäne findet sich N-terminal eine MIT- (microtubule-interacting and endosomal trafficking) Domäne. Ebenfalls am N-terminalen Ende des Spastins liegt zusätzlich noch eine mögliche Transmembrandomäne (Salinas et al., 2007). Darüber hinaus konnten NLS- (nuclear localization signals) und NES- (nuclear export signals) Motive in der Polypeptidkette identifiziert werden (Beetz et al., 2004; Claudiani et al., 2005).

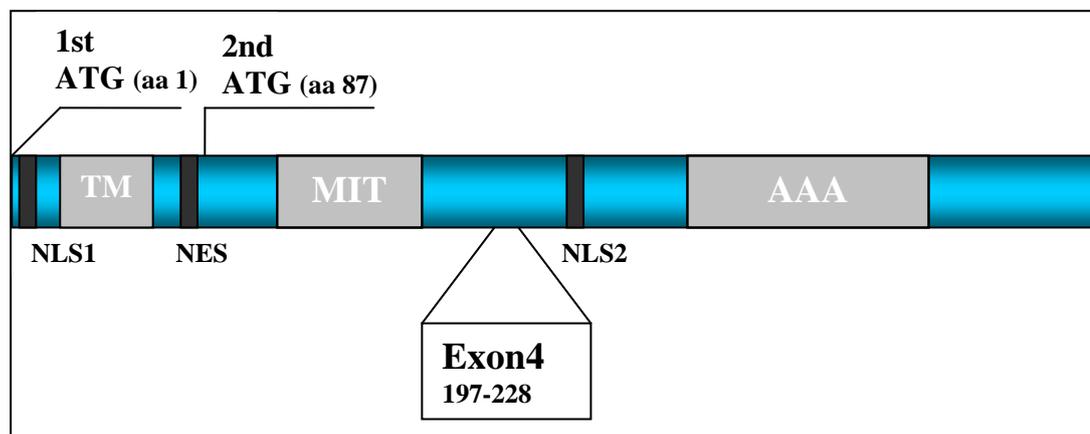


Abb. 4.1: Schematische Darstellung der Spastin-Struktur. Spastin enthält 3 Hauptdomänen sowie drei funktionelle Lokalisationssignale. TM = Transmembrandomäne (aa 57-79). MIT = microtubule-interacting and endosomal trafficking domain (aa 116-194). AAA = ATPase associated with various cellular activities (aa 374-510). NLS = nuclear localization signal: NLS1 (aa 4-11), NLS2 (aa 309-312). NES = nuclear export signal (aa 50-87). Adaptiert nach Salinas et al. (2007).

Zur subzellulären Lokalisation des Spastins gibt es verschiedene, z.T. widersprüchliche Angaben. Erste Studien beschrieben es in neuronalen Zellen als ein nukleäres Protein (Charvin et al., 2003). Über eine zytoplasmatische und/oder eine nukleäre Lokalisation in Abhängigkeit von der neuronalen Zellpopulation wurde jedoch ebenso berichtet (Wharton et al., 2003; Beetz et al., 2004). Dabei ist zu beachten, dass bei den Experimenten verschiedene Isoformen des Spastins eingesetzt wurden (Tab. 4.1). Claudiani et al. publizierten hierzu 2005 eine Studie, die zeigte, dass von der *SPG4*-mRNA zwei Isoformen translatiert werden können mit etwa 60 bzw. 68 kDa Größe. Im Gegensatz zur längeren Isoform mit Translation beginnend am ersten ATG-Startcodon, lässt die kürzere Isoform ohne die ersten 86 Aminosäuren mit Translationsbeginn am zweiten ATG-Startcodon die postulierte Transmembrandomäne und das NES vermissen. Beide Varianten werden in den Nukleus importiert, aber die das NES enthaltende größere 68-kDa-Isoform wird aktiv wieder exportiert. Während die kürzere Isoform in relevanten Mengen sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma präsent ist, scheint die größere 68-kDa-Isoform wieder aus dem Nukleus transportiert zu werden und lokalisiert zytoplasmatisch. Mit Blick auf die Hereditäre Spastische Paraplegie erscheint weiterhin bemerkenswert, dass die längere, mehrheitlich zytoplasmatische Isoform zwar absolut betrachtet in geringerer Menge translatiert wird, aber im Gehirn und im Rückenmark von Mäusen und damit zweier im Rahmen der HSP histopathologisch besonders relevanter Gewebe stärker angereichert ist als in anderen Geweben. Innerhalb des Zytoplasmas wiederum ist Spastin im Bereich der Spindelpole und den Mittelkörpern ebenso vermehrt angereichert wie in den distalen Axonen von Motorneuronen (Errico et al., 2004). In *Drosophila melanogaster* lokalisiert Spastin ebenfalls in den Axonen und Synapsengebieten (Trotta et al., 2004).

Spastin Isoform	MW (kDa)
1st ATG; +Ex4	67.2
2nd ATG; +Ex4	58.0
1st ATG; Δ Ex4	63.6
2nd ATG; Δ Ex4	54.4

Tab. 4.1: Übersicht der Spastinisoformentypen und ihrer Molekulargewichte. Es wurde über verschiedene Isoformen berichtet, abhängig vom Gebrauch des ersten oder zweiten ATG-Startcodons und der An- oder Abwesenheit von Exon 4 (aa 197-228).

Claudiani et al. haben ebenfalls darauf hingewiesen, dass die Regulation des präferierten ATG-Startcodons und damit folglich der translatierten Isoform durch die 5'-untranslatierte Region kontrolliert wird. Ein Fehlen dieser Region in für Spastin kodierenden Plasmiden führt daher zu einer verstärkten Expression der größeren Isoform mit zytoplasmatischem Verteilungsmuster.

Das Verteilungsmuster für Plasmide ohne die 5'UTR bestätigte sich in dieser Arbeit (3.2.5). Single Transfection von Säugetierzellen mit Spastin-Konstrukten, die mittels Antikörper sichtbar gemacht werden konnten, zeigten ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster.

4.2.2 COPS5

COPS5 (*homo sapiens cop9 constitutive morphogenic homolog subunit 5*) stellt die fünfte Untereinheit des COP9(CSN)-Signalosom-Komplexes dar und firmiert ebenfalls unter der Bezeichnung CSN5 bzw. JAB1 (Zhang et al., 2007). Der ursprünglich in *Arabidopsis* (Wei und Deng, 1992) identifizierte CSN-Komplex konnte 1998 von Seeger et al. auch in menschlichen Zellen nachgewiesen werden. Der an diversen zellulären und entwicklungsbiologischen Prozessen partizipierende Komplex setzt sich aus insgesamt 8 Untereinheiten (CSN1 – 8) zusammen, die ausgehend von *Arabidopsis* über *Drosophila* bis zum Menschen, durch eine hohe evolutionäre Konservierung imponieren. Den gesamten Komplex betrachtend, zeigt

hierbei die fünfte Untereinheit (CSN5/COPS5) die größte Übereinstimmung in der Identität der Aminosäuren. Die homologen COPS5-Proteine von *Arabidopsis* und Mensch weisen dabei in ihrer Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von etwa 60 % auf. Auch mit dem 19S-Proteasomen-lid-Komplex und dem eukaryotischen Initiationsfaktor eIF3 teilt der CSN-Komplex eine hohe strukturelle Ähnlichkeit. Hauptsächlich bedingt wird sie durch die vorherrschenden Domänen seiner Untereinheiten, PCI (proteasome, COP9 signalosome, initiation factor 3) und MPN (Mpr1-Pad1-N-terminal) (Wei und Deng, 2003). Das COPS5-Protein wurde ursprünglich im Rahmen seiner Interaktion mit Transkriptionsfaktoren identifiziert (Claret et al., 1996). Strukturell findet sich an seinem N-terminalen Ende ein als MPN-Domäne bekannter Abschnitt (Hofmann und Bucher, 1998). Eingebettet in diese ist ein Metalloprotease-Motiv, das als JAMM-Motiv bezeichnet wird (Cope et al., 2002). Es bildet ein katalytisches Zentrum zur Entfernung von Ubiquitin oder Ubiquitin-ähnlichen Proteinen von Bestandteilen des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (Burger-Kentischer et al., 2005). Darüber hinaus findet sich zwischen den Aminosäuren 233 und 242 ein spezieübergreifend konserviertes Leucin-reiches nukleäres Exportsignal (NES) (Abbildung 4.2) (Tomada et al., 2002).

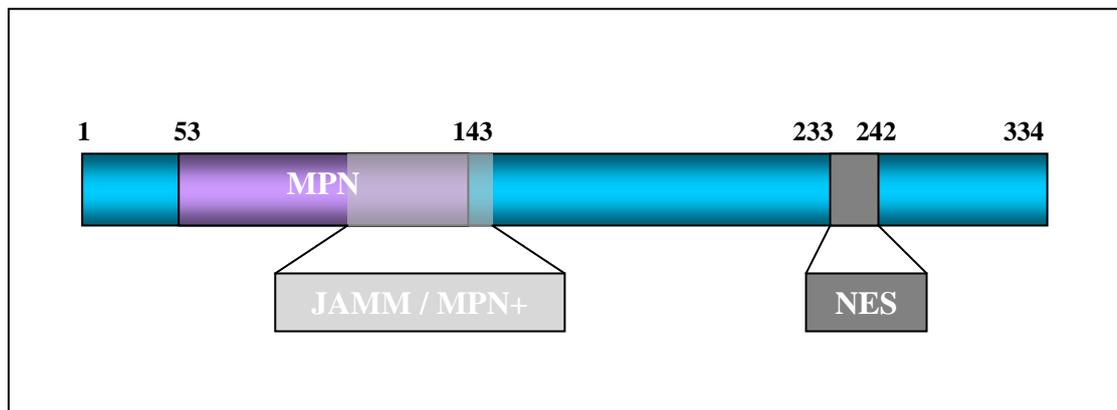


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der COPS5-Struktur. COPS5 enthält eine als MPN bezeichnete Domäne mit einem hierin eingebetteten Metalloprotease-Motiv und ein nukleäres Exportsignal. MPN = Mpr1-Pad1-N-terminal (aa 53-143). JAMM = Jab1/MPN domain metalloenzyme. NES = nuclear export signal (aa 233-242).

Neben der Integration in den CSN-Gesamtkomplex findet sich COPS5 in der Zelle jedoch auch in einer zweiten, nicht in den Gesamtkomplex integrierten Form mit zumeist geringerer molekularer Masse. Von einer monomerischen Form in *Arabidopsis* (Kwok et al., 1998) und Säugetierzellen (Yang et al., 2002) bis zu einer etwa 200 kDa großen Form in *Schizosaccharomyces pombe* (Mundt et al., 2002).

4.2.3 Subzelluläre Lokalisation von Cops5

Während der CSN-Holokomplex mehrheitlich nukleär lokalisiert gefunden wird (Staub et al., 1998; Schaefer et al., 1999), wird für COPS5 in seiner freien Form sowohl eine nukleäre als auch eine zytoplasmatische Verteilung berichtet (Bounpheng et al., 2000). Mini CSN-Komplexe, mit COPS5 und nur wenigen anderen CSN-Untereinheiten, zeigen hingegen ein überwiegend zytosolisches Verteilungsmuster. Es verdichtet sich aber das Bild, dass die Verteilung von COPS5 komplex reguliert wird. Wie erwähnt besitzt COPS5 ein nukleäres Transportsignal. Bei Punktmutationen in diesem Signal konnte gezeigt werden, dass die Fähigkeit von COPS5 zum nukleären Transfer und der anschließende Abbau des Inhibitors der Cyclin-abhängigen Kinase p27 reduziert ist (Tomoda et al., 2002). Tomoda et al. weisen ebenfalls daraufhin, dass die ektopische Überexpression von COPS5 mit Erkennungssequenzen für Antikörper in kultivierten Zellen zu einer verminderten Inkorporation in den CSN-Gesamtkomplex führt. Eine große Fraktion von überexprimiertem COPS5 findet sich in freier Form.

Vor Untersuchung der subzellulären Darstellung in dieser Arbeit wurde die Lokalisation von COPS5 anhand einer Expression in embryonalen und adulten Säugetierzellen analysiert. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Expressionsnachweis in neuronalen Geweben (3.1). Nach einer RT-PCR an isolierter RNA der Zellen konnten die erwarteten Amplifikate in einer gelelektrophoretischen Auftrennung demonstriert werden. Nach Demonstration der zellulären Expression folgte die Transfektion von Säugetierzellen (NIH3T3) mit Cops5-Konstrukten, die eine Erkennungssequenz an ihrem N-terminalen Ende trugen. Für diese Konstrukte konnte fluoreszenzmikroskopisch ein vesikulär zytoplasmatisches Verteilungsmuster gezeigt werden (3.2.4).

4.2.4 Cops5 interagiert mit Spastin

Das COPS5-Genprodukt konnte in einem Y2H-System von unserer Gruppe als ein putativer Interaktionspartner des Spastins identifiziert werden. Dabei ist aber zu beachten, dass diese Methode zum einen nicht spezifisch ist und zum anderen für *Saccharomyces cerevisiae* andere Proteine das Ergebnis beeinflussen können. Diese Proteine können möglicherweise eine Interaktion in Hefezellen bewirken, während sie in mehrzelligen eukaryotischen Organismen nicht vorkommen.

In dieser Studie konnte die Interaktion beider Proteine erstmals mittels Co-Immunopräzipitation bestätigt werden (3.2.6.2). Da die Generierung von humanen COPS5-Konstrukten mit Erkennungssequenz für Antikörper nicht gelang, wurde die homologe Mausvariante eingesetzt. Humanes COPS5-Protein und murines Cops5-Protein zeigen jedoch eine Sequenzübereinstimmung auf Peptidebene von nahezu 100 % (siehe Anhang). Die mit antikörperspezifischen Epitopen fusionierten Proteine Cops5 und Spastin wurden durch an Antikörper gekoppelte magnetische Partikel aus einem eukaryotischen Zelllysat (NIH3T3) co-immunopräzipitiert und Cops5 durch Western-Blot-Analyse anschließend detektiert. Somit konnte neben dem Y2H-System mit einer weiteren Methode gezeigt werden, dass Spastin in Säugetierzellen spezifisch mit Cops5 interagiert. Unterstützt wird dieses Ergebnis durch immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen der subzellulären Co-Lokalisation beider Proteine in NIH3T3-Zellen. Es konnte hier die zytoplasmatische Co-Lokalisation von COPS5 bzw. Cops5 und Spastin belegt werden (3.2.6.1).

4.2.5 Physiologische Relevanz der COPS5 - Spastin Interaktion

Das für Spastin kodierende *SPG4*-Gen stellt das am häufigsten mutierte HSP-Gen dar und ist für ungefähr etwa 40 % der autosomal-dominanten Fälle verantwortlich (Hazan et al., 1999). Dabei konnte eine Vielzahl von Mutationen identifiziert werden, Missense-, Nonsense- und Spleißsitemutationen, Deletionen und Insertionen (Fonknechten et al., 2000). Die meisten dieser Mutationen fallen in die oben beschriebene AAA-Domäne des *SPG4* (Lindsey et al., 2000). Die Sequenzanalyse von Spastin ergab Homologien mit Katanin, ebenfalls ein AAA-Protein. Katanin ist beteiligt am Zerlegen von Mikrotubuli (MT), es vermag mittels

einer Untereinheit MT zu binden, zu oligomerisieren und ATP-abhängig zu zerschneiden. Eine zweite Untereinheit heftet diesen Katanin-Komplex an das Zentrosom (Baas et al., 2005). Zusammen mit der Beobachtung, dass Spastin die MT-Dissoziation in Zellen unterstützt, ließ dies an eine Beteiligung von Spastin in der Regulation des MT-Umsatzes denken (Errico et al., 2002). MT sind für Zelltransport und Zellteilung sowie andere Funktionen essentielle Polymere. Länge und Erscheinungsform hängen dabei von assoziierten Proteinen (MAP) sowie stabilisierenden und destabilisierenden Faktoren ab, mit dem Ergebnis eines präzisen räumlichen und zeitlichen Verteilungsmusters (Nogales, 2000). Das Zerlegen von MT ist an die ATPase-Aktivität des Spastins gekoppelt, da ATPase-defiziente Spastinformen diese Fähigkeit nicht zeigen (Evans et al., 2005; Roll-Mecak und Vale 2005). Neben dieser Funktion konnte für Spastin und einige Formen mit Mutationen in der AAA-Domäne aber auch gezeigt werden, dass Spastin in der Lage ist, MT zu bündeln (Salinas et al., 2007). Mittels dem sogenannten NA14, einem Protein im Zentrosom von Säugetierzellen, wird die Interaktion zwischen Spastin und MT vermittelt. Deletionen in der NA14-bindenden Region des Spastins bewirken eine Behinderung der Interaktion mit MT, was zusammen mit dem Anreicherungsmuster des Spastins an den Spindelpolen, dem Zentrosom und den distalen Axonen, auf die Bedeutung des Spastins für die Dynamik und das Rearrangement des Zytoskeletts hinweist (Errico et al., 2004). Die Homöostase des axonalen Transports ist von großer Bedeutung in Bezug auf die Entstehung von Krankheiten und ruht auf einem funktionierendem MT-Netzwerk (Holzbaur, 2004). Ein gestörter mitochondrialer Transport konnte für Zellen mit Überexpression mutierten Spastins gezeigt und in postmortalen Rückenmarksschnitten von SPG4-Patienten gefunden werden (McDermott et al., 2003). Das histopathologische Korrelat der spastischen Paraplegien ist die distale Degeneration der langen Motorneurone des Rückenmarks. Diese sind aufgrund ihrer Länge und hohen Polarität in besonderer Weise von komplizierten und exakt wirkenden Transportmechanismen abhängig (Almenar-Queralt und Goldstein, 2001). Entsprechend kann den Mikrotubuli als einer Art Rückgrat der intrazellulären Transportmechanismen eine besondere Bedeutung zukommen.

Vom CSN-Komplex ist eine intrinsische Metalloproteaseaktivität bekannt, die innerhalb des COPS5-Proteins lokalisiert ist (Cope et al., 2002). Diese enzymatische

Aktivität vermag das Ubiquitin-ähnliche Protein NEDD8 von Cullinen zu entfernen, ein Prozess der als „Deneddylation“ bezeichnet wird (Schwechheimer et al., 2001; Lyapina et al., 2001). Culline wiederum dienen als eine Art Baugerüst für Ubiquitinligasen (Willems et al., 2004; Petroski und Deshaies, 2005). Zyklen von Neddylation und CSN-vermittelter Deneddylation regulieren dann diese Ligasen (Wee et al., 2005). Neben dieser Eigenschaft ist der CSN-Komplex mit Kinasen assoziiert (Uhle et al., 2003). Diese vermögen Substrate des Ubiquitin-Proteasomen-Systems zu modifizieren und beeinflussen so ihre Stabilität (Bech-Otschir et al., 2005). Schließlich ist der CSN-Komplex noch mit dem Deubiquinase Enzym USP 15 assoziiert (Hetfeld et al., 2005). Die Protease reguliert Ubiquitinligasen sowie andere Adaptorproteine des Komplexes und schützt sie so vor Autoubiquitination und anschließender Degradation (Wee et al., 2005). Tatsächlich interagiert COPS5 selbst mit unzähligen Proteinen, die oft das Zielobjekt für den CSN-Komplex darstellen. In einigen Fällen wie p53, p27, rLHR precursor und Smad4 stimuliert die COPS5-Bindung so den nachfolgenden Proteinabbau, während in anderen Fällen wie HIF1- α und c-Jun die Bindung einen stabilisierenden Effekt hat (Wei und Deng, 2003).

Auch eine funktionelle Beziehung zwischen dem CSN-UPS-Weg und dem Mikrotubulinnetzwerk konnte durch Peth et al. 2007 hergestellt werden. Das Mikrotubulinbindungsprotein EB1 interagiert mit dem CSN-Komplex. Die Bindung des Komplexes an das EB1 Protein wird über COPS5 vermittelt. Folge der Interaktion und einer folgenden damit assoziierten Phosphorylierung ist eine Stabilisierung des EB1 gegenüber einer Degradation durch das Ubiquitin-Proteasomen-System. Wie oben bereits erwähnt, kommt einem funktionierenden Mikrotubulinnetzwerk eine zentrale Rolle im intrazellulärem Vesikeltransport, dem Aufrechterhalten der Zellform oder der Chromosomensegregation zu. EB1 wiederum kommt eine wichtige Rolle im dynamischen Auf- und Abbau des MT-Netzwerkes zu, es bindet an die Enden von MT und fördert deren Polymerisation. In ihrer Studie konnten Peth et al. so zeigen, dass der CSN-Komplex und dem damit verbundenen UPS eine wesentliche Regulatorfunktion in der Dynamik und Funktion des Zytoskeletts zukommt. Ein zukünftiges Experiment sollte daher die COPS5 – Spastin Interaktion im Hinblick auf eine mögliche Kooperation beider Proteine / Proteinkomplexe in der Regulation der MT-Dynamik und damit einem

wahrscheinlichen Schlüsselement in der Pathophysiologie der Hereditären Spastischen Paraplegien untersuchen.

4.3 DNA-Analyse von Patienten mit klinisch diagnostizierter HSP

Hereditäre Spastische Paraplegien (HSP) zeigen sowohl eine klinische als auch eine genetische Heterogenität. Ihr charakteristisches klinisches Merkmal ist die fortschreitende Spastizität der unteren Extremitäten. Genetisch folgen die einzelnen Formen autosomal-dominanten, autosomal-rezessiven oder X-chromosomal vererbenden Mustern. Bis heute konnten 39 Loci (SPG) kartiert und dazu 16 verantwortliche Gene identifiziert werden. Die chromosomale Lokalisation 8q12.3 von *COPS5* stimmte zu Beginn dieser Arbeit mit dem SPG5-Locus überein, eine autosomal-rezessive Form der HSP (ARHSP). Während über 40 % der autosomal-dominanten Fälle an die beiden Hauptloci SPG3A und SPG4 gekoppelt sind, ist weniger über die autosomal-rezessiven Formen der HSP bekannt, da die kartierten Loci nur in wenigen Familien, oft nur in einer identifiziert wurden, und nur für einen geringen Prozentsatz der gesamten HSP-Fälle verantwortlich sind (Klebe et al. 2007). *COPS5*-Mutationen im Hinblick auf SPG5 sollten entsprechend möglich sein, wenn auch nicht von einem hochfrequenten Auftreten auszugehen war.

Wie die Gesamtheit der HSP so bilden auch die ARHSP in sich eine genetisch und klinisch sehr heterogene Gruppe. Viele der Entitäten wurden oft nur in einer Familie gefunden. Bisher wurden 17 Loci beschrieben (Tabelle 4.2), es konnten mit Paraplegin (SPG7), Spatacsin (SPG11), Spastizin (SPG15), Spartin (SPG20) und Maspardin (SPG21) aber erst fünf Gene identifiziert werden. Der SPG5-Locus wurde zuerst als eine 32.8 cM große Region auf Chromosom 8 beschrieben (Hentati et al., 1994), in der Folge bestätigt sowie weiter eingegrenzt (Coutinho et al., 1999). Klinische und genetische Untersuchungen an einer konsanguinen Familie konnten den Locus zwischen den polymorphen Markern D8S1833 und D8S285 erfassen, ein 23 cM großes Referenzintervall (Wilkinson et al., 2003). Innerhalb dieses Intervalls auf Chromosom 8 lokalisiert mit 8q12.3 auch *COPS5*. Entsprechend konnte *COPS5* und sein Genprodukt als bestätigter Interaktionspartner des Spastins als Kandidat für die Ursache einer HSP gelten.

	Genlocus	Genprodukt	Vererbung	HSP-Form
<i>SPG5</i>	8q12 – q13	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG7</i>	16q24.3	Paraplegin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG11</i>	2q33.1	Spatacsin	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG14</i>	3q27 – q28	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG15</i>	14q22 – q24	Spastizin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG20</i>	13q12.3	Spartin	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG21</i>	15q22.31	Maspardin	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG23</i>	1q24 – q 32	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG24</i>	13q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG25</i>	6q23.3 – q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG26</i>	12p11.1 – 12q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG27</i>	10q22.1 – q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG28</i>	14q21.3 – q22.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG30</i>	2q37.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG32</i>	14q12 – q21	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
<i>SPG35</i>	16q21 – q23.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
<i>SPG39</i>	19p13	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert

Tab. 4.2: Übersicht der autosomal-rezessiven Genloci und der entsprechenden Genprodukte im Zusammenhang mit der Spastischen Paraplegie. SPG = Spastische Paraplegie.

Es wurden daher die aus Leukozyten gewonnen DNA-Proben von insgesamt 20 Patienten mit Ausschluß von Veränderungen im *SPG3A*- und *SPG4*-Gen in Bezug auf Mutationen im *COPS5*-Gen analysiert. Es konnte ein Basenaustausch im codierenden Bereich des *COPS5*-Gens gefunden werden. Im Exon 2 wurde die Veränderung c.371A>G bei einem Patienten detektiert. Da der genetische Code degeneriert ist, hat dieser Basenaustausch an der dritten Position des Triplets keine

Auswirkung auf die dem Codon entsprechende Aminosäure (3.3). Sowohl das Basentriplett GCA, als auch das Triplet GCG kodiert für die Aminosäure Alanin. Eine weitere Veränderung, die bei sechs Patienten gefunden werden konnte, betraf die 5'-untranslatierte Region. Dort fand der heterozygote Basenaustausch -49A>G statt. Die dritte gefundene Veränderung betraf die intronische Sequenz (IVS3+75T>C) und konnte bei 11 Patienten des Untersuchungskollektivs demonstriert werden. Grundsätzlich können Veränderungen in untranslatierten und intronischen Bereichen Regulationssequenzen der Genexpression oder für die Prozessierung der RNA essentielle Sequenz betreffen, wozu eine genauere Analyse der identifizierten Veränderungen vorgenommen werden müsste. Damit können Mutationen in solchen Bereichen auch die Ursache für Erkrankungen sein. Aufgrund der Häufigkeit mit der die beiden letztgenannten Veränderungen detektiert wurden, dürfte es sich aber vermutlich um Polymorphismen handeln. Zur Bestätigung dieser Interpretation müsste eine statistisch signifikante Anzahl von Kontrollpersonen Antwort liefern. Nach Abschluß der Sequenzierungsarbeiten gelang es, den SPG5-Locus zwar weiter einzugrenzen, auf ein zuerst 11 cM (Muglia et al., 2004) und schließlich 3.8 cM großes Intervall (Klebe et al., 2007), in welches *COPS5* nicht mehr direkt lokalisiert. Mutationen in *COPS5* könnten jedoch auch einen gänzlich neuen Locus im Rahmen der genetisch heterogenen HSP darstellen. Wie Tab 4.2 zu entnehmen ist, liegen auch die autosomal-rezessiven Spastischen Paraplegien 15, 28 und 32 chromosomal eng beieinander. Hierbei wäre dann auch eine autosomal-dominante Variante zu berücksichtigen, da die in dieser Arbeit untersuchten 20 Patienten mit einer klinisch diagnostizierten HSP nur durch Ausschluss von Veränderungen in den für *SPG3A* und *SPG4* kodierenden Genen selektiert wurden.

5 Zusammenfassung

Die Hereditären Spastischen Paraplegien (HSP) bilden eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Gekennzeichnet sind diese insbesondere durch eine progrediente spastische Tonuserhöhung und Hyperreflexie der unteren Extremitäten. Das Vererbungsmuster der HSP folgt autosomal-dominanten, autosomal-rezessiven und X-chromosomalen Erbgängen. Bis dato konnten zwar 39 Loci identifiziert werden, doch die ursächlichen Gene sind in über der Hälfte der Fälle noch unbekannt. Eine besondere Bedeutung kommt dem *SPG4*-Gen zu. Veränderungen in diesem sind für ungefähr 40 % der autosomal-dominanten HSP verantwortlich. In einem Y2H konnte gezeigt werden, dass sein Genprodukt Spastin mit COPS5 interagiert. Ziel dieser Arbeit war deshalb eine molekulare Charakterisierung des *COPS5*-Gens und seines Genproduktes als mögliches Kandidatengen für die HSP.

Zuerst wurde die Transkription von *Cosp5* in Wildtyp-Mäusen untersucht. Das Transkript wurde sowohl in Geweben adulter als auch in Geweben embryonaler Mäuse nachgewiesen. Das *Cops5*-Transkript konnte ebenfalls in allen untersuchten neuronalen Geweben detektiert werden.

Mittels Immunfluoreszenz wurde eine zytoplasmatische Co-Lokalisation von Cops5 und Spastin in Säugetierzellen demonstriert. Die anschließende Co-Immunopräzipitation konnte die Interaktion beider Genprodukte bestätigen. Somit konnte mit verschiedenen Methoden gezeigt werden, dass Spastin mit Cops5 spezifisch interagiert.

Die chromosomale Lokalisation von *COPS5* stimmte zu Beginn der Arbeit mit dem ARHSP-Locus *SPG5* überein und war damit Kandidat für dieses noch nicht identifizierte Gen. Entsprechend wurden bei insgesamt 20 Patienten mit einer klinisch diagnostizierten HSP sowie Ausschluss von Veränderungen in den für *SPG3A* und *SPG4* kodierenden Genen Analysen in Bezug auf eventuelle Mutationen in *COPS5* vorgenommen. Es konnten drei Veränderungen – alle vermutlich Polymorphismen – in intronischen und exonischen Bereichen detektiert werden.

6 Anhang

6.1 *Spastin* (Homo sapiens) – Kodierende Sequenz für die Isoform II

1 **atg**aattctc cgggtggacg agggaagaag aaaggctccg gcggcgccag caaccgggtg
 ▲ **Exon1**
 61 cctcccaggc ctccgcccc ttgcctggcc cccgcccctc ccgcccggc gccggcccct
 121 ccgcccaggt cgccgcataa gcggaacctg tactatttct cctacceget gttttaggc
 181 ttcgcgctgc tgcgtttggt cgccttcac ctggggctcc tcttcgtgtg gctctgccag
 241 cgcttctccc gcgcctcat ggcagccaag aggagctccg gggccgcgcc agcacctgcc
 301 tcggcctcgg ccccgggccc ggtgcccggc ggcgaggccg agcgcgtccg agtcttcac
 361 aaacaggcct tcgagtacat ctccattgcc ctgcgcatcg atgaggatga gaaag**c**agga
 Exon2 ▲
 421 cagaaggagc aagctgtgga atggtataag aaaggtattg aagaactgga aaaaggaata
 481 gctgttatag ttacaggaca ag**g**tgaacag tgtgaaagag ctagacgcct tcaagctaaa
 Exon3 ▲
 541 atgatgacta atttggttat ggccaaggac cgcttacaac ttctag**a**aag tggagctgtt
 Exon5 ▲
 601 ccaaaaagaa aagaccctt aacacacact agtaattcac tgctctgttc aaaaacagtt
 661 atgaaaactg gatctgcagg cctttcaggc caccatagag cacctagtta cagtggttta
 721 tccatggttt ctggagtgaa acagggatct ggtcctgctc ctaccactca taag**g**tact
 Exon6 ▲
 781 ccgaaaacaa ataggacaaa taaaccttct acccctacaa ctgctactcg taagaaaaaa
 841 gacttgaaga attttaggaa tgtggacagc aaccttgcta accttataat gaatgaaatt
 901 gtggaca**a**g gaacagctgt taaatttgat gatatagctg gtcaagactt ggcaaaaacaa
 Exon7 ▲
 961 gcattgcaag aaattgttat tcttccttct ctgaggcctg ag**t**tgctcac agggcttaga
 Exon8 ▲
 1021 gctcctgcca gagggctgtt actccttggt ccacctggga atgggaagac aatgct**g**ct
 Exon9 ▲
 1081 aaagcagtag ctgcagaatc gaatgcaacc ttctttaata taagtctgctc aagtttaact
 1141 tcaaaatac**g** tgggagaag agagaaattg gtgagggtc tttttgctgt ggctcgagaa
 Exon10 ▲
 1201 cttcaacctt ctataat ttagat**a**tgaa gttgatagcc ttttgtgtga aagaagagaa
 Exon11 ▲
 1261 ggggagcacg atgctagtag acgcctaaaa actgaatttc taatagaatt tgatg**t**gta
 Exon12 ▲
 1321 cagtctgctg gagatgacag agtacttgta atgggtgcaa ctaataggcc acaagagctt
 1381 gatgaggctg ttctcag**g**cg tttcatcaaa cgggtatatg tgtctttacc aaatgaggag
 Exon13 ▲
 1441 **a**caagactac ttttgcttaa aaatctgta tgtaacaag gaagtccatt gacccaaaaa
 ▲ **Exon14**

1501 gaactagcac aacttgctag **a**atgactgat ggatactcag gaagtgcct aacagcttg
▲ **Exon15**

1561 gcaaagatg cagcactggg tcctatccga **g**actaaac cagaacaggt gaagaatag
▲ **Exon16**

1621 tctgccagtg **a**atgagaaa tattcgatta tctgacttca ctgaatcctt gaaaaaata
▲ **Exon17**

1681 aaacgcagcg tcagccctca aactttagaa gcgtacatac gttggaacaa ggactttgga

1741 gataccactg tt**taa**

6.2 Spastin (Homo sapiens) – Aminosäuresequenz für die Isoform II

1 mnspggrgkk ksgggnspv pprppppcla pappagpap ppsphknl yyfsyplfv
61 fallrlvafh lgllfvwlcq rfsralmaak rsgaapapa sasapavpg geaervrvfh
121 kgafeyisia lridedekag qkeqavewyk kgieelekgi avivtgqgeq cerarrlqak
181 mmtnlvmakd rlqllesgav pkrkdpltht snslprsktv mktgsaglsq hhrapsysgl
241 smvsgvkqgs gpapthkgt pknrtnkps tptatrkkk dlknfrnvs nlanlimnei
301 vngtavkfd diagqdlakq alqeivilps lrpelftglr aparglllfq ppgngktmla
361 kavaaesnat ffnisaaslt skyvgegek lvralfavare lqpsiifide vdsllcerre
421 gehdasrrlk tefliefdgv qsagddrvlv mgatnrrpql deavlrrfik rvyvslpnee
481 trllllknll ckqgspltqk elaqlarntd gysgsdltal akdaalgpil elkpeqvknm
541 sasemrnlrl sdfteslkki krsvspqtle ayirwnkdfg dttv

6.3 *COPS5 (Homo sapiens)* – Kodierende Sequenz

1 **atg**gcggcgt ccgggagcgg tatggcccag aaaacctggg aactggccaa caacatgcag
 ▲ **Exon1**
 61 gaagctcaga gtatcgaatg aatctacaaa tacgacaaga aacagcagca agaaatcctg
 121 gcggcgaagc cctggactaa ggatcaccat tactttaagt actgcaaaat ctcagcattg
 ▲ **Exon2**
 181 gctctgctga agatggatga gcatgccaga tcgggaggca acttggaagt gatgggtctg
 241 atgctaggaa aggtggatgg tgaaacctat atcattatgg acagttttgc tttgctgtg
 301 gagggcactg aaacccgagt aaatgctcag gctgctgcat atgaatacat ggctgcatac
 361 atagaaaatg caaaacagggt tggccgcctt gaaaatgcaa tcgggtggtg tcatagccac
 ▲ **Exon3**
 421 cctggctatg gctgctggct ttctgggatt gatgttagta ctcagatgct caatcagcag
 481 ttccaggaac catttgtagc agtgggtgatt gatccaacaa gaacaatac cgcagggaaa
 ▲ **Exon4**
 541 gtgaatcttg gcgcctttag gacataccca aagggtctaca aacctcctga tgaaggacct
 ▲ **Exon5**
 601 tctgagtacc agactattcc acttaataaa atagaagatt ttggtgtaca ctgcaaacaa
 ▲ **Exon6**
 661 tattatgcct tagaagtctc atatttcaaa tcctctttgg atcgcaaatt gcttgagctg
 721 ttgtggaata aatactgggt gaatacgttg agttcttcta gcttgcttac taatgcagac
 ▲ **Exon7**
 781 tataccactg gtcaggtctt tgatttgtct gaaaagttag agcagtcaga agcccagctg
 841 ggacgagga gtttcatggt gggtttagaa acgcatgacc gaaaatcaga agacaaactt
 901 gccaaagcta caagagacag ctgtaaaact accatagaag ctatccatgg attgatgtct
 ▲ **Exon8**
 961 caggttatta aggataaact gtttaataca attaacatct ct**taa**

6.5 COPS5 (*Homo sapiens*) – Aminosäuresequenz

1 maasgsgmaq ktwelannmq eaqsideiyk ydkkqqqeil aakpwtkdhh yfkyckisal
61 allkmvmhar sggmlevmgl mlgkvdgetm iimdsfalpv egtetrvnaq aaayeymaay
121 ienakqvgrl enaigwyhsh pgygcwlsqi dvstqmlnqq fqepfvavvi dptrtisagk
181 vnlgafertyp kgykppdegp seyqtiplnk iedfgvhckq yyalevsyfk sslrkllel
241 lwnkywvntl ssslltnad yttgqvfdls eklegseaql grgsfmlgle thdrksedkl
301 akatrdsect tieaihglms qvikdklfnq inis

6.6 Cops5 (*Mus musculus*) – Aminosäuresequenz

1 maasgsgmaq ktwelannmq eaqsideiyk ydkkqqqeil aakpwtkdhh yfkyckisal
61 allkmvmhar sggmlevmgl mlgkvdgetm iimdsfalpv egtetrvnaq aaayeymaay
121 ienakqvgrl enaigwyhsh pgygcwlsqi dvstqmlnqq fqepfvavvi dptrtisagk
181 vnlgafertyp kgykppdegp seyqtiplnk iedfgvhckq yyalevsyfk sslrkllel
241 lwnkywvntl ssslltnad yttgqvfdls eklegseaql grgsfmlgle thdrksedkl
301 akatrdsect tieaihglms qvikdklfnq inva

6.7 Aminosäuren-Alignment

Sequenz 1: COPS5 (Homo sapiens)

Sequenz 2: Cops5 (Mus musculus)

Identities = 332/334 (99%), Positives = 334/334 (100%), Gaps = 0/334 (0%)

Query 1 MAASGSGMAQKTWELANNMQEAQSIDEIYKYDKKQQQEILAAKPWTKDHHYFKYCKISAL 60

MAASGSGMAQKTWELANNMQEAQSIDEIYKYDKKQQQEILAAKPWTKDHHYFKYCKISAL

Sbjct 1 MAASGSGMAQKTWELANNMQEAQSIDEIYKYDKKQQQEILAAKPWTKDHHYFKYCKISAL 60

Query 61 ALLKMMHARSGGNLEVMGLMLGKVDGETMIIMDSFALPVEGTETRVNAQAAAYEYMAAY 120

ALLKMMHARSGGNLEVMGLMLGKVDGETMIIMDSFALPVEGTETRVNAQAAAYEYMAAY

Sbjct 61 ALLKMMHARSGGNLEVMGLMLGKVDGETMIIMDSFALPVEGTETRVNAQAAAYEYMAAY 120

Query 121 IENAKQVGRLENAIGWYHSHPGYGCWLSGIDVSTQMLNQQFQEPFVAVVIDPTRTISAGK 180

IENAKQVGRLENAIGWYHSHPGYGCWLSGIDVSTQMLNQQFQEPFVAVVIDPTRTISAGK

Sbjct 121 IENAKQVGRLENAIGWYHSHPGYGCWLSGIDVSTQMLNQQFQEPFVAVVIDPTRTISAGK 180

Query 181 VNLGAFRTYPKGYKPPDEGPSEYQTIPLNKIEDFGVHCKQYYALEVSYFKSSLDRKLEL 240

VNLGAFRTYPKGYKPPDEGPSEYQTIPLNKIEDFGVHCKQYYALEVSYFKSSLDRKLEL

Sbjct 181 VNLGAFRTYPKGYKPPDEGPSEYQTIPLNKIEDFGVHCKQYYALEVSYFKSSLDRKLEL 240

Query 241 LWNKYWVNTLSSSSLLTNADYTTGQVFDLSEKLEQSEAQLGRGSFMLGLETHDRKSEDKL 300

LWNKYWVNTLSSSSLLTNADYTTGQVFDLSEKLEQSEAQLGRGSFMLGLETHDRKSEDKL

Sbjct 241 LWNKYWVNTLSSSSLLTNADYTTGQVFDLSEKLEQSEAQLGRGSFMLGLETHDRKSEDKL 300

Query 301 AKATRDCKTTIEAIHGLMSQVIKDKLFNQINIS 334

AKATRDCKTTIEAIHGLMSQVIKDKLFNQIN++

Sbjct 301 AKATRDCKTTIEAIHGLMSQVIKDKLFNQINVA 334

7 Literaturverzeichnis

Abcam: pQM-NTag/A intron vector (ab1065); <http://www.abcam.com/pQM-NTag-A-intron-vector-ab1065.html>

Almenar-Queralt A, Goldstein LS (2001): Linkers, packages and pathways: new concepts in axonal transport. *Curr Opin Neurobiol* 11, 550-557

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-10

Baas PW, Karabay A, Qiang L (2005): Microtubules cut and run. *Trends Cell Biol* 15, 518-524

Bech-Otschir D, Kapelari B, Dubiel W: The COP9 Signalosome: Its Possible Role in the Ubiquitin System; in: *Protein Degradation vol. 1*; hrsg. v. Mayer R, Ciechanover A, Rechsteiner M; Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2005, 348-369

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

Birnboim HC, Doly J (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523

Böhm J: Identifizierung und Charakterisierung von putativen Interaktionspartnern des Spastins. Biologische Diplomarbeit Göttingen 2003

Bounpheng MA, Melnikova IN, Dodds SG, Chen H, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Christy BA (2000): Characterization of the mouse JAB1 cDNA and protein. *Gene* 242, 41–50

Bruyn RPM, Scheltens F: Hereditary spastic paraparesis (Strümpell-Lorrain); in: *Handbook of clinical neurology*, Vol 15: Diseases of the motor system; hrsg. v. de Jong JMBV; Elsevier Science Publishers B. V., Oxford 1991, 301–318

Bürger J, Fonknechten N, Hoeltzenbein M, Neumann L, Bratanoff E, Hazan J, Reis A (2000): Hereditary spastic paraplegia caused by mutations in the SPG4 gene. *Eur J Hum Genet* 8, 771–776

Burger-Kentischer A, Finkelmeier D, Thiele M, Schmucker J, Geiger G, Tovar GE, Bernhagen J (2005): Binding of JAB1/CSN5 to MIF is mediated by the MPN domain but is independent of the JAMM motif. *FEBS Lett* 579, 1693-1701

Charvin D, Cifuentes-Diaz C, Fonknechten N, Joshi V, Hazan J, Melki J, Betuing S (2003): Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus. *Hum Mol Genet* 12, 71–78

Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M (1996): A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature* 383, 453-457

Claudiani P, Riano E, Errico A, Andolfi G, Rugarli EI (2005): Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus. *Exp Cell Res* 309, 358-369

Clontech: pDsRed2-N1 Vector Information; Clontech 2003

Clontech: pEGFP-C1 Vector Information; Clontech 2002

- Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ (2002):** Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* 298, 608–611
- Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996):** FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173, 33-38
- Coutinho P, Barros J, Zemmouri R, Guimaraes J, Alves C, Choroa R, Lourenco E, Ribeiro P, Loureiro JL, Santos JV et al. (1999):** Clinical heterogeneity of autosomal recessive spastic paraplegias: Analysis of 106 patients in 46 families. *Arch Neurol* 56, 943-949
- 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
- Evans KJ, Gomes ER, Reisenweber SM, Gundersen GG, Lauring BP (2005):** Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing. *J Cell Biol* 168, 599-606
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983):** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132, 6-13
- Fink JK:** Hereditary spastic paraplegia; in: Emery and Rimoin's Principles and Practice of medical genetics, 4th edition; hrsg. v. Rimoin DL, Pyeritz RE, Connor JM, Korf BR; Churchill Livingstone, London 2002, 3124-3145

- Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Boentsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, McMonagle P et al. (2000):** Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 9, 637–644
- Frickey T, Lupas AN (2004):** Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 146, 2-10
- Hamel C (2006):** Retinitis pigmentosa. *Orphanet J Rare Dis* 1, 40
- Harding AE (1981):** Hereditary “pure“ spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 44, 871–883
- Harding AE:** Hereditary “pure“ spastic paraplegia; in: *The hereditary ataxias and related disorders*; hrsg. v. Harding AE; Churchill Livingstone, Edinburgh 1984, 174–190
- Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P et al. (1999):** Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23, 296–303
- Heckenlively JR:** Retinitis Pigmentosa; in: *Retinitis Pigmentosa*; hrsg. v. Heckenlively JR; Lippincott, Philadelphia 1988, 1-269
- Hentati A, Pericak-Vance MA, Hung WY, Belal S, Laing N, Boustany RM, Hentati F, Ben Hamida M, Siddique T (1994):** Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity. *Hum Mol Genet* 3, 1263-1267
- Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A et al. (2005):** The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* 15, 1217–1221

- Hofmann K, Bucher P (1998):** The PCI domain: a common theme in three multiprotein complexes. *Trends Biochem Sci.* 23, 204– 5
- Holzbaur EL (2004):** Motor neurons rely on motor proteins. *Trends Cell Biol* 14, 233-240
- Klebe S, Durr A, Bouslam N, Grid D, Paternotte C, Depienne C, Hanein S, Bouhouche A, Elleuch N, Azzedine H et al. (2007):** Spastic paraplegia 5: Locus refinement, candidate gene analysis and clinical description. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 144B, 854-861
- Kogan SC, Doherty M, Gitschier J (1987):** An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *New Engl J Med* 317, 985-990
- Kwok SF, Solano R, Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, Deng XW (1998):** Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell* 10, 1779– 1790
- Laemmli UK, Beguin F, Gujer-Kellenberger G (1970):** A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. *J Mol Biol* 47, 69-85
- Lindsey P, Lusher M, McDermott C, White K, Reid E, Rubinsztein D, Bashir R, Hazan J, Shaw P, Bushby K (2000):** Mutation analysis of the spastin gene (SPG4) in patients with hereditary spastic paraplegia. *J Med Genet* 37, 759–765
- Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Shevchenko A, Deshaies RJ (2001):** Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* 292, 1382–1385

- McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Bingley M, Wharton SB, Bushby KM, Shaw PJ (2003):** Hereditary spastic paraparesis: disrupted intracellular transport associated with spastin mutation. *Ann Neurol* 54, 748-759
- Meindl A, Dry K, Herrmann K, Manson F, Ciccodicola A, Edgar A, Carvalho MR, Achatz H, Hellebrand H, Lennon A et al. (1996):** A gene (RPGR) with homology to the RCC1 guanine nucleotide exchange factor is mutated in X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Nat Genet* 13, 35-42
- Muglia M, Criscuolo C, Magariello A, De Michele G, Scarano V, D'Adamo P, Ambrosio G, Gabriele AL, Patitucci A, Mazzei R et al. (2004):** Narrowing of the critical region in autosomal recessive spastic paraplegia linked to the SPG5 locus. *Neurogenetics* 5, 49-54
- Mullis KB, Faloona FA (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350
- Mundt KE, Liu C, Carr AM (2002):** Deletion mutants in COP9/signalosome subunits in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display distinct phenotypes. *Mol Biol Cell* 13, 493- 502
- Nogales E (2000):** Structural insights into microtubule function. *Annu Rev Biochem* 69, 277-302
- Patel S, Latterich M (1998):** AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends. Cell Biol* 8, 65-71
- Paulus W, Engel W, Sauter S, Neesen J (2002):** Hereditäre spastische Paraplegie. *Dtsch Arztebl* 99, A434-440
- Peth A, Boettcher JP, Dubiel W (2007):** Ubiquitin-dependent Proteolysis of the Microtubule End-binding Protein 1, EB1, Is Controlled by the COP9 Signalosome: Possible Consequences for Microtubule Filament Stability. *J Mol Biol* 368, 550-563

- Petroski MD, Deshaies RJ (2005):** Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 9–20
- Portera-Cailliau C, Sung CH, Nathans J, Adler R (1994):** Apoptotic photoreceptor cell death in mouse models of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 974–978
- Proukakis C, Hart P, Cornish A, Warner T, Crosby A (2002):** Three novel spastin (SPG4) mutations in families with autosomal dominant hereditary spastic paraplegia. *J Neurol Sci* 201, 65
- Reid E (2003):** Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias. *J Med Genet* 40, 81-86
- Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, Christopher, Sanderson CM (2005):** The hereditary spastic paraplegia protein spastin interacts with the ESCRT-III complex-associated endosomal protein CHMP1B. *Hum Mol Genet* 14, 19-38
- Roepman R, Bernoud-Hubac N, Schick DE, Maugeri A, Berger W, Ropers HH, Cremers FP, Ferreira PA (2000):** The retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR) interacts with novel transport-like proteins in the outer segments of rod photoreceptors. *Hum Mol Genet* 9, 2095–2105
- Roll-Mecak A, Vale RD (2005):** The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules. *Curr Biol* 15, 650-655
- Salinas S, Carazo-Salas RE, Proukakis C, Schiavo G, Warner TT (2007):** Spastin and microtubules: Functions in health and disease. *J Neurosci Res* 85, 2778-2782
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467

- Sauter S, Mitterski B, Klimpe S, Bonsch D, Schols L, Visbeck A, Papke T, Hopf HC, Engel W, Deufel T, Epplen JT, 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
- Schaefer L, Beermann ML, Miller JB (1999):** Coding sequence, genomic organization, chromosomal localization, and expression pattern of the signalosome component Cops2: the mouse homologue of *Drosophila* alien. *Genomics* 56, 310–16
- Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW (2001):** Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292, 1379–1382
- Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W (1998):** A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J* 12, 469–78
- Skre H (1974):** Hereditary spastic paraplegia in Western Norway. *Clin Genet* 6, 165–183
- Staub JM, Wei N, Deng XW (1996):** Evidence for FUS6 as a component of the nuclear-localized COP9 complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8, 2047–2056
- Strümpell A (1880):** Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Arch Psychiatr Nervenkr* 10, 676–717
- Svenson IK, Ashley-Koch AE, Gaskell PC, Riney TJ, Cumming WJ, Kingston HM, Hogan EL, Boustany RM, Vance JM, Nance MA et al. (2001):** Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia. *Am J Hum Genet* 68, 1077–85

- Tallaksen CM, Durr A, Brice A (2001):** Recent advances in hereditary spastic paraplegia. *Curr Opin Neurol* 14, 457-63
- Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, Yoshida M, Yoneda-Kato N, Kato JY (2002):** The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem* 277, 2302– 2310
- Trotta N, Orso G, Rossetto MG, Daga A, Broadie K (2004):** The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function. *Curr Biol* 14, 1135-1147
- Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, Huang X, Berse M, Sperling J, Schade R et al. (2003):** Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *EMBO J* 22, 1302–1312
- Vale RD (2000):** AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150, F13-19
- Wee S, Geyer RK, Toda T, Wolf DA (2005):** CSN facilitates Cullin-RING ubiquitin ligase function by counteracting autocatalytic adapter instability. *Nat Cell Biol* 7, 387–391
- Wei N, Deng XW (1992):** COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 4, 1507– 1518
- Wei N, Deng XW (2003):** The Cop9 Signalosome. *Annual Review of Cell and Dev Biol* 19, 261-286
- Werdelin L (1986):** Hereditary ataxias. Occurrence and clinical features. *Acta Neurol Scand* 73 (Suppl. 106), 124

- Wharton SB, McDermott CJ, Grierson AJ, Wood JD, Gelsthorpe C, Ince PG, Shaw PJ (2003):** The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 62, 1166–1177
- Wilkinson PA, Crosby AH, Turner C, Patel H, Wood NW, Schapira AH, Warner TT (2003):** A clinical and genetic study of SPG5A linked autosomal recessive hereditary spastic paraplegia. *Neurology* 61, 235-238
- Willems AR, Schwab M, Tyers M (2004):** A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695, 133–170
- Xiao-Chun Zhang, Jian Chen, Chun-Hui Su, Heng-Yin Yang, Mong-Hong Lee (2007):** Roles for CSN5 in control of p53/MDM2 activities. *J Cell Biochem* 103, 1219–1230
- Yang X, Menon S, Lykke-Andersen K, Tsuge T, Di X, Wang X, Rodriguez-Suarez RJ, Zhang H, Wei N (2002):** The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via neddylation of SCF Cul1. *Curr Biol* 12, 667– 72
- Zhao X, Alvarado D, Rainier S, Lemons R, Hedera P, Weber CH, Tükel T, Apak M, Heiman-Patterson T, Ming L et al. (2001):** Mutations in a newly identified GTPase cause autosomal dominant hereditary spastic paraparesis. *Nat Genet* 29, 326–31

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Engel für die Überlassung des Themas sowie die Unterstützung durch finanzielle und räumliche Ressourcen im Institut für Humangenetik. Sein immer währendes Interesse am Fortgang der Arbeit mit Diskussion, Anregungen und Korrekturen haben das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. J. Neesen für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Die freundschaftliche Atmosphäre, Geduld und Nachsichtigkeit mit einem jungen Medizinstudenten, der viel zu lernen hatte, haben diese Arbeit erst ermöglicht. Ein großer Dank gilt weiterhin für das stets vorhandene Interesse über kleine und große zeitliche und räumliche Distanzen hinweg, für die Diskussionsbereitschaft und die wiederholten Korrekturen während des Zusammenschreibens. Ich bedanke mich für die beste Betreuung, die man sich wünschen kann, während meiner gesamten Zeit im Labor und insbesondere auch über diese hinaus!

Auch bei allen Mitarbeitern des Labors 114 und des Instituts für Humangenetik möchte ich mich bedanken. Ich danke hier insbesondere Sajid Rashid für seine immer gewährte Hilfe und Unterstützung sowie Nadine Dörwald, ohne deren Hilfe ein Fortgang der Arbeit ebenfalls nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Am 17.09.1979 wurde ich in Hildesheim geboren.

Im Sommer 1986 wurde ich in die Grundschule Söhlde eingeschult. Von 1990 bis 1992 besuchte ich die Orientierungsstufe Söhlde. Dem folgte von 1992 bis 1999 das Scharnhorstgymnasium Hildesheim. Dort beendete ich meine Schullaufbahn mit der allgemeinen Hochschulreife.

Im Sommer 1999 schloss sich bis Mai 2000 der Wehrersatzdienst am Städtischen Krankenhaus Hildesheim an.

Im Oktober 2000 nahm ich das Humanmedizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen auf. Nach der ärztlichen Vorprüfung am 13.09.2002, dem ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 28.08.2003 und dem zweiten Abschnitt der ärztlichen Prüfung am 24.03.2006 folgte das Praktische Jahr. Beginnend an der Universitätsmedizin Göttingen am 17.04.2006 beendete ich dieses am Good Health Wanganui Hospital, Neuseeland am 18.03.2007. Mit Ablegen des dritten Abschnitts der ärztlichen Prüfung am 16.10.2007 schloss ich mein Studium ab. Am 13.12.2007 wurde mir die Approbation als Arzt erteilt.

Zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Dissertation bin ich im zweiten Assistenzjahr in der Abteilung Diagnostische Radiologie an der Universitätsmedizin Göttingen beschäftigt.