

Charakterisierung von polyklonalen Antikörpern gegen humanes Spastin

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franziska Ehms

geboren am 07.05.1982 in Schlema

24.06.2008

Erster Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Deufel,
Institut für klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik Jena,
Universitätsklinikum Jena

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. med. Christian Mawrin,
Institut für Neuropathologie,
Universitätsklinikum Jena

Dritter Gutachter: Prof Dr. med. Jörg B. Schulz,
Abteilung Neurodegeneration und Neurorestaurationsforschung/
Bereich Humanmedizin,
Universitätsklinikum Göttingen

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.02.2009

1 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
AAA	ATPases associated with diverse cellular activities
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Kurzbez. für Adenosintriphosphatasen
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw	beziehungsweise
c	centi-
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Cy3	Indocarbocyanin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked Immunosobentassay
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FSP	Familiäre Spastische Paraplegie
GFP	green fluorescence particle
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Kurzbez. für GTP-Hydrolasen
HEK293	human embryonic kidney cells (Epithelzellen)
HeLa	permanente Zelllinie humaner Epithelzellen des Cervix Karzinoms von Henrietta Lacks

1 Abkürzungsverzeichnis

HEp2	Zelllinie eines Laryngealkarzinoms
HSP	hereditäre spastische Paraplegie
Ig	Immunglobuline
k	Kilo-
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo Dalton
K388R	Clone mit Punktmutation (Lysin zu Arginin) der 388 Aminosäure von Spastin
KLH	keyhole limpet hemacyanin (gekoppelter Carrier)
l	Liter
LSM	Laser-Scanning-Microscop
μ	mikro-
m	milli-; Meter
MAP	microtubule associated protein
merge	übereinandergelagerte Fluoreszenzen im LSM
min	Minute
MIT	microtubule interacting and trafficking molecules
NES	nuclear export signal
NLS	nuclear localisation sequence
NSC-34	adulte neuronale Stammzellen
PBS	phosphate-buffered saline
Pre	Präimmunserum
SPG	Spastisches Paraplegie Gen
Tab.	Tabelle
tag	an ein Protein gekoppelt
TO-Pro-3	Monomerischer Cyanin Farbstoff
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Zusammenfassung	6
3	Einleitung	1
3.1	Hereditäre spastische Paraplegie	1
3.1.1	Klinische Formen der HSP	2
3.1.2	Diagnosekriterien	3
3.1.3	Pathologie	4
3.1.4	Therapie und Prognose	5
3.2	Molekulargenetische Grundlagen	5
3.2.1	Autosomal dominante Vererbung	7
3.2.2	Autosomal rezessive Vererbung	7
3.2.3	X-chromosomale Vererbung	8
3.2.4	Mutationen in dem Gen SPG4	8
3.3	Das Protein Spastin	9
3.3.1	Struktur und Funktion von Spastin	9
3.3.2	Die Lokalisation von Spastin in der Zelle	11
3.4	Antikörper	12
3.4.1	Polyklonale und monoklonale Antikörper	12
3.4.2	Antikörper in der Forschung über Spastin	13
4	Ziele der Arbeit	15
5	Material und Methoden	16
5.1	Material	16
5.1.1	Chemikalien und Substanzen	16
5.1.2	Geräte und Material	18
5.1.3	Medien und Substanzen für die zellbiologischen Methoden	19
5.1.4	Puffer und Gele	20
5.1.5	Zellen, Clone und Organe	22
5.1.6	Spastinpeptid und Antikörper	22
5.2	Zellbiologische Methoden	24

Inhaltsverzeichnis

5.2.1	Kultivierung von eukaryontischen Zellen	24
5.2.2	Splitten von Zellen	24
5.2.3	Anzüchten der Zellen	25
5.2.4	Transfektion von eukaryontischen Zellen	25
5.2.5	Probenvorbereitung für Western Blot	26
5.2.6	Verfahren zur Proteinbestimmung	26
5.3	Western Blot	28
5.3.1	SDS-Page Gelelektrophorese	28
5.3.2	Western Blot	29
5.3.3	Immundetektion	30
5.4	Immunzytochemie	31
5.4.1	Vorbereitung zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung	31
5.4.2	Indirekte Immunfluoreszenz, Färbung der Zellen	32
5.4.3	Kernfärbung und Einbetten	32
5.5	Aufreinigung der Antikörper	33
5.5.1	IgG-Affinitätschromatographie	33
5.5.2	Aufreinigung über das Peptid	33
6	Ergebnisse	35
6.1	Antikörpertitration, Aufreinigung, Zelllinien und Lysepuffer	35
6.1.1	Titration des Antiserums	35
6.1.2	Zelllinien und Lysepuffer	37
6.1.3	Aufreinigung der Antikörper	38
6.2	Charakterisierung der Antikörper	39
6.2.1	Spastinpeptiderkennung	39
6.2.2	Detektion des Proteins Spastin mittels Western Blot	42
6.2.3	Detektion des Proteins Spastin mittels Immunzytochemie	48
6.2.4	Tabellarische Übersicht der Ergebnisse	66
7	Diskussion	68
7.1	Aspekte zur Interpretation der Ergebnisse	68
7.2	Immunzytochemischer Nachweis	73
7.3	Molekulargewicht und Varianten von Spastin	74
8	Schlussfolgerungen	79
9	Literaturverzeichnis	80
10	Anhang	91

2 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden zwei neue polyklonale Antikörper gegen das humane Protein Spastin charakterisiert.

1999 entdeckten Hazan et al. das Protein Spastin bei der Erforschung der molekularen Prozesse im Zusammenhang mit der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) (Hazan et al. 1999). Die HSP umfasst eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Sie ist charakterisiert durch die progressive Ausbildung einer Spastik und Hyperreflexie der unteren Extremität (Reid 1999).

Eine kausale Therapie der HSP gibt es noch nicht.

Die häufigste Form der Vererbung erfolgt autosomal dominant, wobei zu 40% ein Zusammenhang mit der Mutation des SPG-4 Gens auf dem Chromosom 2 besteht. Dieses Gen kodiert das Protein Spastin, das eine AAA-Domäne (ATPases associated with diverse cellular activities) enthält und dieser Familie zugeordnet wird (Hazan et al. 1999). In der bisherigen Forschung zur Funktion und Lokalisation des Proteins Spastin sind voneinander abweichende Aussagen getroffen worden (Charvin et al. 2003, Wharton et al. 2003, Beetz et al. 2004, Errico et al. 2004, Salinas et al. 2005, Svenson et al. 2005, White et al. 2007). Dabei führte der Einsatz unterschiedlicher Antikörper zu verschiedenen Ergebnissen.

Die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Charakterisierung der zwei neu entwickelten Antikörper ist die Grundlage für die Beurteilung zur Verwendung der Antikörper in der weiteren Erforschung der molekularen Prozesse, in die das Protein Spastin involviert ist. Die Herstellung der Antikörper erfolgte durch die Immunisierung von jeweils zwei Kaninchen pro injizierter Spastinpeptidsequenz (Invitrogen Ltd, UK). Somit liegen vier Antiseren vor, die getestet wurden.

2 Zusammenfassung

Als Methoden zur Bestimmung der spezifischen Detektion des Proteins Spastin mit den neuen polyklonalen Antikörpern wurden der Western Blot und die Immunzytochemie gewählt. Beide Methoden ermöglichten die Beurteilung der effektiven Antikörperfunktion durch die Färbung von überexprimierten und nativen Spastin in unterschiedlichen humanen Zelllinien (HeLa-, HEK-293-Zellen) durch den Antikörper. Die Bestimmung der Spezifität erfolgte durch den Vergleich von Immuserum mit dem Präimmuserum, sowie durch die kompetitive Präinkubation mit dem Antigen (Spastinpeptid). Titrieren und Aufreinigen der Antiseren erhöhte die Qualität der Ergebnisdarstellung. Als Positivkontrolle der erfolgten Antikörperbildung durch die Immunisierung der Kaninchen ist die Färbung des Spastinpeptides im Western Blot durchgeführt worden. Für die Immunzytochemie wurden die Zellen so transfiziert, dass die Eigenfluoreszenz von GFP (green fluorescence particle) gekoppelt an Spastin mit der Fluoreszenz der detektierenden Antikörper verglichen werden konnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass Antikörper 1 (A801K) sowohl in dem Antiserum des Tieres 1 (C7771) als auch des Tieres 2 (C7772) das überexprimierte Protein Spastin im Western Blot erkennt. In der Immunzytochemie wird nur durch Antikörper 1 Tier 2 (A801K TierC7772) die Färbung von überexprimierten Spastin in transfizierten Zellen gezeigt, während Antikörper 1 Tier 1 (A801K TierC7771) das überexprimierte Protein nicht erkennt.

Endogenes Spastin kann im Western Blot aus nativen Homogenaten nicht nachgewiesen werden, da natives Spastin vermutlich unter der Nachweisgrenze für den Western Blot liegt. Natives Spastin kann auch nicht an intakten fixierten Zellen in der Immunzytochemie durch die Antikörper dargestellt werden.

Eine Empfehlung für den Einsatz des Antikörper 1 (A801K) kann daher nur eingeschränkt auf die Detektion von überexprimierten Spastin gegeben werden.

Antikörper 2 (A802K) zeigt keine Färbung des Proteins Spastin im Western Blot und in der Immunzytochemie, so dass keine Empfehlung zum weiteren Einsatz in der Forschung für diese Antiseren gegeben werden kann.

3 Einleitung

3.1 Hereditäre spastische Paraplegie

Die hereditäre spastische Paraplegie (HSP) umfasst eine klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen. Sie ist charakterisiert durch die progressive Ausbildung einer Spastik und Hyperreflexie der unteren Extremität. Die Prävalenz der Erkrankung zeigt starke regionale Unterschiede, die je nach Region und Studie von 0,9 bis 14 Erkrankungen auf 100.000 Einwohner (Skre 1974, Werdelin 1986) angegeben werden.

Beschrieben werden zwei Formen der Erkrankung. Bei der reinen oder unkomplizierten Form tritt die Spastik und Hyperreflexie allein auf, während bei der komplizierten Form zusätzliche neurologische Symptome wie z.B. Optikusatrophie, Taubheit und Demenz auftreten können (Reid 1999). Neuropathologisch findet man eine retrograde Degeneration der Axone der kaudalen Pyramidenbahn und der Hinterstränge im Rückenmark (Wharton et al. 2003). Eine kausale Therapie der hereditären spastischen Paraplegie gibt es bisher nicht. Das Erkrankungsalter weist zwei Altersgipfel auf, welche sich im Kindesalter und im Erwachsenenalter befinden (Reid 1999). Für die Mehrheit der Patienten ist die Lebenserwartung nicht beeinträchtigt.

Mehr als 30 Genloci sind für die hereditäre spastische Paraplegie bekannt (Klebe et al. 2006). Die Vererbung der Erkrankung erfolgt autosomal dominant, autosomal rezessiv oder X- chromosomal. Die reine Form der HSP wird zum überwiegenden Teil autosomal dominant vererbt. Zu 40% besteht ein Zusammenhang mit einer Mutation des SPG4-Gen auf dem Chromosom 2. Dieses Gen kodiert das Protein Spastin (Hazan et al. 1999). Die komplizierte Form der HSP ist relativ selten und wird meist autosomal rezessiv vererbt.

3.1.1 Klinische Formen der HSP

Im Jahre 1880 beschrieb erstmals der Neurologe Adolf von Strümpell die reine Form der hereditären spastischen Paraplegie (Strümpell 1880). Die heute bekannten Synonyme der hereditären spastischen Paraplegie (HSP) lauten Strümpell-Lorrainsche Erkrankung, Erb-Charcotsche Erkrankung, hereditäre spastische Paraparese, hereditäre spastische Spinalparalyse (HSP), spastische Spinalparalyse (SSP), familiäre spastische Paraplegie (FSP) und Spastische Paraplegie (SPG). Wie oben beschrieben kann das klinische Erscheinungsbild der HSP in die reine und in die komplizierte Form unterschieden werden. Die reine Form der hereditären spastischen Paraplegie ist die häufigste Form der Erkrankung mit einer Prävalenz von 9,6 auf 100 000 Einwohner in Europa (Polo et al. 1993).

Die Ausprägung der klinischen Symptome gibt keinen Hinweis auf das Vererbungsmuster. Es wird beobachtet, dass es inter- und intrafamiliär eine hohe Variabilität der Erkrankungerscheinung (Zeitpunkt des Auftretens, Schweregrad der Spastik) gibt. Das Spektrum der Ausprägung der HSP bei den Anlageträgern reicht von asymptomatisch (10 – 20% der Anlageträger) bis zum Verlust der Gehfähigkeit (10 – 20% der Anlageträger). In den Fällen mit neurologischen Symptomen findet sich immer eine progressive spastische Paraplegie.

Für den Beginn der Erkrankung werden zwei Altersgipfel beschrieben. So kann die hereditäre spastische Paraplegie im frühen Kindesalter einsetzen oder erst im späten Erwachsenenalter auftreten. 25% der Kinder einer Familie mit bekannter autosomal dominanter HSP zeigen bis zum 5. Lebensjahr eine neurologische Symptomatik, auffallend durch ein gestörtes Gangbild oder verzögerte Entwicklung der motorischen Meilensteine (Reid 1999). Die Erkrankung verläuft häufig schneller progressiv bei einem Beginn der Erkrankung nach dem 35. Lebensjahr. Harding unterscheidet die reine Form der HSP nach dem Beginn der Erkrankung und dem klinischen Erscheinungsbild in Typ I und Typ II. Bei dem von ihm beschriebenen Typ I beginnt die Erkrankung vor dem 35. Lebensjahr. Die Spastik ist stärker ausgeprägt als die Muskelschwäche und die Erkrankung verläuft langsamer progredient. Bei dem Typ II der Erkrankung liegt der Beginn nach dem 35.

Lebensjahr und die klinischen Symptome zeigen eine schnelle Progredienz. Die Spastik und Muskelschwäche sind gleich stark ausgeprägt, wobei häufig ein zusätzlicher distaler Sensibilitätsverlust und eine Blasenentleerungsstörung beobachtet wird (Harding 1981).

Bei klinischer Untersuchung zeigt die reine Form der HSP eine spastische Tonuserhöhung der Muskulatur, gesteigerte Eigenreflexe, eine Muskelschwäche und positive Pyramidenbahnzeichen. Zusätzlich können verminderte Pallästhesie sowie Blasenentleerungsstörungen auftreten. Sehr selten wurde eine Hyperreflexie und leichte Schwäche an der oberen Extremität beobachtet.

Die komplizierte Form der HSP zeigt zusätzlich zur Spastik Symptome wie z.B. Muskelschwund, Demenz, mentale Retardierung, Epilepsie, Kleinhirnzeichen, extrapyramidale Bewegungstörung, Optikusatrophie, pigmentäre Retinopathie und Ichthyosis (Reid 1999).

3.1.2 Diagnosekriterien

Die positive Familienanamnese ist ein zentrales Kriterium der hereditären spastischen Paraplegie. Da eine Paraplegie auch durch andere Erkrankungen hervorgerufen werden kann, sollten diese vor allem bei einer negativen Familienanamnese differentialdiagnostisch abgeklärt werden. Dabei kommen zahlreiche neurologische Erkrankungen in Betracht: Autoimmunerkrankungen wie multiple Sklerose, neurodegenerative Erkrankungen wie spinozerebelläre Ataxien oder amyotrophe Lateralsklerose, metabolische Störungen wie Vitamin- B12-Mangel, Vitamin-E-Mangel, A-Beta-Lipoproteinämien oder Leukodystrophien, strukturelle Anomalien wie die Arnold-Chiari-Malformation, degenerative (spondylotische) Wirbelsäulenveränderungen, Syringomyelie, Gefäßfehlbildungen oder Tumore sowie Infektionskrankheiten wie Neurolyues, AIDS oder die tropische spastische Paraparese.

Durch die neurologische Untersuchung kann die reine von der komplizierten Form der HSP unterschieden werden.

Als Diagnosekriterien der reinen Form der HSP gelten:

1. Spastische Tonuserhöhung der unteren Extremität
2. Parese der unteren Extremität, in der Regel weniger ausgeprägt als die Spastik
3. Hyperreflexie der unteren Extremität
4. Positive Familienanamnese
5. Positives Babinski-Zeichen
6. Blasenentleerungsstörung
7. Leichte Sensibilitätsstörung (reduziertes Vibrations- und Gelenklageempfinden)
8. Hyperreflexie und Schwäche der oberen Extremität
9. Ausschluss sonstiger Erkrankungen

Sind die Kriterien 1-4 und 9 erfüllt, so besteht eine klinisch gesicherte unkomplizierte autosomal dominante HSP. Sind diese Kriterien mit Ausnahme der positiven Familienanamnese erfüllt, kann auch eine unkomplizierte autosomal rezessive HSP oder X-gebundene HSP vorliegen (Sauter et al. 2002).

3.1.3 Pathologie

Als neuropathologisches Korrelat wird bei der spastischen Paraplegie eine retrograde Degeneration der langen Axone des lateralen corticospinalen Trakts beobachtet. Diese Fasern der Pyramidenbahn innervieren die Motoneurone des Vorderhorns. Das 2. Motoneuron innerviert wiederum die Muskeln. Die Glia-Zellen weisen keine pathologischen Veränderungen auf (Charvin et al. 2003). Die Markscheiden um die Axone sind somit intakt, während die Degeneration in den nicht mehr teilungsfähigen erregungsleitenden Axonen der Neuronen in der Pyramidenbahn beobachtet wird. Zusätzlich können die Hinterhörner betroffen sein, welche die sensorischen Qualitäten leiten.

Neuropathologische Veränderungen werden auch außerhalb der Pyramidenbahn und des Rückenmarkes beobachtet z.B. ein verschmälertes Corpus Callosum und eine Kleinhirnatrophie (Orlacchio et al. 2004).

3.1.4 Therapie und Prognose

Eine kausale Therapie der hereditären spastischen Paraplegie existiert nicht. Die aktuelle Forschung über die molekulargenetischen Mechanismen der HSP ist die Voraussetzung, um Konzepte neuer Therapiestrategien zu entwickeln.

Die derzeitige Behandlung der HSP wird symptomatisch mit Physiotherapie und Spasmolytika (z.B. Baclofen) durchgeführt. Bei Kontrakturen kann eine chirurgische Intervention empfehlenswert sein (Sauter et al. 2002).

Die Prognose für den Verlauf der Erkrankung ist schwer vorhersagbar. Während sich in einigen Fällen schwere Beeinträchtigungen durch die Erkrankung ergeben, sind andere Patienten im weiteren Verlauf kaum eingeschränkt. Die Lebenserwartung ist für die Mehrheit der Patienten nicht reduziert.

3.2 Molekulargenetische Grundlagen

Die hereditäre spastische Paraplegie ist, wie oben erwähnt, eine genetisch heterogene Erkrankung. So wurden auf chromosomaler DNA verschiedene Regionen erkannt, in denen eine Mutation zu dem klinischen Erscheinungsbild der HSP führen kann. Für diese Spastischen Paraplegie Gene (SPG) sind bereits 10 Genprodukte erkannt worden, deren Funktion und Lokalisation noch Gegenstand aktueller Forschung sind (Fink 2003, Simpson et al. 2003).

Die Erkrankung unterliegt verschiedenen Vererbungsmodi, so wird sie zu 70 – 80% autosomal dominant, zu 20% autosomal rezessiv und sehr selten X-chromosomal vererbt (Sauter et al 2002). Für jedes Vererbungsmuster sind mehrere Genloci bekannt (s. Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Übersicht der Mutationen der hereditären spastischen Paraplegie modifiziert n. Sauter et al. 2002

	Genlocus	Genprodukt	Vererbungsmodus	HSP-Form
SPG1	Xq28	L1-CAM	X-chromosomal	kompliziert
SPG2	Xq22	PLP	X-chromosomal	kompliziert
SPG3	14q11.2-q21	Altlastin	autosomal-dominant	rein

3 Einleitung

	Genlocus	Genprodukt	Vererbungsmodus	HSP-Form
SPG4	2p21-p24	Spastin	autosomal-dominant	rein/kompliziert
SPG5	8q	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
SPG6	15q11.1	NIPA1	autosomal-dominant	rein
SPG7	16q24.3	Paraplegin	autosomal-rezessiv	kompliziert/rein
SPG8	8q23-q24	unbekannt	autosomal-dominant	rein
SPG9	10q23.3-q24.2	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
SPG10	12q13	KIF5A	autosomal-dominant	rein
SPG11	15q13-15	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert/rein
SPG12	19q13	unbekannt	autosomal-dominant	rein
SPG13	2q24-34	HSP60	autosomal-dominant	rein
SPG14	3q27-q28	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG15	14q22-q24	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG16	Xq11.2	unbekannt	X-chromosomal	kompliziert
SPG17	11q12-q14	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
SPG18	Wird bestimmt	unbekannt		
SPG19	9q33-q34	unbekannt	autosomal-dominant	rein
SPG20	13q12.3	Spartin	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG21	15q22.31	Maspardin	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG22	Wird bestimmt	unbekannt		
SPG23	1q24-q32	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG24	13q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
SPG25	6q23.3-q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG26	12p11.1-12q14	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG27	10q22.1-10q24.1	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
SPG28	14q21.3-q22.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	rein
SPG29	1p31.1-1p21.1	unbekannt	autosomal-dominant	kompliziert
SPG30	2q37.3	unbekannt	autosomal-rezessiv	kompliziert
SPG31	2p12	REEP1 Protein	autosomal-dominant	rein
SPG33	10q24.2	ZFYVE27 Protein	autosomal-dominant	rein

3.2.1 Autosomal dominante Vererbung

Der autosomal dominante Erbgang ist mit 70 – 80% das häufigste Vererbungsmuster der hereditären spastischen Paraplegie. Bisher wurden 13 Genloci identifiziert. SPG3 (Hazan et al. 1993), SPG4 (Hazan et al. 1994), SPG6 (Rainier et al. 2003), SPG8 (Hedera et al.1999), SPG9 (Seri et al.1999), SPG10 (Reid et al. 1999), SPG12 (Reid et al. 2000), SPG13 (Fontaine et al. 2000), SPG17 (Patel et al. 2001), SPG19 (Valente et al. 2002), SPG29 (Orlacchio et al. 2005), SPG31 (Züchner et al. 2006) und SPG33 (Mannan et al. 2006). Bekannt ist das Genprodukt von SPG3, das Atlastin, welches eine GTPase der Familie der Dynamine darstellt. SPG4 kodiert das Spastin, ein Protein der AAA Familie (ATPases with diverse cellular activities). Diese beiden Proteine sind als Interaktionspartner miteinander beschrieben worden (Sanderson et al. 2006). Weiterhin bekannt ist das Genprodukt von SPG6 (NIPA1), das einen Magnesium Transporter darstellt (Goytain et al. 2007). Der Genlocus SPG10 kodiert das Protein KIF5A, welches in der schweren Kette von Kinesin lokalisiert und in den axonalen Transport involviert ist (Reid 2003). SPG13 kodiert ein mitochondriales Chaperonin Cpn60 (Hansen et al. 2002).

Die autosomal dominante hereditäre spastische Paraplegie manifestiert sich als reine oder komplizierte Form (s. Tabelle 1). Die klinische Ausprägung der am häufigsten beobachteten Mutationen des Genlocus SPG4 erfolgt hauptsächlich in der reinen Form.

3.2.2 Autosomal rezessive Vererbung

Für die autosomal rezessive Vererbung sind 15 Genloci bekannt. Diese sind SPG5 (Hentati et al.1994), SPG7 (Casari et al. 1998), SPG11 (Fink et al.1995), SPG14 (Vazza et al. 2000), SPG15 (Hughes et al. 2001), SPG20 (Patel et al. 2002), SPG21 (Simpson et al.2003), SPG23 (Blumen et al. 2003), SPG24 (Hodgkinson et al. 2002), SPG25 (Zortea et al. 2002), SPG26 (Wilkinson et al 2005), SPG27 (Meijer et al. 2004), SPG28 (Bouslam et al. 2005), SPG30 (Klebe et al. 2006). Beschrieben wurden bisher das Genprodukt von SPG7, welches das mitochondriale Protein Paraplegin ist und das Genprodukt von SPG20, welches das Troyersyndrom verursachende Protein Spartin darstellt. Mutationen in den Genloci SPG5, SPG24, SPG27 und SPG28 führen zu der klinisch reinen Form der autosomal rezessiven HSP. Die Genloci SPG11, SPG14, SPG15, SPG20, SPG21,

SPG23, SPG25, SPG26, SPG30 werden im Zusammenhang mit dem klinischen Bild der komplizierten Form der HSP beobachtet (s. Tabelle 1).

10–20% der hereditären spastischen Paraplegie werden autosomal rezessiv vererbt (Fink 2003).

3.2.3 X-chromosomale Vererbung

Es wurden drei X-chromosomal vererbte Genloci erkannt. Diese sind SPG1 (Jouet et al. 1994), SPG2 (Saugier-Weber et al. 1994) und SPG16 (Tamagaki et al. 2000). SPG1 kodiert als Genprodukt das L1 Zelladhäsionsmolekül L1-CAM, welches vorwiegend im zentralen Nervensystem lokalisiert ist. Eine Aufgabe von L1-CAM ist die Steuerung der Ausdifferenzierung von Neuronen (Jouet et al. 1994). SPG2 kodiert das Proteolipoprotein (PLP), welches ein intrinsisches Myelinprotein ist (Saugier-Weber et al. 1994). Tamagaki et al. fanden auf dem X-Chromosom den Genlocus SPG16 (Tamagaki et al. 2000). Mutationen in diesen drei Genloci führen zu dem klinischen Erscheinungsbild der komplizierten HSP. Insgesamt tritt die hereditäre spastische Paraplegie mit dieser Form der Vererbung sehr selten auf.

3.2.4 Mutationen in dem Gen SPG4

Hazan et al. identifizierten 1994 auf dem Chromosom 2 das autosomal dominant vererbte Spastische Paraplegie Gen 4 (SPG4) und 1999 das kodierte Genprodukt Spastin. Das SPG4-Gen besteht aus 17 Exons und erstreckt sich über einen Abschnitt von 90kb (Hazan et al. 1994, Hazan et al. 1999). Es sind inzwischen über 150 Mutationen in diesem Gen bekannt (Crippa et al. 2006). Bei den Mutationsformen handelt es sich um Deletionen, Insertionen und Substitutionen einzelner Basen (SNP). Durch Deletion kann eine frame-shift-Mutation (Rasterlesemutation) hervorgerufen werden. Die Basensubstitution führt zu beschriebenen Missense, Nonsense oder Splice-Site Mutationen. Bei der Missense Mutation erfolgt während der Translation der Austausch einer Aminosäure, welcher zu einer verändernden Funktion des Proteins führen kann. Dies ist der Fall bei der Mutation K388R. Dort ist eine Punktmutation von Adenin zu Guanin in Exon 8 (Base 1288) des SPG4 lokalisiert, welche zu dem Austausch der Aminosäure Lysin (K)

zu Arginin (R) an der Position 388 des Proteins führt (Fonknechten et al. 2000). Durch diesen Austausch erfolgt der Funktionsverlust der ATP-Hydrolyse des Proteins Spastin (Evans et al. 2005).

Die Nonsense Mutation führt mit dem Austausch einer Aminosäure zu einem Stopcodon und somit zum vorzeitigen Abbruch der Translation. Ist der Basenaustausch bei der Splice-Site-Mutation in der Nähe eines Intron-Exon-Überganges lokalisiert, fehlt das Exon, da es nicht transkribiert werden kann.

Eine Zuordnung der Mutationsformen zu einem spezifischen klinischen Erscheinungsbild konnte in den Studien nicht gezeigt werden (Crippa et al 2006).

3.3 Das Protein Spastin

3.3.1 Struktur und Funktion von Spastin

Das Protein Spastin ist das Genprodukt des Genlocus SPG4 (Hazan et al. 1999). Es besteht aus 616 Aminosäuren. Das Protein hat verschiedene funktionspezifische Domänen. Es enthält eine spezifische AAA-Domäne (ATPases associated with diverse cellular activities) und wird der Familie der AAA-Proteine zugeordnet (Hazan et al. 1999). Weiterhin enthält das Protein eine MIT-Domäne (mikrotubule interacting and trafficking molecules) (Ciccarelli et al. 2003), eine NLS-Domäne (nuclear localisation sequence) (Beetz et al. 2004), sowie zwei NES-Domänen (Nuclear export signal) (Claudiani et al. 2005).

Proteine der AAA-Familie sind involviert in den Zellzyklus, beteiligt am vesikulären Transport, der Peroxisomen Biogenese und der Proteolyse (Patel und Latterich 1998). Die ATPase Aktivität erfolgt durch die Hydrolyse des ATP in der AAA-Domäne. N-terminal sind die Proteine der AAA-Familie sehr variabel und können direkt oder indirekt, über eine Interaktion mit Adapterproteinen, an das Substrat binden. Die Funktion der AAA-Proteine wird somit durch ihre Lokalisation und die Interaktion mit Adapterproteinen bestimmt (Dougan et al. 2002).

3 Einleitung

Spastin enthält N-terminal eine MIT-Domäne (mikrotubule interacting and trafficking molecules) (Ciccarelli et al. 2003). Mikrotubuli sind Bestandteile des Cytoskelettes und fungieren als mechanische Stabilisatoren der Zelle. Sie sind beteiligt an dem intrazellulären Transport und der Zellteilung.

Die Mikrotubuli depolymerisierende Funktion von Spastin konnte bei *Drosophila melanogaster* und auch bei menschlichen Zellen nachgewiesen werden (Roll-Mecak und Vale 2005, Roll-Mecak und Vale 2008, Evans et al. 2005). Ein gestörter anterograde Organellentransport von Mitochondrien und Peroxisomen durch Beeinträchtigung der Mikrotubuli-Interaktion wird als mögliche Pathogenese der retrograden Degeneration langer Axone diskutiert (Mc Dermott et al. 2003).

Reid et al. weisen eine Interaktion der MIT-Domäne des Spastins mit dem ESCRT-III Komplex assoziierten endosomalen Adapterprotein CHMP1B nach. Ein gestörter intrazellulärer vesikulärer Transport könnte somit auch eine mögliche Ursache der Motoneuronenpathologie sein (Reid et al. 2005).

Errico et al. beschrieben das centrosomale Adapterprotein NA14 für eine Interaktion des Spastin mit Zentrosomen und Mikrotubuli. Sie beobachteten während der Mitose Spastin in Zellregionen mit dynamischen Mikrotubuliaktivitäten, z.B. an den Spindelpolen, der Mitosespindel und in der postmitotischen Phase an der Zellbrücke zwischen den Tochterzellen (midbody). Die Proteinfunktion ist abhängig von dem Zelltyp, dem Zellzyklus und dem molekularen Adapterprotein (Errico et al. 2004).

Eine weitere beschriebene Sequenz des Proteins Spastin ist NLS (nuclear localisation sequence), welche in den Kernimport involviert ist (Beetz et al. 2004). Zusätzlich werden zwei leucinreiche Exportsequenzen NES (Nuclear export signal) beschrieben. Spastin liegt in zwei Isoformen vor. Das N-terminal trunkierte Spastin ist die kleinere Isoform und befindet sich im Nucleus und Zytoplasma. Das weniger angereicherte komplette Protein wird aktiv aus dem Kern transportiert, da es zwei Exportsequenzen enthält (Claudiani et al. 2005). Das komplette Protein wird als Bindungspartner mit Atlantin (SPG3A) beschrieben. Es wird eine Bindung an dem endoplasmatischen Retikulum diskutiert (Sanderson et al. 2006).

3.3.2 Die Lokalisation von Spastin in der Zelle

Die genaue Funktion und Lokalisation von endogenem Spastin ist ungeklärt. Es gibt eine hohe Variabilität der Aussagen. Die Lokalisation wurde perinukleär und nukleär beobachtet (Beetz et al. 2004). Bei Wildtyp-Spastin wurde ein punktförmiges perinukleäres Muster beschrieben, wobei eine initiale Anreicherung an dem Mikrotubuli-Organisationszentrum erfolgt und es dann zur Ausbildung von zytoplasmatischen Aggregaten kommt. Bei der Mutante K388R wurden dicke, lange perinukleäre Bündel beobachtet (Errico et al. 2002). Die Punktmutation in der AAA-Kassette der K388R-Mutante führt zu einem Funktionsverlust der ATP-Hydrolyse, so dass das Spastin mit den Mikrotubuli verbunden bleibt (Evans et al. 2005). Svenson et al. beschrieben die Lokalisation von Spastin an Zentrosomen (Svenson et al. 2005). Charvin et al. beobachteten eine rein nukleäre Lokalisation des Proteins in neuronalen Zellen.

Endogenes Spastin wird ubiquitär im menschlichen Gewebe exprimiert, wobei eine besonders starke Anreicherung im Gehirn nachgewiesen werden kann (Charvin et al. 2003). Wharton et al. untersuchten drei HSP-Patienten und fanden in dem postmortalen Hirngewebe eine Lokalisation von Spastin in corticalen, hippocampalen Pyramidenzellen des zerebralen Cortex sowie im Hippocampus, den Purkinje-Zellen und spinalen Motoneuronen (Wharton et al. 2003). Errico et al. beschrieben eine Anreicherung des Proteins an distalen Axonen und den Verzweigungspunkten von neuronalen Zellen. (Errico et al. 2004).

Trotta et al. beobachteten in Axonen und Synapsen angereichertes Spastin bei *Drosophila melanogaster*. Die neuromuskuläre Endplatte bildet bei einer gehemmten Translation des Proteins weniger Synapsen aus, so dass ein Defekt der Neurotransmission und des Synapsenwachstums entsteht (Trotta et al. 2004).

Eine Erklärungsmöglichkeit zu der Variabilität der Aussagen in Bezug auf die Funktion und Lokalisation wäre die Beobachtung von Spastin in den unterschiedlichen Zelltypen. Ein anderer Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse ist die Verwendung von verschiedenen Antiseren in den Studien (Svenson et al. 2005). Die in einem Antiserum befindlichen Antikörper sind gegen eine bestimmte Region des Protein Spastin gerichtet, welche in den Arbeiten individuell ausgewählt wurde (s. 3.4.2). Die Diskrepanz

der Ergebnisse könnte durch die verschiedenen Antikörper erklärt werden.

3.4 Antikörper

Antikörper sind eine heterogene Gruppe globulärer Glykoproteine (Immunglobuline), die als Antwort des Immunsystems nach Kontakt des Organismus mit Antigenen von B-Lymphozyten und Plasmazellen gebildet und in Körperflüssigkeiten sezerniert werden. Sie reagieren selektiv mit dem entsprechenden Antigen (Antigen-Antikörper-Reaktion). Es gibt mehrere Isotypen der Immunglobuline (IgM, IgG, IgA, IgE, IgD). Die Antikörper besitzen 2 (bivalent, z.B. IgG) bis 10 (multivalent, z.B. IgM) Antigenbindungsstellen. Die Funktion der Antikörper als Träger der humoralen Immunität wird vor allem durch die Neutralisation von Antigenen durch die spezifische Bindung von Antigen und Antikörper zu Immunkomplexen realisiert. Die Antikörper vermittelte Elimination erfolgt durch die Agglutination, die Opsonierung für Phagozyten und die Komplementaktivierung. Die Erkennung kranker körpereigener Zellen für die zytotoxische Wirkung Natürlicher Killerzellen wird ebenfalls über Antikörper vermittelt (ADCC antibody-dependent cytotoxicity) (Janeway et al. 2002).

Bei der spezifischen Immunantwort auf Antigene werden als Primärantwort auf Proteine Immunglobuline der Klasse M (IgM) gebildet. Durch deren pentamere Struktur besteht trotz relativ geringer Affinität zu den Antigenen eine hohe Avidität. Eine hohe Affinität haben die bivalenten Immunglobuline der Klasse G (IgG), welche als Hauptisotyp der sekundären Immunantwort von den ausdifferenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) nach dem Ig-Klassenwechsel sezerniert werden. IgG -Moleküle entsprechen dem Hauptteil der zirkulierenden Immunglobuline (70 – 75%) im Serum (Holländer 2006).

3.4.1 Polyklonale und monoklonale Antikörper

Antikörper werden in der Medizin zur Diagnostik und Therapie häufig eingesetzt. In der Forschung werden Antikörper durch ihre hohe Spezifität genutzt um Proteine zu detektieren. Die zur Verfügung stehenden Methoden sind z.B. der ELISA (enzyme-linked

Immunosorbentassay), der Western Blot oder die Immunfluoreszenz.

In der Diagnostik, Therapie und Forschung eingesetzte Antikörper zur Detektion von Proteinen können polyklonal oder monoklonal hergestellt werden.

Polyklonale Antikörper werden bei der Immunantwort eines Organismus auf ein Antigen gebildet. Die Herstellung polyklonaler Antikörper erfolgt durch die Gewinnung des Serums nach der Immunisierung eines Organismus mit dem entsprechenden Antigen. Ein Antigen besitzt mehrere Antikörperbindungsstellen (Epitope). Die Epitope eines Antigens lösen die Aktivierung verschiedener B-Lymphozyten aus. Jeder B-Lymphozyt hat einen klonalen Rezeptor und bildet Antikörper gegen ein Epitop. Durch die Aktivierung verschiedener B-Zellen liegen im Serum polyklonale Antikörper vor.

Für die Herstellung der monoklonalen Antikörper wird die Hybridom-Technik verwendet. Dabei wird eine B-Zelle isoliert und mit einer Myelomzelle fusioniert. Der sezernierte Antikörper stammt somit aus einem Zellklon und ist spezifisch gegen ein Epitop gerichtet (Cole 1984).

3.4.2 Antikörper in der Forschung über Spastin

Zur Erforschung der Funktion und Lokalisation von Spastin sind verschiedene Antikörper eingesetzt worden.

Charvin et al. generierten polyklonale Antikörper, welche in der Region der Aminosäuresequenz 129-143 und 204-218 gegen das humane Spastinpeptid gerichtet sind. Der Aminosäureabschnitt 129-143 befindet sich in der MIT-Domäne. Diese Antikörper wurden mit rekombinantem Spastinpeptid der Maus validiert. Mit diesem Antikörper erkannten Charvin et al. die Lokalisation von Spastin in Zellkernen an HeLa-Zellen, sowie die Lokalisation von Spastin in Neuronen des Rückenmarkes der Maus (Charvin et al. 2003). Beetz et al. erkannten mit dem Antikörper, der gegen den Aminosäureabschnitt 130-142 gerichtet ist, eine zytoplasmatische sowie nukleäre Lokalisation von Spastin (Beetz et al. 2004).

Wharton et al. entwickelten einen Antikörper gegen den Peptidabschnitt 561-573, der durch die Peptidpräinkubation spezifiziert wurde und ein diffuses Expressionsmuster in den neuronalen Zellen zeigt (Wharton et al. 2003). Dieser Peptidabschnitt enthält

einen aus dem Exon 15 hervorgehenden Anteil, welcher alternativ gespleißt werden kann (Svenson et al. 2001).

Svenson et al. entwickelten ein Antiserum, das gegen den Peptidabschnitt 308-321 gerichtet ist. Dieser Abschnitt befindet sich außerhalb der AAA-Domäne, MIT-Domäne und auch außerhalb der alternativ spleißenden Exons 4, 8 und 15. Mit diesem Antiserum konnte die Lokalisation von Spastin an den Zentrosomen beobachtet werden (Svenson et al. 2005).

Errico et al. setzten Antiseren ein, die gegen Fusionsproteine mit dem Aminosäureabschnitt 1-122 und 87-354 gerichtet sind. Dadurch sind mehrere Epitope des Proteins Spastin enthalten, die die Antikörper des Antiserums erkennen können. Errico et al. berichteten eine diffuse Kernlokalisierung von Spastin in HeLa- und Cos7- Zellen während der Interphase, sowie die Lokalisation von Spastin an Zentrosomen und am Spindelapparat während der Mitose. Außerdem wurde eine nukleäre und zytoplasmatische Lokalisation von Spastin beschrieben (Errico et al. 2004).

Protein Spastin

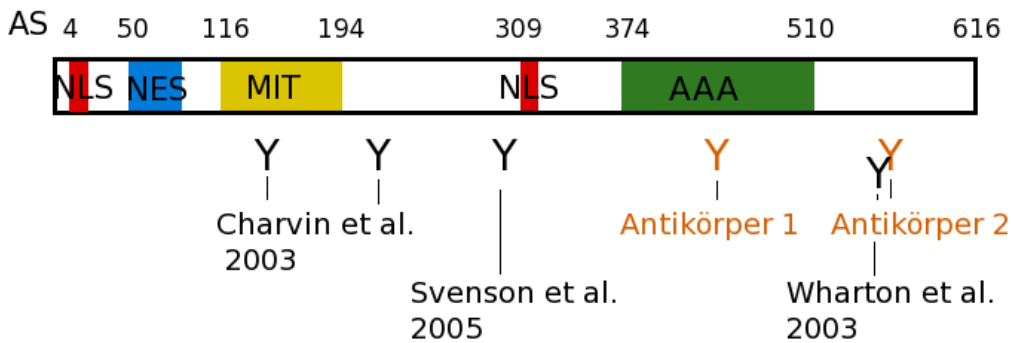


Abb. 3.1: schematische Darstellung der in der Forschung eingesetzten Antikörper (Y) gegen Peptidabschnitte des Proteins Spastin, Antikörper 1 und Antikörper 2 werden in dieser Arbeit charakterisiert. die funktionsspezifischen Domänen des Proteins Spastin sind NES (blau): nukleäre Export-Sequenz, NLS (rot): nukleäre Lokalisationssequenz, MIT (gelb): “microtubule interacting and trafficking”-Domäne, AAA (grün): “ATPase associated with diverse cellulare activities”-Domäne; die Zahlen kennzeichnen die Aminosäure (AS) des Beginns/Endes der Domänen

4 Ziele der Arbeit

Der Einsatz von Antikörpern spielt für die Erforschung molekularer Prozesse eine maßgebliche Rolle. Dabei ist die hohe Spezifität und Sensitivität des Antikörpers entscheidend für die Aussagekraft der Ergebnisse.

Bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern unterscheidet sich die effektive Antikörperfunktion je nach Antiserum, so dass es erforderlich ist, die Qualität der einzelnen Antiseren zu evaluieren (Schecklies 1996).

In der vorliegenden Arbeit sollen zwei neue polyklonale Antikörper gegen das humane Protein Spastin charakterisiert werden. Für die Erzeugung der Antikörper wurde jeweils eine Peptidsequenz in zwei Kaninchen injiziert, so dass vier Antiseren mit den neuen polyklonalen Antikörpern zur Analyse bereit standen (Invitrogen, Uk).

Das Ziel dieser Arbeit ist eine Aussage über die Eignung der Antiseren in der weiteren Forschung um das Protein Spastin zu treffen. Dabei soll getestet werden, ob die Antikörper geeignet sind, das Protein Spastin zu erkennen und unter welchen Bedingungen dies möglich ist. Die effektive Antikörperfunktion soll auf Proteinebene an humanen HeLa-, HEp2- und HEK-293-Zellen sowie an Geweben der Maus getestet werden. Als Methoden zur Bestimmung der spezifischen Detektion werden der Western Blot und die Immunzytochemie eingesetzt.

Da in der bisherigen Forschung verschiedene Aussagen zur Größe und Lokalisation des Proteins getroffen worden sind, sollen die Antiseren mittels unterschiedlicher Kontrollsysteme getestet werden (Vergleich Antiserum-Präimmunserum, Peptidpräinkubation). Dabei ist zu untersuchen, ob die Antikörper überexprimiertes sowie natives Spastin detektieren können.

5 Material und Methoden

5.1 Material

5.1.1 Chemikalien und Substanzen

Chemikalien und	Substanzen	Hersteller
Acrylamid	Acrylamide(electrophoresis grade)	ICN Biomedicals, Aurora USA
APS	Ammonium Sulfate	Sigma-Aldrich Co, St Louis USA
Aqua bidest	Aqua ad iniectabilia Braun	Braun Melsungen AG, Melsungen
BIS	N,N'-Methylene-bis-Acrylamide	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim Sigma-Aldrich Co, St Louis USA
Bradfordreagenz	Biorad Protein Assay	Biorad München
Bromphenolblau	Bromphenolblau	Serva Heidelberg BRD
BSA	Albumin from bovine serum 98%	Sigma-Aldrich Co, St Louis USA
Butanol	Butanol	Aldrich Chemical Co, USA
Detection	ECL plus Detection System	Amersham Bioscience, UK
EDTA	Ethylendiamine tetraacetic acid	Serva, Heidelberg
Ethanol	Ethanol	J.T. Baker, Deventer Holland
Glycerol	Glycerin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycin	Rotipuran®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
goat serum	normal goat serum	Dianova
Isopropanol	2-Propanol	Merck, Hohenbrunn
IgG Standard	bovine gamma globulin standard	Biorad München
KCl	Kaliumchlorid	Serva, Heidelberg

5 Material und Methoden

Chemikalien und	Substanzen	Hersteller
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat	Serva, Heidelberg
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat	Merck
Mercaptoethanol	Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg BRD
Methanol	Methanol	J.T. Baker, Deventer Holland
Milchpulver	Milchpulver (blotting grade)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
NaCl	Sodium chloride	Fluka, Buchs Schweiz Sigma-Aldrich, Steinheim
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat	Serva, Heidelberg
NaOH	Natriumhydroxid	Merck
Nonidet	Nonidet® P40 Substitute	Fluka, Buchs Schweiz Sigma-Aldrich, Steinheim
Paraformaldehyd	Paraformaldehyd	Fluka, Buchs Schweiz Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	PBS	PAA, Austria
	Plasmid Mini Kit High Quality	Quiagen® GmbH, Hilden
SDS	Dodecylsulfate-Na-Salt	Serva, Heidelberg
Standardmarker	Full Range Rainbow TM	Amersham Bioscience, UK
stripping buffer	Rotifree stripping buffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Tetramethylethylenediamine	Sigma-Aldrich Co, St Louis USA
ToPro3	ToPro3	Molecular Probes, Eugene USA
Tris	Tris Ultra pur	ICN Biomedicals, Aurora USA
Triton X 100	Triton X 100	Serva, Heidelberg Sigma-Aldrich, Steinheim
Tween	Tween® pure	Serva , Heidelberg

5.1.2 Geräte und Material

Geräte und Material		Hersteller
Alu- Folie		PapStar, Kall
Blotkammer	Large Semiphor Transphor- Unit	Amersham Bioscience,UK
Brutschrank	Hera cell	Heraeus, Hanau
Deckgläser	24 x 66mm	Menzel-Glaser, Braunschweig
Deckgläschen	Durchmesser 15mm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Digitalkamera	LAS 3000	Fujifilm Düsseldorf
Elektrophoresekammer		Amersham, San Francisco USA
Eppi	Microtubes	Sarstedt, Nürnberg
Falkon	Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Film	Hyperfilm TM ECL	Amersham Bioscience,UK
Filmkassette		Dr Goos suprema, Heidelberg
Filter	Minisarts 0,45µm	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan2, imaging	Zeiss, Jena
Folie	Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nürnberg
Gel-caster	Hofer Mighty Small	Amersham, San Francisco USA
Glas und Porzellanplatten		Amersham, San Francisco USA
konfokales Lasermikroskop	LSM510Meta ^{MK4}	Zeiss Jena
Küvetten	Cuvettes 100	Sarstedt
Membran	Transfer Hybond TM -P Protran® Nitrocellulose	Amersham Lifescience, UK Whatman Schleicher und Schuell
Nassblotkammer		Bio Rad, Ismaning
Objektträger		Menzel-Glaser, Braunschweig
Objektträger	Super Frost	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Parafilm	American National Can	Chicago USA
Pasteurpipetten	Plastibrand®	Brand GmbH+ Co., Wertheim
Photometer	Gene Quant Ultrospec 3300 pro Architect®ci8200 TM	Pharma Biotech, Cambridge UK Amersham Bioscience UK Abott BRD

Geräte und Material		Hersteller
Pipetten	Finnpipette	Laborsystems,
Pipettenspitzen	Plastibrand®	Brand GmbH+ Co., Wertheim
Reinraumbank	Holten Lamin Air	Allerod Dänemark
Rubber	Cell Scraper Falcon®	Becton, Dickinson UK
Säule	Hi Trap TM Protein A HP	Life Science
Schüttler	Heidolph Duomax 1030	Milano Italien
Spacerwachs	Gelseal	Amersham, San Francisco USA
Spritzen		Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Nunclon TM Surface	Roskilde Denmark
6-well-Zellkulturplatten	multiwell tissue culture plates	Becton , New Jersey
Zellkulturschalen	Falcon®	Becton Dickinson UK

5.1.3 Medien und Substanzen für die zellbiologischen Methoden

Medium		Hersteller
Antibiotika	Streptomycin/Penicillin	PAA, Austria
	Kanamycin	Serva Heidelberg
Aprotinin		Sigma-Aldrich Co
DMEM	DMEM high glucose with L-Glutamin	PAA, Pasching Austria
FCS	fetales Kälberserum	PAA, Pasching Austria
Gelatine	gelatin	Sigma-Aldrich Co
Hefe	Yeast extract Servabacter®	Serva, Heidelberg
Lipofectamine	Lipofectamine TM 2000	Invitrogen, Carlsbad CA
OMEM	OptiMEM	GIBCO Invitrogen, Paisley UK
Pefabloc		Merck
Trypsin	Trypsin- EDTA	PAA, Pasching Austria
Trypton	Pepton from casein	Fluka, Buchs Schweiz

5.1.4 Puffer und Gele

Tabelle 5.1: Lysepuffer

Lysepuffer 1		Lysepuffer 2	
1,5M Tris pH 8,8	2ml	1M Tris pH 7,4	0,25ml
0,5M EDTA pH 8,0	1ml	1mol NaCl	1,5ml
1M NaF	3ml	0,5% Nonidet	50 μ l
Aqua bidest	69ml	Aqua bidest	8,2 ml
Aprotinin	2 μ g/ml	Aprotinin	2 μ g/ml
Glycerol	10ml	Pefabloc	
20% SDS	15ml		

Tabelle 5.2: Puffer nach Lämmli

	2xLämmli		6xLämmli	
0,5M Tris pH 6,8	0,15M	2,5ml	0,35M	7ml
SDS 0,35M	0,14M	4 ml	0,35M	1g
Glycerol	20%v/v	2 ml	30%v/v	3ml
2-Mercaptoethanol	2% v/v	0,2ml	DTT 0,6M	0,93g
Bromphenolblau	0,03mM	0,2mg	0,175mM	1,2mg
Aqua bidest auf	10ml auffüllen			

Tabelle 5.3: TBS und TBS-T

Stammlösung	10xTBS	TBS-T	
Tris-base	24,2g	10xTBS	100ml
NaCl	80,0g	Aqua bidest	900ml
Aqua bidest auf	1000ml auffüllen	0,1% Tween	1ml

Tabelle 5.4: 10xLaufpuffer und Transferpuffer

Stammlösung: 10xLaufpuffer

250mM Tris-	30,24g
1,9M Glycin	142,50g
1,0% SDS	10g
in 1000ml Aqua bidest	

Transferpuffer

25mM Tris-Base	6,05g
192mM Glycin	28,80g
20% Methanol	400ml
Aqua bidest	auf 2000ml

Tabelle 5.5: Zusammensetzung der Gele

SDS- Page Trenngel 10%

Aqua bidest	6,25ml
4xTris 1,5M pH 8,8	3,75ml
Acrylamid 30%	5ml
APS 10%	100 μ l
TEMED	10 μ l

SDS-Page Sammelgel

Aqua bidest	3,05ml
4xTris 0,5M pH 6,8	1,25ml
Acrylamid 30%	650 μ l
APS 10%	100 μ l
TEMED	10 μ l

5.1.5 Zellen, Clone und Organe

Die Zellen und Clone wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Beetz und die Organe von T. Pamminer, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Jena.

Zellen	Clone	Organe
HEK-293-Zellen	GFP-tag K388R Mutante	Maus Herz
HeLa-Zellen	GFP-tag Wildtyp-Spastin Mutante	Maus Leber
HEp2-Zellen	Flag-tag Wildtyp-Spastin Mutante	
	Flag-tag S44L Mutante	

5.1.6 Spastinpeptid und Antikörper

Spastinpeptid

Spastinpeptid 1	SPA446 (Sequenz: LLCERREGEHDASRR), Invitrogen Ltd, UK
Spastinpeptid 2	SPA561 (Sequenz: IRELKPEQVKNMSAS), Invitrogen Ltd, UK

Primärantikörper

Spastinantikörper:

Antikörper 1	SPA446 polyclonal rabbit Ab (A0507801K), Invitrogen Ltd, UK
Antikörper 2	SPA561 polyclonal rabbit Ab (A0507802K), Invitrogen Ltd, UK

Myc Antikörper:	mouse anti myc monoclonal Ab, Chemicon® international
Actin Antikörper:	rabbit anti β -Actin Ab ab8227, Abcam, Cambridge UK
GFP Antikörper:	anti GFP antibody mab3580, Chemicon international
Flag Antikörper:	anti Flag in mouse F3165-2MG, Sigma
β -Tubulin Antikörper:	Anti β -Tubulin-III rabbit 046K4820, Sigma
β -Actin Antikörper:	rabbit polyclonal to β -actin ab 8227-50, Abcam

Sekundärantikörper

- Peroxidase-gekoppelter Kaninchen-anti-Maus-Antikörper (Dako, Dänemark)
- Peroxidase-gekoppelter Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper (Dako, Dänemark)
- FITC(Fluorescein-Isothiocyanat)-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG, Dianova Hamburg
- FITC(Fluorescein-Isothiocyanat)-gekoppelter goat anti-rabbit IgG, Dianova Hamburg
- Cy3 (Indocarbocyanin)-gekoppelter Ziege anti-Maus IgG, Dianova Hamburg
- Cy3 (Indocarbocyanin)-gekoppelter Ziege anti-Kaninchen IgG, Dianova Hamburg

Die in dieser Arbeit zu charakterisierenden neuen polyklonalen Antikörper sind gegen die Peptidsequenz 446-459 (Antikörper 1) und 561-575 (Antikörper 2) des Proteins Spastin gerichtet. Die Antiseren lieferte die Firma Invitrogen (Paisley UK) (s. Tab. 5.1.6). Dort wurden die Peptidsequenzen synthetisiert, mit KLH (keyhole limpet hemacyanin) als Hapten carrier gekoppelt und in jeweils zwei Kaninchen (New Zealand white rabbits) injiziert. Die Blutentnahme erfolgte vor der Injektion (Präimmunserum) und danach in definierten Zeitabständen. So wurde nach 4, 8, 10, 16, 20, 23 Wochen bei allen Kaninchen die Blutentnahme durchgeführt sowie nach erneuter Injektion des Peptides für den ersten Antikörper nach der 42. Woche. Der Gesamt- IgG- Titer wurde mittels ELISA gemessen. Nach der Zentrifugation erfolgte die Lagerung des Serums bei -80°C (Invitrogen). Die Nomenklatur der Antikörper bezieht sich auf den Antikörper und das jeweilige Kaninchen (s. Tabelle 5.6)

Tabelle 5.6: Nomenklatur der Antikörper

Antikörper 1	Antikörper gegen Spastinpeptidsequenz 446-459	A801K
Antikörper 1 Tier 1	Tier C7771	Ak1T1
PreC7771	Präimmunserum des Tieres C7771	
Antikörper 1 Tier 2	Tier C7772	Ak1T2
Pre C7772	Präimmunserum des Tieres C7772	
Antikörper 2	Antikörper gegen Spastinpeptidsequenz 561-575	A802K
Antikörper 2 Tier 1	Tier C7956	Ak2T1
Pre C7956	Präimmunserum des Tieres C7956	
Antikörper 2 Tier 2	Tier C7957	Ak2T2
Pre C7957	Präimmunserum des Tieres C7957	

5.2 Zellbiologische Methoden

5.2.1 Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden schnell aufgetaut und in einem Kulturmedium, 89% DMEM (PAA, Austria), 10% FCS (PAA, Austria) und 1% Penicillin/ Streptomycin (PAA, Austria) bei 37°C, CO_2 Gehalt 5% in 250ml Zellkulturflaschen (NunclonTM Surface, Roskilde Denmark), die vorher mit 91% Gelatine (Sigma-Aldrich Co) beschichtet wurden, kultiviert.

5.2.2 Splitten von Zellen

Bevor die Zellen in einer durchgehenden Schicht den Boden der Zellkulturflasche bedeckten (subkonfluentes Stadium), wurden sie verdünnt und in ein neues Kulturgefäß überführt (“splitten”).

Dazu wurden die Zellen entweder mechanisch mit einem Cell Scraper (Falcon®), Becton Dickinson UK) oder enzymatisch mit Trypsin (PAA, Pasching Austria) abgelöst. Für das “Abtrypsinieren” wurde 5ml Trypsin auf die Zellen gegeben und die Flasche 3min bis 4min bei 37°C erwärmt. Nachdem sich die Zellen mikroskopisch sichtbar abgelöst hatten, wurde die enzymatische Ablösung mit 10ml Kulturmedium gestoppt und die Zellen in Suspension gebracht. Die in ein 15ml Falcon (Cellstar®, Greiner Bio one, BRD) überführte Zellsuspension wurde bei 1400 Umdrehungen pro min für 3 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die Zellen mit 5ml Kulturmedium resuspendiert. Für die folgende definierte Zellaussaat folgte die Bestimmung der Zellkonzentration mit der Fuchs- Rosenthal- Kammer. Die Zellsuspension wurde in eine neue mit 91% Gelatine beschichtete und 10ml Kulturmedium vorgelegte Zellkulturflasche überführt und bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Zur Aufbewahrung der Zellen wurde die Zellsuspension in 1ml Eppis überführt, mit 1µg/µl Aprotinin versetzt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schnell eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

5.2.3 Anzuchten der Zellen

Für die Transfektion der Immunfluoreszenz- Versuche wurden die Zellen auf Deckgläschen ($\varnothing 15\text{mm}$) (Roth, Karlsruhe) in 6-well-Zellkulturplatten (Becton, New Jersey) angezogen. Die Deckgläschen wurden vorbereitet, indem diese zur Sterilisierung mit 20% SDS gewaschen, mit Aqua bidest gespült, für 1 Stunde in 70% Ethanol, dann 1 Stunde in 100% Ethanol geschüttelt und bei 120°C getrocknet wurden. Nach der Überführung in die 6-well-Zellkulturplatten wurden die Deckgläschen mit 91% Gelatine beschichtet. Es wurden 2 ml einer entsprechend mit Kulturmedium verdünnten Zellsuspension pro Well pipettiert. Die Zellen wuchsen bei 37°C im Brutschrank zur gewünschten Zelldichte. Das Zellwachstum wurde mit dem Mikroskop kontrolliert.

Für die Proteingelelektrophorese wurden die Zellen in Zellkulturschalen (Falcon®, Becton Dickinson UK) mit einem Durchmesser von 9 cm angezogen. Zur späteren Kontrolle der Transfektionsrate wurde wie oben beschrieben vorbereitetes Deckglas in die Zellkulturschale überführt. Die berechnete Zellkonzentration wurde mit dem Kulturmedium in die Zellkulturschale gegeben und bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis eine optisch ermittelte Zelldichte von 50 – 70% erreicht war.

5.2.4 Transfektion von eukaryontischen Zellen

Die kryokonservierten Clone in Glycerinstocks ($500\mu\text{l}$ Glycerin, transformierte E.coli) wurden in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefe 0,5% NaCl) mit Kanamycin (Verdünnung 1:200) über 12 Stunden bei 37°C im Brutschrank vermehrt. Zur Plasmidgewinnung wurde nach Protokoll des Plasmid Mini Kit High Quality (Quiagen®, Hilden) die DNA isoliert und aufgereinigt. Die DNA wurde in TE- Puffer (1mM EDTA, 10mM Tris, pH 8,0) gelöst, woraufhin die Messung der Konzentration mit dem Spektralphotometer (Pharma Biotech, Cambridge UK) erfolgte.

Für die Transfektion von eukaryontischen Zellen wurden $0,3\text{-}10\mu\text{g}$ DNA in Mangelmedium OMEM (GIBCO, Paisley Scotland) pipettiert. Dazugegeben wurden Lipofektamine (Invitrogen, Carlsbad CA) in OMEM. Das Gemisch inkubierte für 30 min bei Raumtemperatur.

Nach dem Absaugen des Kulturmediums von den Zellen, wurde OMEM und das Gemisch

auf die Zellen gegeben. Nach leichtem Schwenken wurden die Zellen für 6 Stunden in den Brutschrank gestellt und nach Transfektion das Medium gegen DMEM ausgetauscht.

5.2.5 Probenvorbereitung für Western Blot

Die in Zellkulturschalen oder Zellkulturflaschen angezogenen Zellen wurden je nach Zelltyp entweder abtrypsiniert oder mechanisch mit dem Cell Scraper abgelöst (s. Kap. 5.2.2). Die abtrypsinierten Zellen wurden 5min bei 1200 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, 3-mal mit auf Eis gekühltem PBS gewaschen und in Lysepuffer 1 oder 1mM KHCO_3 aufgenommen. Bei der mechanischen Ablösung wurden die Zellen 3-mal mit auf Eis gekühltem PBS gewaschen und dann mit dem Cellscraper abgelöst. Die Zellen wurden in 1ml Lysepuffer 2 suspendiert, 15 min zentrifugiert und der Überstand aufbewahrt. Zu den Zellysaten und Proteingemischen wurden $2\mu\text{g/ml}$ Aprotinin und Pefabloc gegeben. Die Lagerung der Proteingemische erfolgte bei -20°C .

Die bei -80°C gelagerten Organe der Maus wurden bei -80°C grobmechanisch homogenisiert und 1:5 in Lysepuffer 1 aufgenommen. Die feinmechanische Homogenisierung der Organlysate erfolgte mittels 5-10min passagieren der Suspension durch eine Kanüle. Die Lagerung der Organlysate erfolgte bei -20°C .

Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford oder mit der Biuret Methode bestimmt (s. Kap. 5.2.6).

Das Spastinpeptid wurde $1\mu\text{g/ml}$ in Aqua dest gelöst und bei -20°C aufbewahrt.

5.2.6 Verfahren zur Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Diese Methode ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration und basiert auf der Farbveränderung der sauren Comassie Brilliant Blau Lösung in Abhängigkeit zur Proteinkonzentration (Bradford 1976). Die Farbveränderung erfolgt durch die Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465nm zu 595nm bei Bindung des Farbstoffes an die Seitenkette der Proteine. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz wird mit IgG aus

Rinderserum eine Standardreihe erstellt. Dazu wurde das IgG (bovin gamma globulin standard, Biorad) auf 0,1mg/ml mit Aqua bidest verdünnt. Mit 0,1M NaOH wurde nach folgendem Schema die Standardreihe pipettiert:

Tabelle 5.7: Pipettierschema für den Proteinstandard

Konzentration ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	IgG Standard (0,1mg/ml) [μl]	NaOH (0,1M) [μl]
0	0	200
10	20	180
25	50	150
50	100	100
75	150	50
90	180	20
100	200	0

Zu 200 μl Standard bzw. Probe wurde 600 μl NaOH und 200 μl Bradford-Reagenz (Protein Assay, Biorad) gegeben und gevortext. Nach 10 min Inkubation wurde die Absorption in Einmalküvetten (Cuvettes, Sarstedt BRD) mit einem Spektrometer (Ultrospec 3300pro, Amersham Bioscience) bei 595nm gemessen.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde mit Hilfe der Standardkurve nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bestimmt. Die Proben wurden mit NaOH so verdünnt, dass die gemessene Absorption im mittleren Bereich der Standardkurve liegt. Die Probe sowie auch der Standard wurde in einer Doppelbestimmung gemessen. Das NaOH gewährleistete die vollständige Lösung des Proteins.

Proteinbestimmung mit Biuret-Methode

Die Proteinbestimmung durch die Biuret-Methode basiert auf der Farbänderung durch die Komplexbildung von Proteinen mit Kupferkationen im alkalisch wässrigen Milieu. Die Extinktion wird gegen einen Leerwert von 540nm bestimmt. Den Namen erhielt die Methode durch die Entdeckung dieser Komplexbildung von Kupferkationen mit Biuret (Carbamoylharnstoff).

Die Proben wurden auf eine Konzentration zwischen 500 und 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mit Aqua bidest

verdünnt und die Bestimmung der Konzentration des Gesamtproteins erfolgte mit dem Gerät ARCHITECT® (Abbott BRD).

5.3 Western Blot

5.3.1 SDS-Page Gelelektrophorese

Die gelelektrophoretische Auftrennung denaturierter Proteine erfolgte nach der von Lämmli beschriebenen Methode (Lämmli 1970). Es ist eine Form der diskontinuierlichen Elektrophorese aus Sammelgel und Trenngel, die genutzt wird, um Proteingemische aufzutrennen. Die Proben werden zunächst im Sammelgel konzentriert, bevor sie im Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dafür wird das Proteingemisch mit der anionischen Detergenz SDS versetzt, welche die Eigenladung der Proteine maskiert und ein nahezu identisches Ladungs- Masse- Verhältnis schafft. Durch den Siebeffekt des Trenngels werden die durch das Erhitzen denaturierten Proteine nach deren molaren Masse aufgetrennt. Der Standardmarker hat bekannte molare Massen, die auf die anderen Proteine übertragen werden können. Die mit SDS versetzten Proteine eluieren Richtung Anode, wobei das zugesetzte Bromphenolblau die vordere Front markiert.

Herstellung der Gele

Die gereinigten und getrockneten Glas- und Porzellanplatten wurden mittels beidseitig vorher gewachsenen Spacer zusammengefügt und senkrecht in dem Gel-Caster (Höfer, Ammersham USA) befestigt. Danach wurde das 10%ige Trenngel bis 1cm unterhalb des Randes eingefüllt und mit 1ml Isopropanol bedeckt. Nach 45 min wurde der Überstand verworfen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Zur Bildung der 20 μ l fassenden Probestaschen wurde ein Gelkamm eingesetzt. Nach der bei 4°C über Nacht erfolgten vollständigen Polymerisierung wurde der Kamm entfernt und das Gel in die Elektrophoresekammer eingebaut. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1:10 verdünntem 10x Laufpuffer befüllt.

Probenvorbereitung und SDS-Gelelektrophorese

Das bei -20°C aufbewahrte Proteingemisch wurde auf Eis langsam aufgetaut und zu gleichen Teilen mit 2x Lämmli und destilliertem Wasser oder mit 6x Lämmli (5:1) verdünnt. Anschließend wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C inkubiert, sowie nachfolgend für 10 sec auf Eis gelegt und 20 sec zentrifugiert. $5\mu\text{l}$ des Standardmarker (Full Range Rainbow TM, Amersham UK) und jeweils 10-15 μl der Zellysate bzw. 10-20 μg der Organlysate wurden in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 15min bei 20mA, dann bei 120V je Gel und einer Laufzeit von ca. 60-120 min.

5.3.2 Western Blot

Der Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem SDS- Polyacrylamid-Gel auf eine Blot- Membran erfolgte in einer Semi-Dry Blotkammer nach Kyhse- Andersen (Khyse-Anderson 1984) oder in einer Nassblotkammer (Bio Rad, Ismaning).

Für das Verfahren in der Semi-Dry Blotkammer (Large Semiphor Transphor Unit, Amersham UK) wurden sechs Blottingfilterpapiere (Schleicher und Schüll, Germany) und eine Hybond® Membran (Amersham,UK) oder eine Nitrocellulose Membran (Whatman Schleicher und Schüll, Germany) auf Blotgröße (ca. 6cm x 10cm) zugeschnitten. Die Blottingfilterpapiere, sowie die Nitrocellulose Membran wurden in Transferpuffer getränkt. Die Hybond® Membran wurde mit Methanol aktiviert, mit Aqua bidest gewaschen und mit Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer herausgenommen, das Sammelgel abgetrennt und auf die vorbereitete Membran gelegt. Die mit Aqua bidest befeuchtete Blotkammer wurde mit drei Lagen Filterpapier auf der Anodenseite bestückt. Darauf wurden die Hybond® Membran oder Nitrocellulose Membran und das Gel, sowie erneut drei äquilibrierte Filterpapiere blasenfrei aufgelegt. Die Blotkammer wurde mit der Kathodenplattenseite geschlossen und mit Gewichten beschwert. Das Blotten erfolgte 75 min mit 0,8mA/ cm^2 und max. 10-12V.

Für die Nassblotkammer wurden zwei Blottingfilterpapiere und ebenfalls eine Hybond® Membran oder Nitrocellulose Membran auf die Größe von 6cm x 10cm zugeschnitten. In die Aufnahmevorrichtung wurde das mit Transferpuffer getränkte Blottingfilterpapier, sowie der Transferpuffer getränkte Schwamm gelegt und das Trenngel aufgebracht.

Dann wurde die in Methanol aktivierte, Aqua bidest gewaschene und Transferpuffer äquilibrierte Hybond® Membran blasenfrei aufgelegt. Ein weiteres Blottingfilterpapier und der getränkte Schwamm auf der Gegenseite folgten. Die Nassblotkammer wurde mit Transferpuffer aufgefüllt und in ein Eisbad gestellt. Das Blotten erfolgte bei konstanten 400mA für 1 Stunde.

5.3.3 Immundetektion

Die geblotete Membran wurde in TBS-T mit 5% (w/v) Magermilchpulver zur Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde die Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper (s. Antikörpertab. 5.1.6) in TBS-T Puffer mit 5% (w/v) BSA oder 5% (w/v) Magermilchpulver 1h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Bei der Präinkubation des Antikörpers wurde der Primärantikörper vor der Inkubation der Membran mit der dreifachen Konzentration des entsprechenden in TBS-T Puffer gelösten Spastinpeptid (1µg/ml) 1h bei Raumtemperatur geschwenkt.

Der Blot wurde nach der Inkubation mit dem Primärantikörper 4 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Der entsprechende Spezies-spezifische Sekundärantikörper (s. Antikörpertab. 5.1.6) wurde verdünnt in TBS-T und zur Markierung des gebundenen Primärantikörpers 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach die Membran 4 x 10 min mit TBS-T gewaschen.

ECL-Plus-Detektion

Die Detektion der markierten Proteinbanden erfolgte mit dem ECL-plus-Kit (Amersham Bioscience,UK). Der in der ECL-Detektionslösung befindliche Chemilumineszenzfarbstoff (Acridin) sendet in Verbindung mit der an den Sekundärantikörper gekoppelten aktiven Meerrettichperoxidase Licht mit einer Wellenlänge von 430nm aus. Die ECL-plus-Detektionsreagenzien wurden nach Vorschrift des Herstellers gemischt. Die Membran wurde nach kurzem Abtropfen des überschüssigen TBS-T für 1-5min mit der ECL-Detektionslösung inkubiert, auf eine haushaltsübliche Frischhaltefolie gelegt und luftblasenfrei mit dieser abgedeckt. In der Dunkelkammer wurde das ausgesendete Licht

mit einem Röntgenfilm (Amersham Bioscience, UK) oder mit einer Digitalkamera (LAS 3000, Fujifilm Düsseldorf Germany) dokumentiert. Die optimierte Belichtungszeit liegt zwischen 0,5min und 30min.

Strippen

Das Reinigen (“strippen”) von Antikörpern auf der Membran erfolgte mit dem stripping buffer Rotifree (Roth, Karlsruhe) für 30 min bei 56°C. Nach 1h Waschen mit TBS-T konnte die Membran mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert werden.

5.4 Immunzytochemie

Bei der Immunzytochemie werden intrazelluläre Proteine mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz angefärbt. Die indirekte Immunfluoreszenz beruht auf dem Prinzip, dass unmarkierte Primärantikörper an spezifische Antigene binden und mit Hilfe eines markierten Sekundärantikörpers für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sichtbar gemacht werden.

5.4.1 Vorbereitung zur indirekten Immunfluoreszenzfärbung

Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenz-Färbung wurden die auf den runden Deckgläschen (s. Kap. 5.2.3) angezogenen Zellen fixiert und permeabilisiert.

Das Medium wurde aus den 6-well-Zellkulturplatten abgesaugt, die Deckgläschen 3-mal mit PBS gewaschen und die Zellen mit einer 4%igen (v/v) Paraformaldehydlösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) für 15 min oder mit -20°C kaltem 100%igem Methanol für 10 min fixiert. Nach dem Absaugen der jeweiligen Lösung wurden die Zellen 3-mal mit PBS gewaschen und zur Permeabilisierung mit einer 0,25% (v/v) Triton X-100-Lösung (SERVA, Heidelberg) für 10 min inkubiert. Anschließend wurde erneut 3-mal mit WTBS (1% FCS, 0,25% Triton X 100 in PBS) gewaschen.

Um die unspezifische Bindung der primären Antikörper zu verhindern wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen für 30 min mit 20%igem (v/v) goat serum in WTBS bei Raumtemperatur geblockt und anschließend 3-mal mit WTBS gewaschen.

5.4.2 Indirekte Immunfluoreszenz, Färbung der Zellen

Für die Lokalisation endogener Proteine in den Zellen wurde zunächst mit dem unmarkierten primären Antikörper inkubiert, der in 20%igem (v/v) goat serum in WTBS angesetzt wurde. 30 μ l der Antikörperlösung wurden auf Parafilm (American National CanTM, Chicago) pipettiert. Die runden Deckgläschen mit den Zellen wurden aus den Wells genommen, das überschüssige WTBS durch kurzes Ansetzen an Zellstoff entfernt, mit den fixierten Zellen nach unten auf die Antikörperlösung gelegt und so für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach oben gedreht und zur Entfernung nicht gebundener Antikörper 3-mal mit WTBS gewaschen. Nach der Markierung mit dem primären Antikörper erfolgte die Färbung mit dem fluoreszenzgebundenen sekundären Antikörper.

Dieser speziesspezifische Antikörper ist konjugiert mit Fluorescein (FITC, Dianova) oder Indocarbocyanin (Cy3, Dianova) und wurde in einer 1:200 Verdünnung eingesetzt. Wiederum wurden 30 μ l sekundäre Antikörperlösung auf Parafilm pipettiert und die fixierten Zellen lichtgeschützt für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der nicht gebundene Antikörper wurde durch 3-maliges waschen mit WTBS entfernt.

5.4.3 Kernfärbung und Einbetten

Zur Anfärbung des Kerns wurde der DNA-Farbstoff ToPro3 (Molecular Probes, Eugene, USA) verwendet. 80 μ l der 1:500 in PBS verdünnten Lösung wurden auf die Deckgläschen pipettiert und 15 min lichtgeschützt inkubiert. Dann wurden die Zellen 3-mal kurz mit PBS gewaschen. Als Einbettmedium und Anti-Ausbleichmittel wurde ein Tropfen ProLong® Gold antifade reagent (InvitrogenTM, Scotland) auf die beschrifteten Objektträger (Super Frost® Plus, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) gegeben und die runden Deckgläschen mit der Zellseite nach unten blasenfrei aufgelegt.

Die Objektträger wurden für 12 Stunden waagrecht, abgedunkelt und bei 4°C zur Polymerisation des Einbettmediums gelagert. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bis zur Aufzeichnung unter dem Mikroskop bei -20°C. Die Zellen wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2, Zeiss) oder dem konfokalen Laserscanningmikroskop (LSM510Meta^{MK4}, Zeiss Germany) digitalisiert und zur weiteren Auswertung gespeichert. Die Bildbearbeitung erfolgte mit dem Program LSM Image Browser (Zeiss).

5.5 Aufreinigung der Antikörper

5.5.1 IgG-Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung der Antikörper über die IgG-Affinitätschromatographie basiert auf dem Prinzip, dass die im Serum enthaltenen Immunglobuline G (Antikörper) an die Säule (Hi TrapTM Protein A HP) gebunden und danach von dem Serum getrennt eluiert werden. Die 1ml Säule (Hi TrapTM Protein A HP) wurde mit 10ml 20mM Na₂HPO₄ Bindungspuffer gewaschen. Nach dem Auftragen von 1ml Serum erfolgte erneut das Waschen mit 5ml Bindungspuffer. Mit 4ml 0,1M Citratpuffer erfolgte das Eluieren der Immunglobuline, welche in Fraktionen von 0,5ml 1M Tris pH 9,0 aufgefangen wurden. Nach Bestimmung der Immunglobulinkonzentration in den einzelnen Fraktionen mit der Biuret-Methode wurden die aufgereinigten Antikörper bei -80°C aufbewahrt.

5.5.2 Aufreinigung über das Peptid

Zur spezifischen Aufreinigung des gewünschten Antikörpers kann die Peptidsequenz, welche zur Synthese des Antikörpers eingesetzt wurde, verwendet werden.

Die Membran (Nitrozellulose) wurde für 30 min bei Raumtemperatur mit dem Peptid ((1µg/µl) in TBS-T) inkubiert. Nach 30 min Blocken mit 1% BSA in TBS-T bei Raumtemperatur wurde die Membran 3-mal mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des Antikörpers erfolgte schüttelnd für 1 Stunde bei 4°C. Nach erneutem Waschen der Membran

5 Material und Methoden

mit TBS-T wurde der Antikörper mit 0,1 M Glycin pH 2,5 eluiert und die Neutralisation der Lösung mit 1M Tris pH 9,0 durchgeführt. Die Aufbewahrung des aufgereinigten Antikörpers erfolgte nach dem Einfrieren durch flüssigen Stickstoff bei -80°C .

6 Ergebnisse

In der bisherigen Forschung um das Protein Spastin wurden verschiedene Hypothesen bezüglich dessen Funktion und Lokalisation formuliert. Daher ist es erforderlich, spezifische Aussagen über die detektierenden Antikörper zu treffen. In dieser Arbeit werden zwei neue polyklonale Antikörper charakterisiert, die das humane Protein Spastin detektieren sollen.

6.1 Antikörpertitration, Aufreinigung, Zelllinien und Lysepuffer

6.1.1 Titration des Antiserums

Für die optimale Ergebnisdarstellung ist die Konzentration, mit der das Serum des Kaninchens eingesetzt wird, grundlegend. Die Immunglobulinkonzentration G (IgG) in den gewonnenen Seren ist different und wurde mit der Biuret- Methode bestimmt (s. Tab. 6.1). In Abbildung 6.1 wird als Beispiel eine Verdünnungsreihe des Antiserums von Antikörper 2 Tier 1 gezeigt (s. Abb. 6.1).

6 Ergebnisse

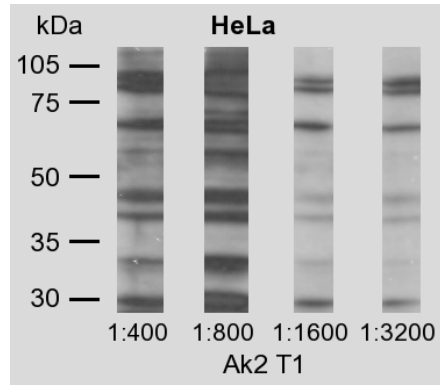


Abb. 6.1: auf nativen HeLa-Zellen aufgetragenes Antikörper 2 Tier 1 enthaltendes Antiserum unterschiedlich verdünnter Konzentrationen (1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200) (in TBS-T Puffer verdünnt), Molekulargewicht (kDa); *je verdünnter das Antiserum, desto blasser die Banden*

Die Antikörperkonzentration, welche die beste Sichtbarkeit der Banden erzielte, ist für jeden Antikörper in Tabelle 6.1 dargestellt.

Tabelle 6.1: Titration der Antikörper für die beste Darstellung der Banden

Antikörper	Antikörperkonzentration:	IgG Konz:
Ak 1 Tier 1	1:400- 1:800	1,25g/l
Ak 1 Tier 2	1:400- 1:1000	0,96g/l
Ak 2 Tier 1	1:800- 1:2000	1,28g/l
Ak 2 Tier 2	1:400- 1:800	1,3 g/l

Die in Tabelle 6.2 dargestellten Werte zeigen die bei Western Blot und Immunzytochemie verwendeten Konzentrationen der Antikörper (s. Tabelle 6.2).

Tabelle 6.2: verwendete Konzentrationen der Antikörper

Antikörper	Western Blot	Immunzytochemie
Ak 1 Tier 1	1:500	1:50
Ak 1 Tier 2	1:500	1:50
Ak 2 Tier 1	1:1000	1:50
Ak 2 Tier 2	1:500	1:50

6.1.2 Zelllinien und Lysepuffer

Das im Western Blot betrachtete Bandenmuster divergierte je nach Einsatz verschiedener Lysate nativer Zelllinien (HeLa-, HEp2-, HEK-293-Zellen) und der Lysepuffer, in denen die Zellen aufgenommen wurden (s. Abb. 6.2).

Als Beispiel erschienen bei dem Vergleich des Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) enthaltenden Serums (Antiserum) mit dem Präimmunserum bei HeLa-Zellen, die in Lysepuffer 2 aufgenommen wurden, Banden in der Höhe des Molekulargewichtes von 60kDa, 78kDa und 90kDa. Die HEp2-Zellen in Lysepuffer 2 wiesen Banden in der Höhe von 58kDa, 68kDa und 72kDa auf (s. Abb. 6.2 [A]).

Bei HeLa-Zellen in Lysepuffer 1 erschienen Banden im Vergleich zum Präimmunserum bei 52kDa, 58kDa, 60kDa, 70kDa, 72kDa, 85kDa, während HEK-293-Zellen eine andere Bande zum Präimmunserum in der Höhe von 77kDa aufwiesen (s. Abb. 6.2 [B]).

Die bessere Auftrennung der Banden wurde mittels Lysepuffer 1 erzielt, so dass die weiteren Experimente mit dem Lysepuffer 1 durchgeführt wurden.

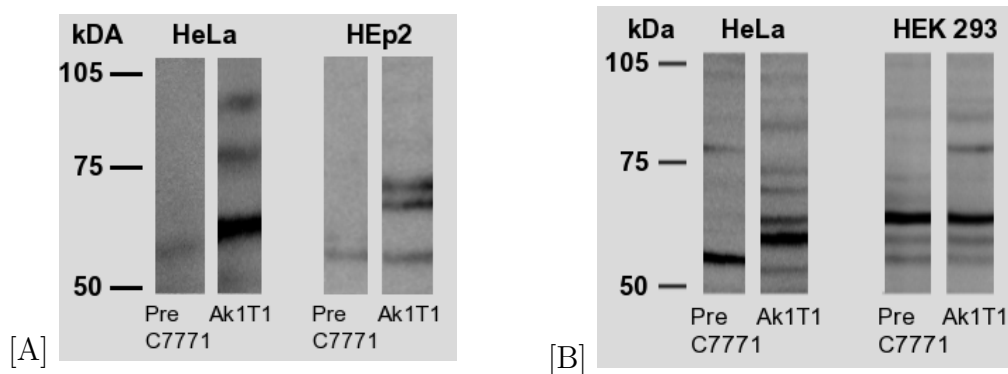


Abb. 6.2: Zellvergleich. Abb. [A] zeigt HeLa- und HEp2-Zellen in Lysepuffer 2, Abb. [B] zeigt Vergleich von HEK-293- und HeLa-Zellen in Lysepuffer 1; *Bandenvergleich Antiserum-Präimmunserum Lysepuffer 2* von HeLa-Zellen bei 60kDa, 78kDa, 90kDa, von HEp2-Zellen bei 58kDa, 68kDa, 72kDa, *Bandenvergleich Antiserum-Präimmunserum Lysepuffer 1* von HeLa-Zellen bei 52kDa, 58kDa, 60kDa, 70kDa, 72kDa, 85kDa, von HEK-293-Zellen bei 77kDa

6.1.3 Aufreinigung der Antikörper

Das Antiserum des Kaninchens enthält unspezifische Antikörper. Im Western Blot wurde dies sichtbar durch Banden, die bei dem Vergleich vom Präimmunsrum zum Antiserum in der gleichen Bandenhöhe erkennbar sind. Um ein spezifisches Bandenmuster für die Antikörper zu erhalten wurden diese aufgereinigt (s. Kap. 5.5).

So zeigte die Aufreinigung des Antikörpers 1 Tier 2 (A801K C7772) über das Spastinpeptid, dass unspezifische Banden, wie z.B. die 62kDa und 64kDa Bande, die ebenfalls im Präimmunsrum erscheinen, nicht mehr angefärbt werden (s. Abb. 6.3).

Die Aufreinigung des Antikörpers über das Spastinpeptid ermöglichte eine bessere Ergebnisdarstellung, während bei dem Vergleich des über die IgG-Chromatographie aufgereinigten Antiserum mit dem nicht aufgereinigten Antiserum kein Unterschied des Bandenmusters zu erkennen war.

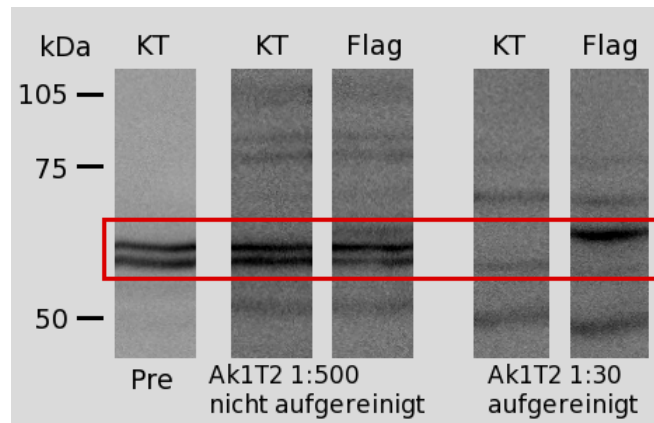


Abb. 6.3: Inkubation von nicht transfizierten (KT) und transfizierten (Flag-tag-Wildtyp) HEK-293-Zellen durch Präimmunsrum (Pre), nicht aufgereinigten und aufgereinigten Antikörper 1 Tier 2; Darstellung der durch Aufreinigung des Antikörper 1 Tier 2 nicht mehr angefärbten Banden (z.B. 62kDa, 64kDa), die im Präimmunsrum sowie nicht aufgereinigtem Antiserum erscheinen

6.2 Charakterisierung der Antikörper

6.2.1 Spastinpeptiderkennung

Die spezifische Bindung des Antikörpers an das Protein Spastin soll zunächst durch die Bindung des Antikörpers an die Spastinpeptidsequenz gezeigt werden, gegen die der Antikörper gerichtet ist.

Um eine spezifische Bindung des Antikörpers an das Peptid nachzuweisen, wird mit Hilfe des Western Blots die Färbung des auf die Membran gebundenen Spastinpeptids durch das Antiserum (das Spastinantikörper enthaltende Serum) mit dem Präimmunserum verglichen. Es erfolgt gleichzeitig der Vergleich zwischen dem Antiserum und dem mit Spastinpeptid präinkubierten Antiserum.

Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771)

Das auf die Membran gebundene Spastinpeptid 1 (SPA446) wurde durch Antikörper 1 Tier 1 erkannt. Das Präimmunserum zeigt keine Banden. Auch der mit dem Spastinpeptid 1 präinkubierte Antikörper erkannte das auf die Membran gebundene Spastinpeptid 1 nicht mehr (s. Abb. 6.4).

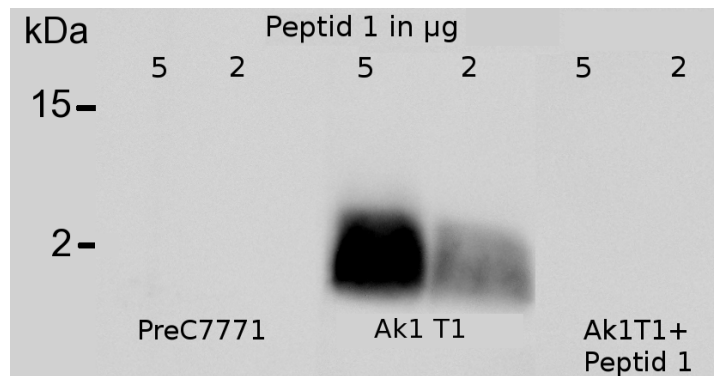


Abb. 6.4: Darstellung der Färbung des aufgetragenen Spastinpeptides 1 ($2\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$) durch Antikörper 1 Tier 1 im Vergleich zum Präimmunserum und mit Spastinpeptid 1 präinkubierten Antiserum; *Peptid wird vom Antikörper erkannt*

Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772)

Der Western Blot zeigt die Bindung des Antikörpers 1 Tier 2 an das Peptid 1 (SPA446), wobei das Präimmunserum und der präinkubierte Antikörper keine Banden anfärben (s. Abb. 6.5).

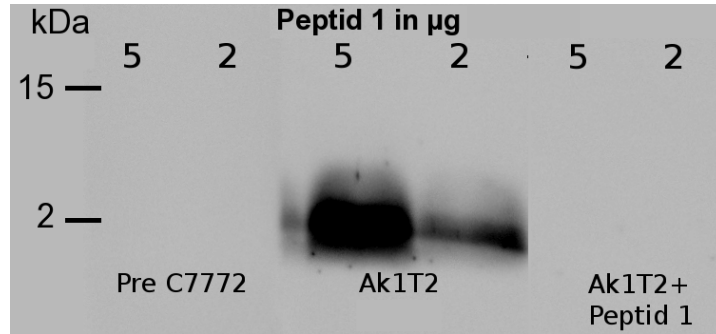


Abb. 6.5: Darstellung der Färbung des aufgetragenen Spastinpeptides 1 ($2\mu\text{g}$, $5\mu\text{g}$) durch Antikörper 1 Tier 2 im Vergleich zum Präimmunserum und mit Spastinpeptid 1 präinkubierten Antiserum; *Peptid wird vom Antikörper erkannt*

Antikörper 2 Tier 1 (A802K C7956)

Die Detektion des Spastinpeptides 2 (SPA561) durch den Antikörper 2 Tier 1 konnte auch nach mehrmaliger Wiederholung des Versuches nicht gezeigt werden (s. Abb. 6.6).

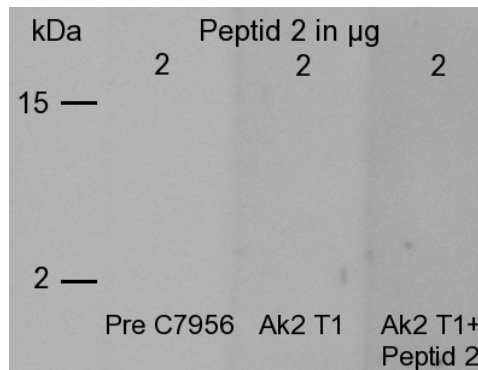


Abb. 6.6: Darstellung der Färbung des aufgetragenen Spastinpeptides 2 ($2\mu\text{g}$) durch Antikörper 2 Tier 1 im Vergleich zum Präimmunserum und mit Spastinpeptid 2 präinkubierten Antiserum; *Peptid wird nicht vom Antikörper erkannt*

Antikörper 2 Tier 2 (A802K C7957)

Im Western Blot zeigten sich keine Banden bei der Inkubation mit dem Antiserum, Präimmunserum und dem präinkubierten Antiserum (s. Abb. 6.7).

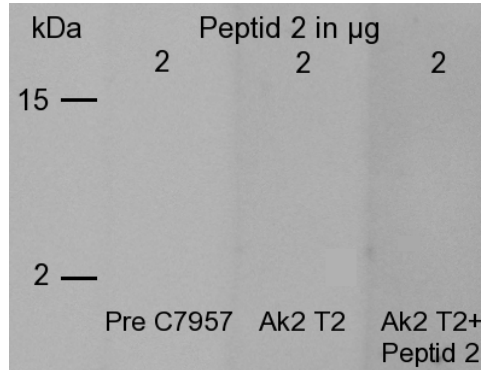


Abb. 6.7: Darstellung der Färbung des aufgetragenen Spastinpeptides 2 ($2\mu\text{g}$) durch Antikörper 2 Tier 2 im Vergleich zum Präimmunserum und mit Spastinpeptid 2 präinkubierten Antiserum; *Peptid wird nicht vom Antikörper erkannt*

6.2.2 Detektion des Proteins Spastin mittels Western Blot

Darstellung von überexprimierten Spastin mit Antikörper 1 (A801K)

Zum Nachweis, dass der Antikörper in den Zellen das Protein Spastin detektieren kann, wurden HEK-293-Zellen mit einem Flag-tag Wildtyp-Spastin Clone transfiziert, so dass das Spastin überexprimiert wurde. Diese transfizierten Zellen wurden mit nicht transfizierten Kontrollen verglichen. Im Western Blot zeigte sich mit dem **Antikörper 1 Tier 1** (A801K C7771) bei den transfizierten Zellen eine zusätzliche Bande mit einem Molekulargewicht von 68kDa. Diese Bande konnte auch mit dem Anti-Flag Antikörper spezifisch nachgewiesen werden (s. Abb. 6.8).

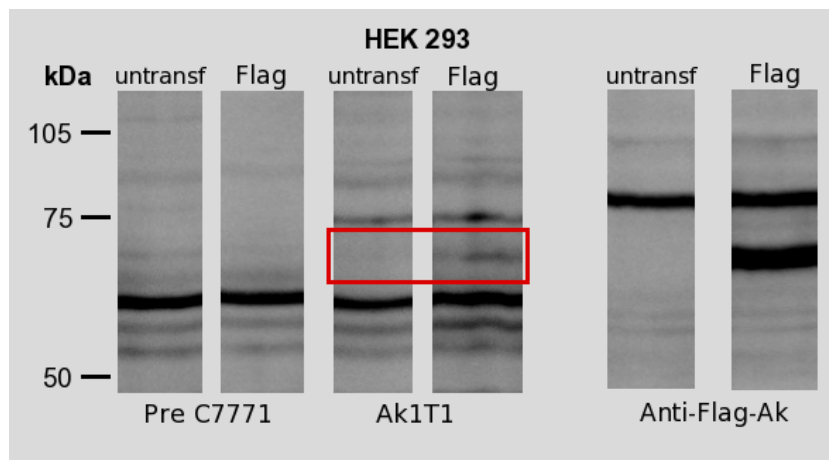


Abb. 6.8: Vergleich Flag-tag Wildtyp-Spastin transfizierten HEK-293-Zellen zu untransfizierten HEK-293-Zellen durch Inkubation mit Präimmunsereum, Antikörper 1 Tier 1 und Anti-Flag- Antikörper; *eindeutige 68kDa Bande bei den transfizierten HEK-293-Zellen durch Antikörper 1 Tier 1, die auch vom Anti-Flag-Antikörper (1:500) angefärbt wird*

Bei dem Vergleich mit dem polyklonalen Antiserum des **Antikörper 1 Tier 2** (A801K C7772) von nicht transfizierten HEK-293-Zellen mit Flag-tag Wildtyp-Spastin transfizierten HEK-293-Zellen, wurde bei den transfizierten Zellen durch den Antikörper eine neue Bande in der Höhe des Molekulargewichtes von 68kDa sichtbar. Diese Bandenhöhe wurde ebenfalls durch den Flag-Antikörper spezifisch angefärbt.

Nach der Aufreinigung des Antikörpers 1 Tier 2 trat diese 68kDa Bande deutlicher hervor (s. Kap. 6.1.3). Bei der nicht transfizierten Kontrolle der HEK-293-Zellen war diese

Bande nicht zu erkennen.

Banden, die sowohl bei nicht transfizierten als auch bei den Flag-tag Wildtyp-Spastin transfizierten HEK-293-Zellen nach der Aufreinigung des Antikörpers erkannt wurden, befinden sich in der Höhe des Molekulargewichtes von 51kDa und 77kDa (s. Abb. 6.9).

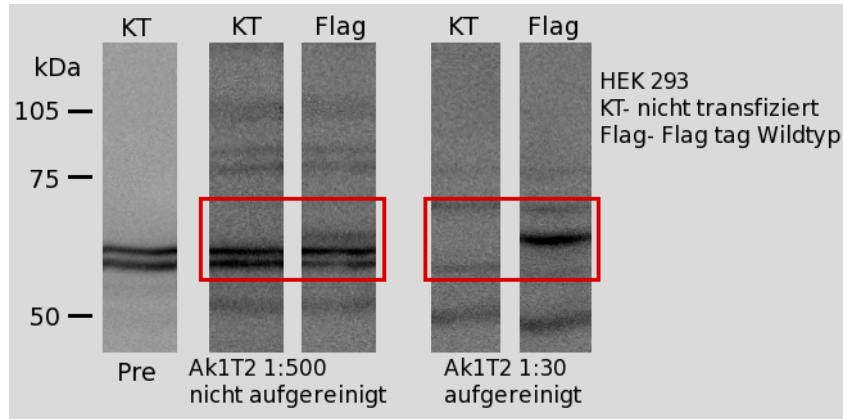


Abb. 6.9: Inkubation von nicht transfizierten und transfizierten HEK-293-Zellen durch Präimmunserum, nicht aufgereinigten und aufgereinigten Antikörper 1 Tier 2; *Darstellung der 68kDa Bande, die bei transfizierten Zellen nach Aufreinigen des Antikörpers am deutlichsten darstellbar ist*

Antikörper 1 (A801K) erkennt das transfizierte Spastin im Western Blot, das am deutlichsten erscheint, wenn der Antikörper aufgereinigt ist.

Darstellung von nativen Spastin mit Antikörper 1 (A801K)

Um das native Spastin nachzuweisen wurde zunächst das Antiserum mit dem Präimmunserum auf verschiedenen Lysaten untransfizierter Zellen (HeLa-, HEK-293-Zellen) verglichen (s. Abb. 6.10).

Der Vergleich des **Antikörper 1 Tier 1** (A801K C7771) enthaltenden Serum (Antiserum) mit dem Präimmunserum zeigte mehrere Banden, welche nur durch die Inkubation der Membran mit dem Antiserum erschienen. Bei HeLa-Zellen erschienen Banden im Vergleich zum Präimmunserum bei 52kDa, 58kDa, 60kDa, 70kDa, 72kDa, 85kDa, während HEK-293-Zellen eine andere Bande zum Präimmunserum in der Höhe von 77kDa aufwiesen (s. Abb. 6.10 [A]).

Das polyklonale Antiserum des **Antikörper 1 Tier 2** (A801K C7772) färbte ebenfalls je nach Zelllysat auf mehreren Höhen unterschiedliche Banden an. Banden, die bei dem Vergleich von Präimmunserum zu Antiserum auf untransfizierten HEK-293-Zellen nur im Antiserum erschienen, befanden sich in der Höhe des Molekulargewichtes von 51kDa, 77kDa und 85kDa (s. Abb. 6.10). Bei untransfizierten HeLa-Zellen konnten im Vergleich zum Präimmunserum mit dem Antiserum Banden bei 64kDa und 70kDa dargestellt werden (s. Abb. 6.10 [B]).

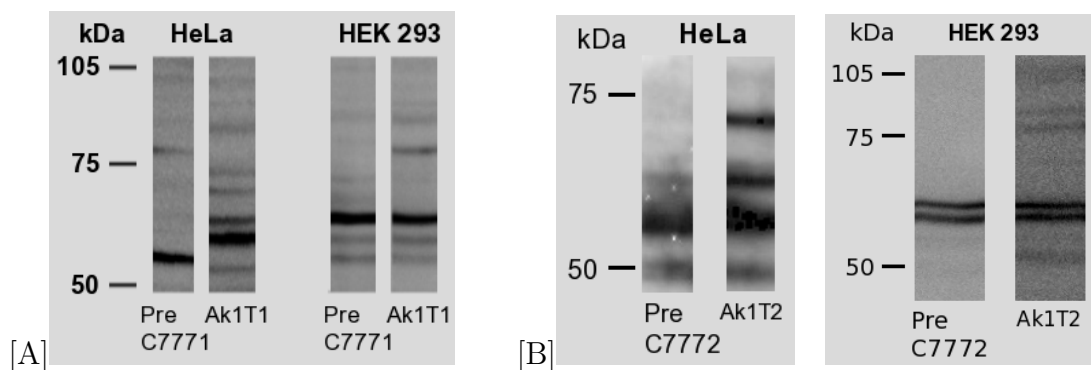


Abb. 6.10: Vergleich von HEK-293- und HeLa-Zellen mit Antiserum und Präimmunserum von Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) (Abb. [A]) und Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) (Abb. [B]); Abb [A] *Bandenvergleich Antiserum-Präimmunserum* (Ak1T1) von HeLa-Zellen (Banden nur im Antiserum) bei 52kDa, 58kDa, 60kDa, 70kDa, 72kDa, 85kDa, von HEK-293-Zellen bei 77kDa, Abb [B] *Bandenvergleich Antiserum-Präimmunserum* (Ak1T2) von HeLa-Zellen bei 64kDa, 70kDa, von HEK-293-Zellen bei 51kDa, 77kDa, 85kDa

Peptidpräinkubation von Antikörper 1 (A801K)

Das Serum enthält unterschiedliche Antikörper. Um herauszufinden, welche angefärbten Banden eindeutig das durch den Antikörper detektierte Protein Spastin darstellen, wurde das Antiserum mit dem Spastinpeptid präinkubiert. Dabei wird der Antikörper abgefangen, so dass die entsprechenden Banden im Western Blot nicht mehr erscheinen. Die Inkubation von Lysaten der nativen Zelllinien mittels Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) und Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) ergaben ein identisches Bild bezüglich des Vergleiches von Antiserum und präinkubiertem Antiserum (s. Abb. 6.11 [A]).

Um der Fragestellung der Speziesspezifität des Antikörpers nachzuforschen, wurde das Antiserum mit dem Präimmenserum und dem peptidpräinkubierten Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) auch bei aufgetragenen Lysaten von Organen der Maus (Maus Herz, Maus Leber) (s. Abb. 6.11) verglichen. Dies zeigte ebenfalls ein identisches Bild im Vergleich von Antiserum zu präinkubiertem Antiserum (s. Abb. 6.11 [B]). Es erschien keine eindeutige Bande, die die Zuordnung zu dem nativen Spastin ermöglicht.

Nach der Aufreinigung des Antikörper 1 (A801K) über das Spastinpeptid konnte bei nativen Zellen ebenfalls keine eindeutige Bande dem Spastin zugeordnet werden.

Die Darstellung von endogenem Spastin im Western Blot mittels Antikörper 1 (A801K) ist nicht möglich.

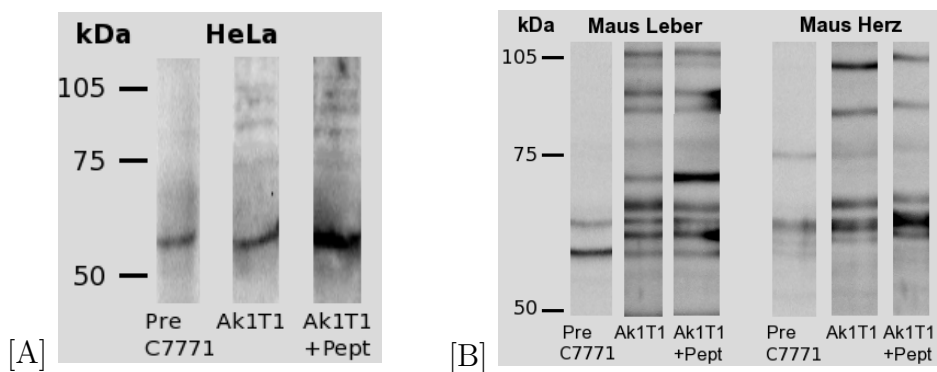


Abb. 6.11: Peptidpräinkubation von Ak1T1 auf HeLa-Zelllysate (Abb. [A]) und auf Organlysaten (Maus Herz, Maus Leber) (Abb. [B]); alle Bilder zeigen ein identisches Bandenmuster im Vergleich des Antiserums und präinkubierten Antiserum

Bandenhöhenvergleich Antiserum-Präimmunserum mit Antikörper 2 (A802K)

Die Detektion des Proteins Spastin durch das Antiserum **Antikörper 2 Tier 1** (A802K C7956) wurde im Western Blot untersucht.

Für Darstellung des überexprimierten Spastins konnte durch den Vergleich von nicht transfizierten HEK-293-Zellen zu mit Flag-tag transfizierten HEK-293-Zellen (überexprimiertes Spastin) keine Anfärbung der Bande gezeigt werden, die durch den Flag-Antikörper erkannt wurde.

Bei dem Bandenvergleich von Antiserum mit Präimmunserum nicht transfizierter HEK-293-Zellen zeigten sich bei der Inkubation mit dem Antiserum Banden in der Höhe des Molekulargewichtes von 68kDa, 75kDa, und 80kDa, welche durch Inkubation mit dem Präimmunserum nicht erschienen (s. Abb. 6.12).

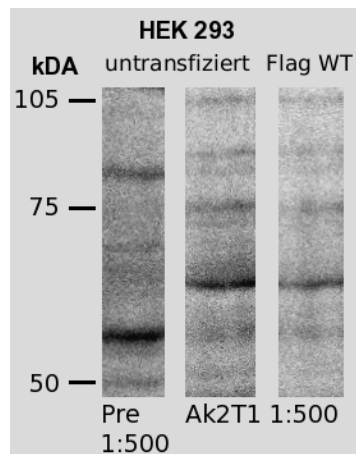


Abb. 6.12: Inkubation von nicht transfizierten und transfizierten HEK-293-Zellen mit Antikörper 2 Tier 1 und Präimmunserum, Bandenhöhen im Vergleich Präimmunserum-Antiserum bei 68kDa, 75kDa, 80kDa

Für den Nachweis der Detektion des Proteins Spastin durch den **Antikörper 2 Tier 2** (A802K C7957) mittels Western Blot wurde zunächst das überexprimierte Spastin in Flag-tag transfizierten HEK-293-Zellen mit dem Antikörper 2 Tier 2 inkubiert. Die durch den Flag-tag Antikörper spezifisch angefärbte Bande gegen das transfizierte Spastin konnte durch den Antikörper 2 Tier 2 nicht gezeigt werden.

Der Vergleich von nicht transfizierten HEK-293-Zellen zeigte bei der Inkubation durch

6 Ergebnisse

das Antiserum eine Bande mit dem Molekulargewicht von 75kDa, die im Präimmuneserum nicht erscheint (s. Abb. 6.13).

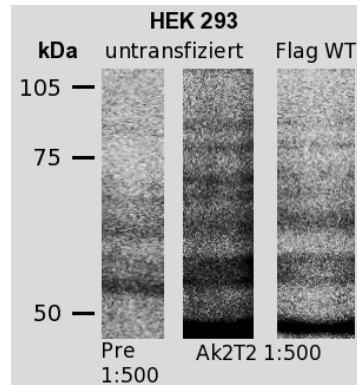


Abb. 6.13: Inkubation von Antikörper 2 Tier 2 und Präimmuneserum auf nicht transfizierten und transfizierten HEK-293-Zellen, Bandenhöhe im Vergleich Präimmuneserum-Antiserum bei 75kDa

Antikörper 2 (A802K) erkannte das Protein Spastin im Western Blot nicht.

6.2.3 Detektion des Proteins Spastin mittels Immunzytochemie

Die eingesetzte Methode der Immunzytochemie wurde zur Beurteilung der Bindung der Antikörper an das Spastin an intakten Zellen verwendet.

Dabei soll zuerst die Bindung der Antikörper an transfiziertes Spastin gezeigt und danach der Einsatz der Antikörper auf nativen Spastin getestet werden. Um das transfizierte Spastin darzustellen wurden HeLa- und HEK-293-Zellen verwendet, welche mit einem GFP-(green fluorescence particle)-tag Clone transfiziert wurden. So erschien das für die K388R-Mutante beschriebene bundle Muster (Errico et al. 2002) grün fluoreszierend im Laserscanning Mikroskop bei der GFP-tag K388R-Spastin transfizierten HeLa-Zelle (s. Abb. 6.14).

Um ein Beispiel für eine Korrelation der Fluoreszenz zu zeigen, die durch die Färbung eines Antikörpers in Beziehung zu der Eigenfärbung des GFP-tag an Spastin hervorgerufen wird, wurden transfizierte Wildtyp (WT) HeLa-Zellen sowie K388R-Spastin transfizierte HeLa-Zellen mit einem Spastin-GFP-tag Clone dargestellt, die mit einem GFP-Antikörper inkubiert wurden. Die grüne Fluoreszenz [A] stellt die Eigenfluoreszenz des GFP dar. Die rote Fluoreszenz [B] wurde durch den rot gelabelten GFP- Antikörper hervorgerufen. Die blaue ToPro-Färbung [C] ist die Kernfärbung. Das untere rechte Bild zeigt jeweils die übereinandergelegten Fluoreszenzen (merge) [D]. Die rote und grüne Fluoreszenz ist kolokalisiert (s. Abb. 6.14, Abb. 6.15).

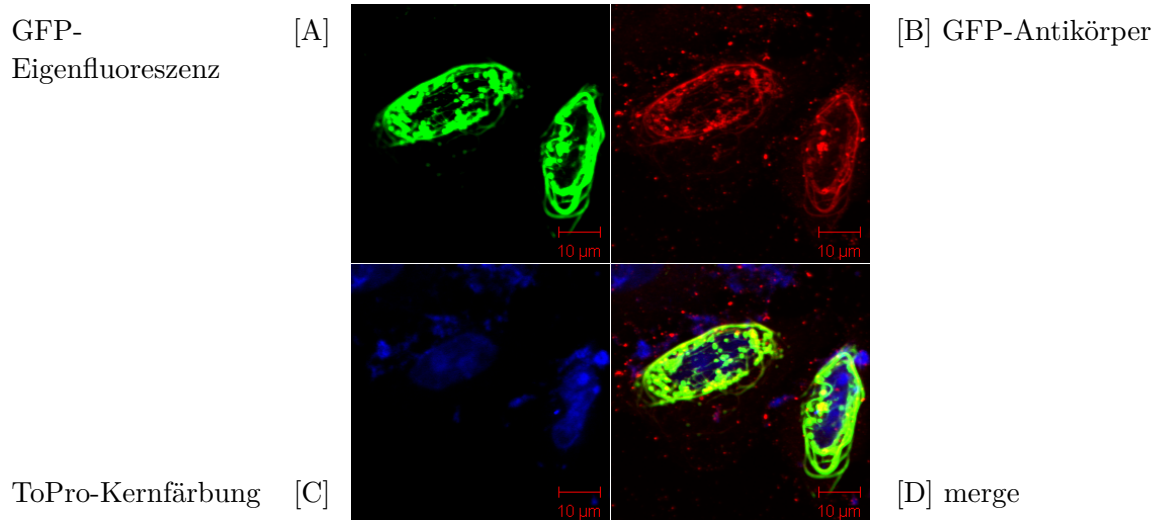


Abb. 6.14: [A]: GFP-tag K388R-Spastin transfizierte HeLa-Zellen (GFP-Eigenfluoreszenz), [B]: GFP-Antikörper (rote Fluoreszenz) auf GFP-tag K388R-Spastin transfizierten HeLa-Zellen, [C]: ToPro-Kernfärbung der GFP-tag K388R-Spastin transfizierten HeLa-Zellen (blaue Fluoreszenz), [D]: übereinandergelegte Fluoreszenzen (merge); *Darstellung des bundle Musters, sowie der spezifischen Färbung des transfizierten Spastins mit dem GFP-Antikörper bei Kolokalisation der GFP-Eigenfluoreszenz mit der GFP-Antikörperfluoreszenz*

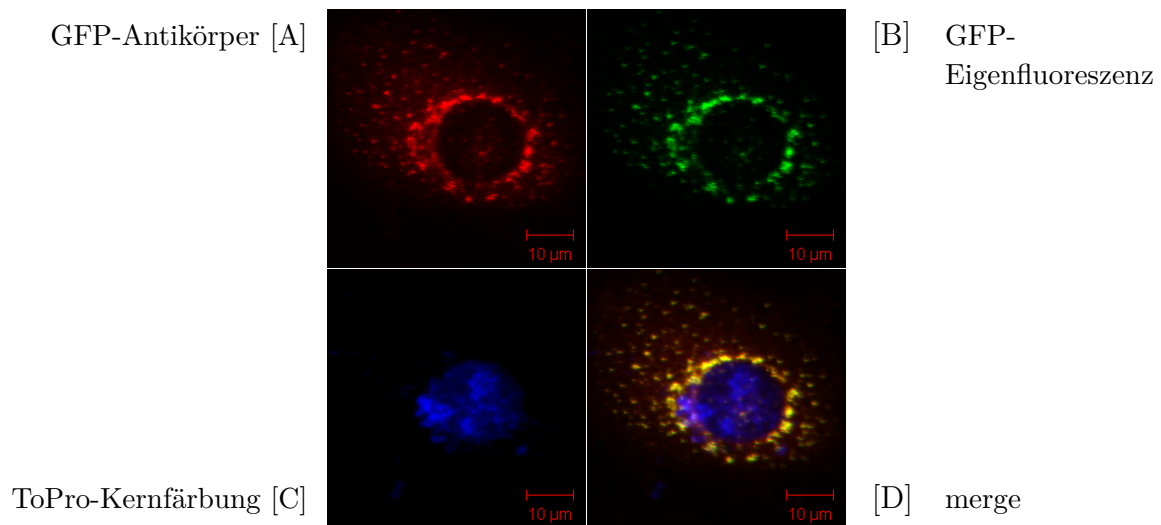


Abb. 6.15: [A]: GFP-Antikörper (rote Fluoreszenz) auf GFP-tag WT-Spastin HeLa-Zellen, [B]: Eigenfluoreszenz der GFP-tag-WT-Spastin HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz) (GFP-Eigenfluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: übereinandergelegte Fluoreszenzen (merge); *Darstellung des transfizierten Spastins mit dem GFP-Antikörper bei Kolokalisation der GFP-Eigenfluoreszenz mit der GFP-Antikörperfluoreszenz*

Der Hintergrund, der bei der indirekten Immunfluoreszenz durch den sekundären Antikörper hervorgerufen wird, soll in Abbildung 6.16 an GFP-tag Wildtyp-Spastin transfizierten HeLa-Zellen dargestellt werden. Da die zu testenden Antikörper mit dem sekundären Antikörper gegen Antikörper aus Kaninchenserum angefärbt wurden, wird hier das Beispiel des Einsatzes von Cy3-anti-rabbit-antibody (Dianova) dargestellt. Die rote Fluoreszenz [A] stellt die durch den alleinigen Einsatz des sekundären Antikörpers (ohne die vorherige Inkubation durch den primären Antikörper) hervorgerufene Hintergrundfärbung dar. Die grüne Fluoreszenz [B] zeigt die Lokalisation des mit GFP-tag transfizierten Spastins in der HeLa-Zelle. Die blaue Fluoreszenz [C] stellt die Kernfärbung dar (s. Abb. 6.16).

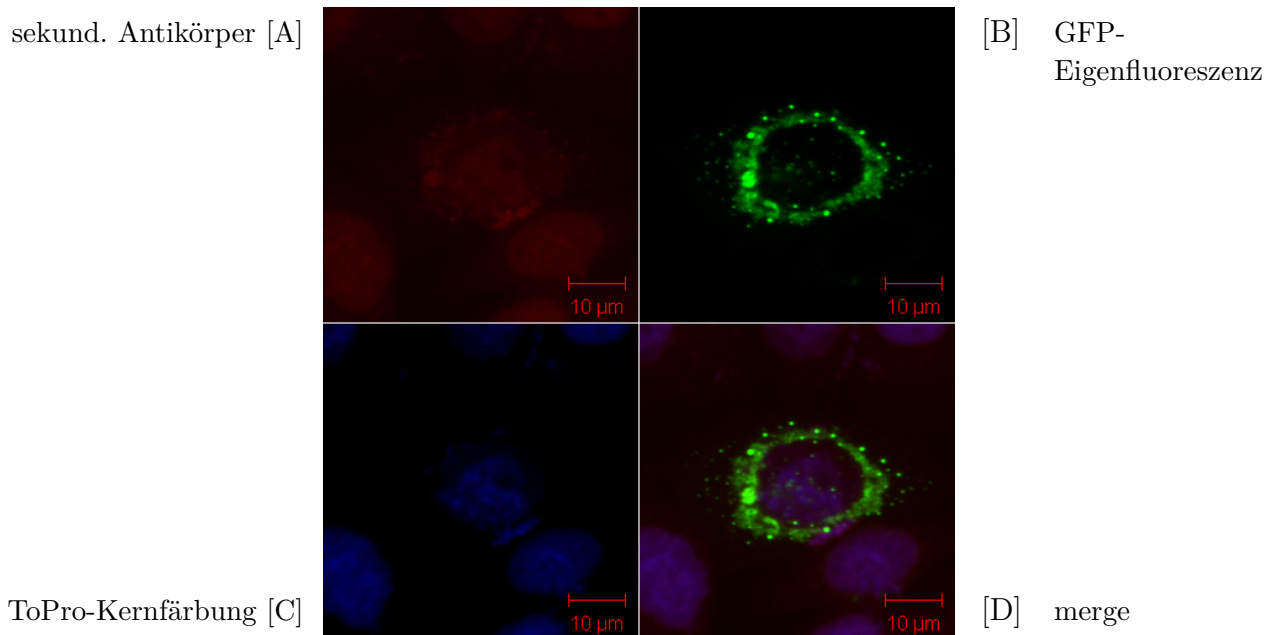


Abb. 6.16: [A]: *Hintergrunddarstellung* durch Einsatz des sekundären Antikörpers (Cy3-anti-rabbit-antibody, Dianova) ohne vorherige Inkubation mit einem primären Antikörper (rote Fluoreszenz) auf GFP-tag Wildtyp-Spastin transfizierten HeLa-Zellen, [B]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-WT-HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelegte Fluoreszenzen)

Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) in der Immunzytochemie

Bei der Inkubation des Antikörper 1 Tier 1 auf HeLa- und HEK-293-Zellen konnte keine Übereinstimmung der Anfärbung des Antikörpers (rote Fluoreszenz) und der Lokalisation des Spastins mit dem GFP-tag in der transfizierten Zelle (grüne Fluoreszenz) gezeigt werden. In Abbildung 6.17 sind mit GFP-tag an Wildtyp-Spastin transfizierte HEK-293-Zellen (grüne Fluoreszenz) dargestellt, die mit dem Antikörper 1 Tier 1 (rote Fluoreszenz) inkubiert wurden (s. Abb. 6.17 (obere Abb. [A])). Die zur Kontrolle durchgeführte Inkubation mit dem Präimmunserum (rote Fluoreszenz) zeigte keine Anfärbbarkeit der transfizierten Zellen (s. Abb. 6.17 (untere Abb. [A])). Der aufgereinigte Antikörper erzielte die gleichen negativen Ergebnisse (s. Abb. 6.18).

Die Färbung des nativen Spastins konnte durch den Antikörper nicht dargestellt werden. Die Darstellung der Tubulinstruktur in der HeLa-Zelle wurde durch die Inkubation mittels Anti- β -Tubulin-Antikörper hervorgerufen (s. Abb. 6.19)

6 Ergebnisse

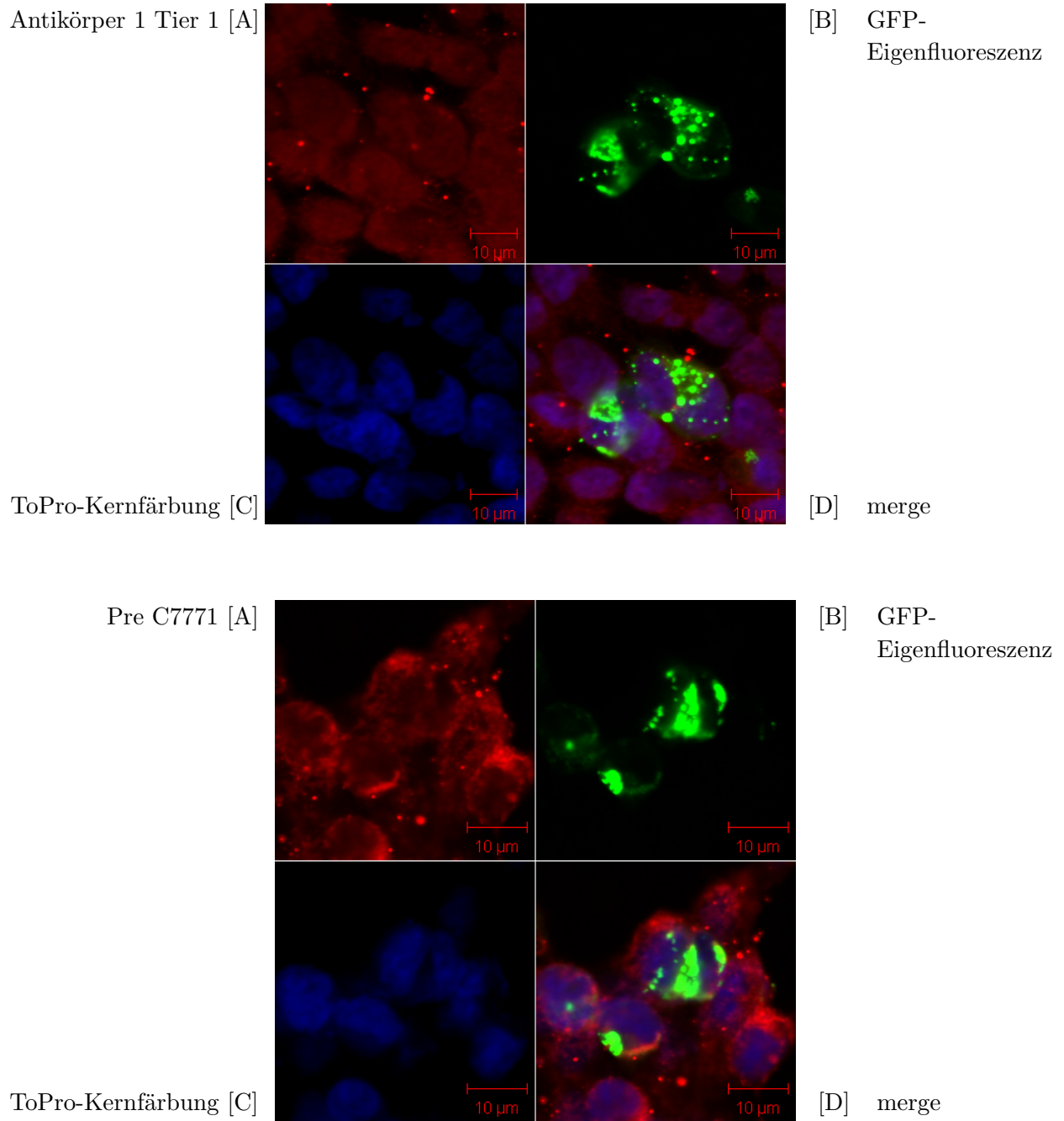


Abb. 6.17: GFP-tag Spastin-Wildtyp transfizierte HEK-293-Zellen inkubiert mit nicht aufgereinigtem Antikörper 1 Tier 1 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [A]) und Präimmunsrum (Pre C7771) (rote Fluoreszenz) (untere Abb. [A]), [B]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-WT-HEK-293-Zellen (grüne Fluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelegte Fluoreszenzen); *keine Färbung des transfizierten Spastins der HEK-293-Zellen durch den Antikörper möglich*

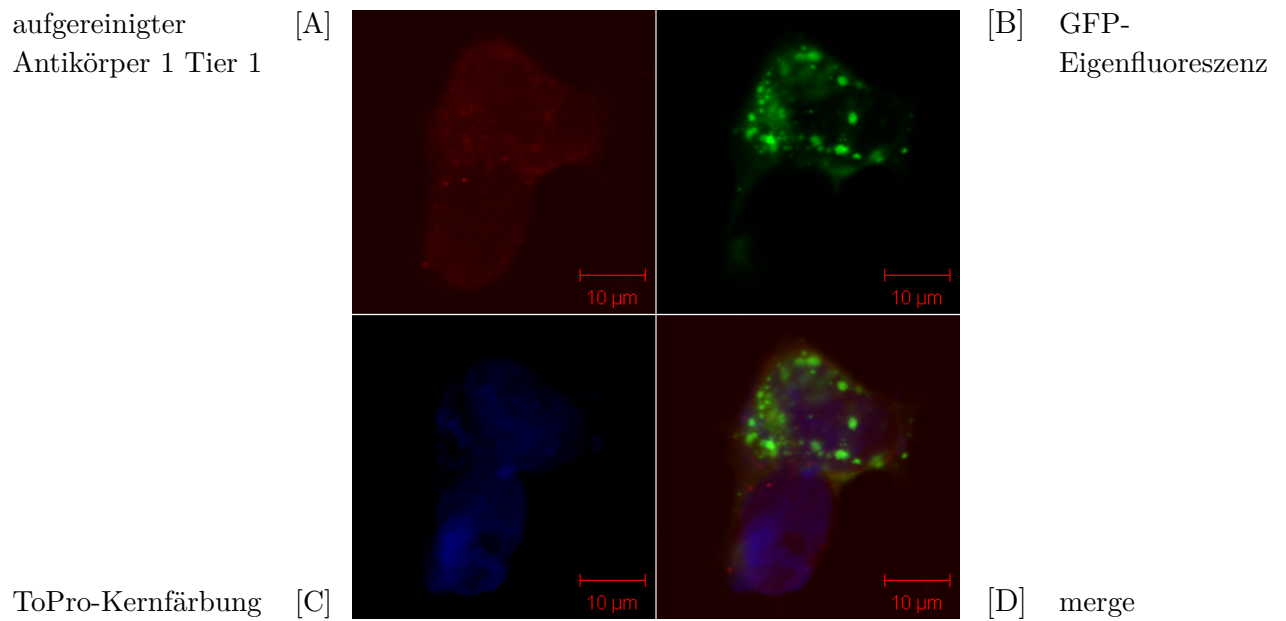


Abb. 6.18: [A]: GFP-tag Spastin-Wildtyp transfizierte HEK-293-Zellen inkubiert mit aufgereinigten Antikörper 1 Tier 1 (rote Fluoreszenz), [B]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-WT-HEK-293-Zellen (grüne Fluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinander gelegte Fluoreszenzen); *keine Färbung des transfizierten Spastins der HEK-293-Zellen durch den aufgereinigten Antikörper möglich*

6 Ergebnisse

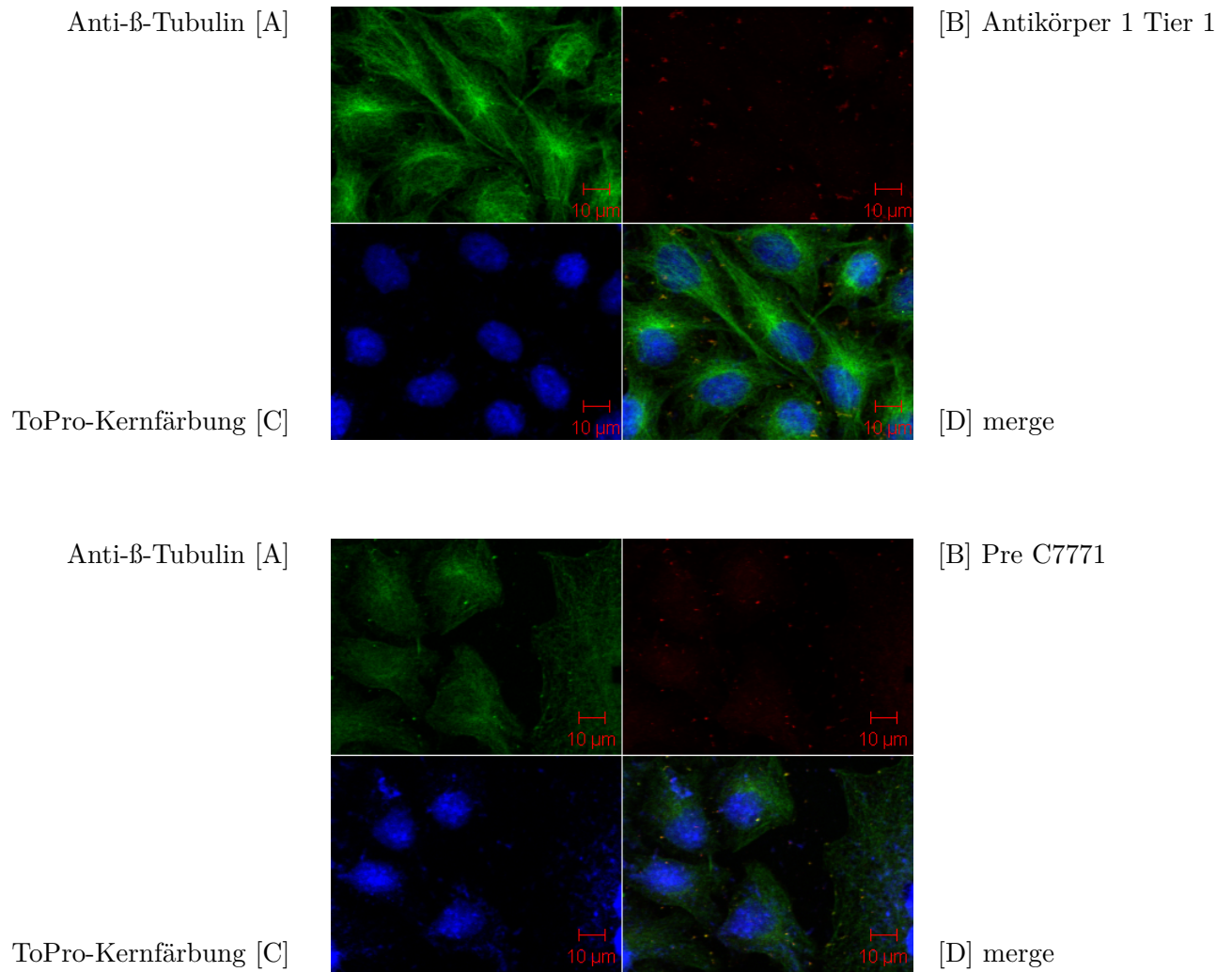


Abb. 6.19: [A]: Darstellung des Tubulin-Apparates der nativen HeLa-Zelle mit Anti- β -Tubulin-Antikörper, [B]: Inkubation der nativen HeLa-Zellen mit nicht aufgereinigtem Antikörper 1 Tier 1 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmenserum (Pre C7771) (untere Abb. [B], [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelagte Fluoreszenzen); *Färbung des nativen Spastins der HeLa-Zellen durch den Antikörper 1 Tier 1 nicht möglich*

Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) in der Immunzytochemie

Antikörper 1 Tier 2 wurde auf HeLa- und HEK-293-Zellen inkubiert. In Abbildung 6.20 ist der nicht aufgereinigte Antikörper 1 Tier 2 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) auf HeLa-Zellen dargestellt, welche mit einem GFP-tag an Wildtyp-Spastin (grüne Fluoreszenz) (obere Abb. [A]) transfiziert wurden. Zu sehen ist eine Kolokalisation der grünen und roten Fluoreszenz. Die Inkubation dieser Zellen mit dem Präimmunserum zeigte keine Kolokalisation (s. Abb. 6.20 untere Abb. [A]).

Wurden die Zellen mit dem aufgereinigten Antikörper 1 Tier 2 inkubiert, zeigte sich ebenfalls eine Kolokalisation des grün fluoreszierenden Spastins und der Färbung durch den Antikörper. Die Darstellung des transfizierten Spastins wurde durch den aufgereinigten Antikörper deutlicher (s. Abb. 6.21).

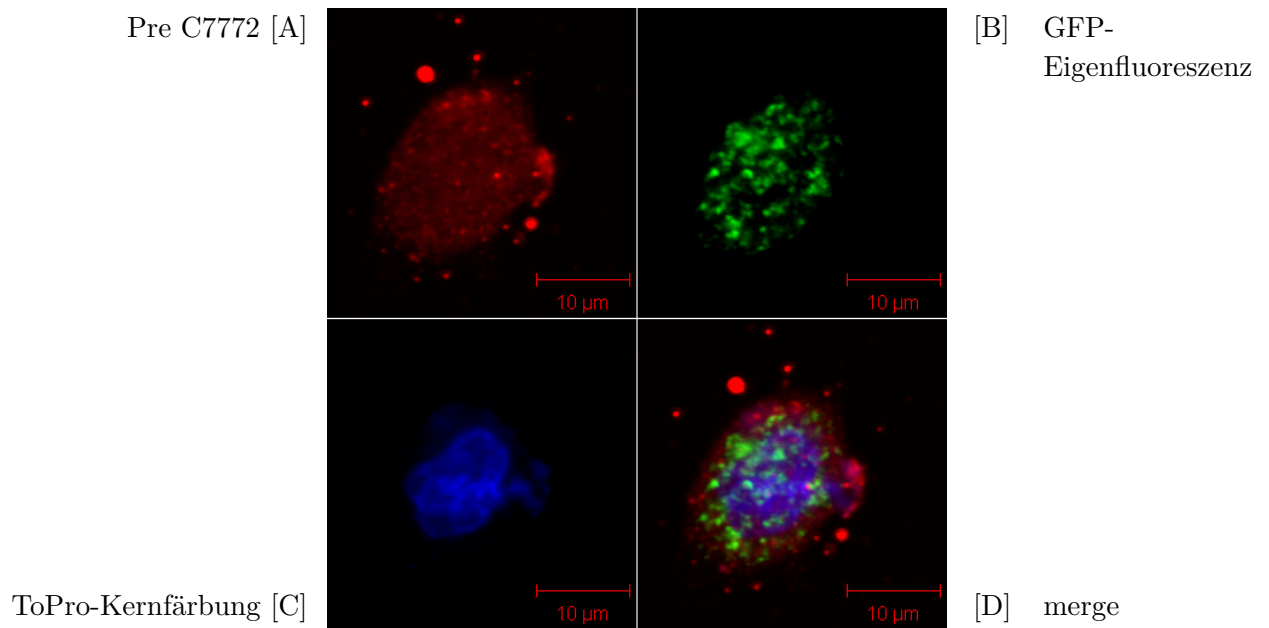
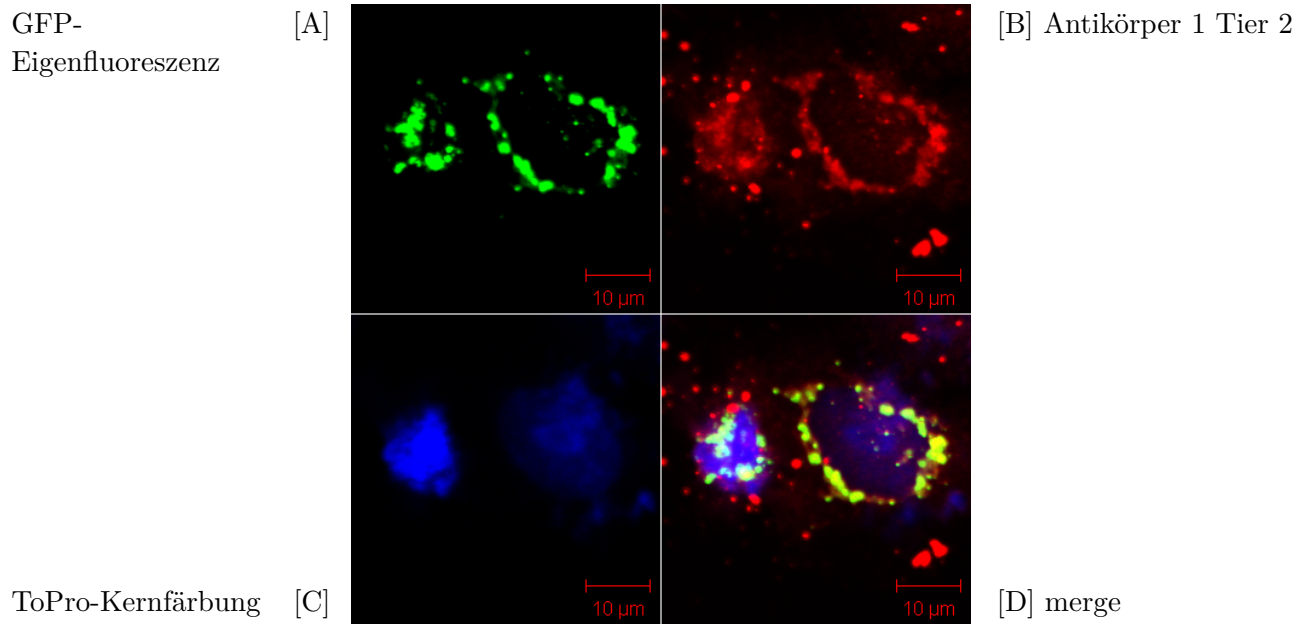


Abb. 6.20: GFP-tag Spastin-Wildtyp transfizierte HeLa-Zellen inkubiert mit nicht aufgereinigten Antikörper 1 Tier 2 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmenserum (Pre C7772) (rote Fluoreszenz) (untere Abb. [A]), [A] obere Abb. und [B] untere Abb.: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-WT-HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (überinandergelegte Fluoreszenzen); *Färbung des transfizierten Spastins der HeLa-Zellen durch den Antikörper möglich*

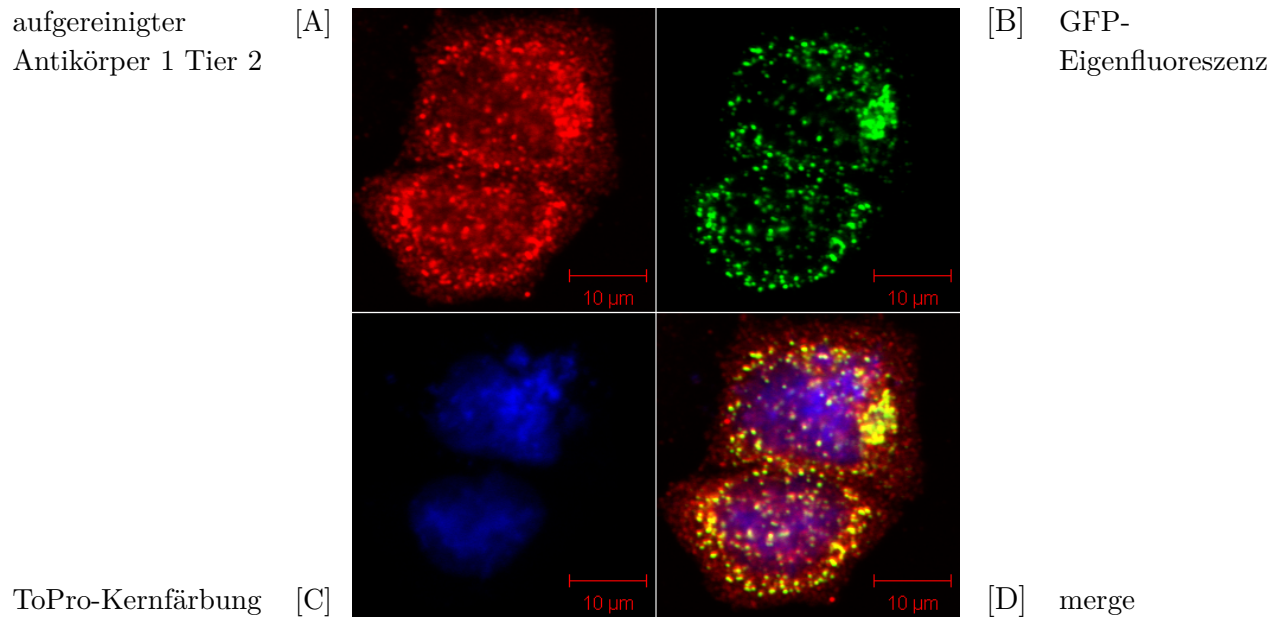
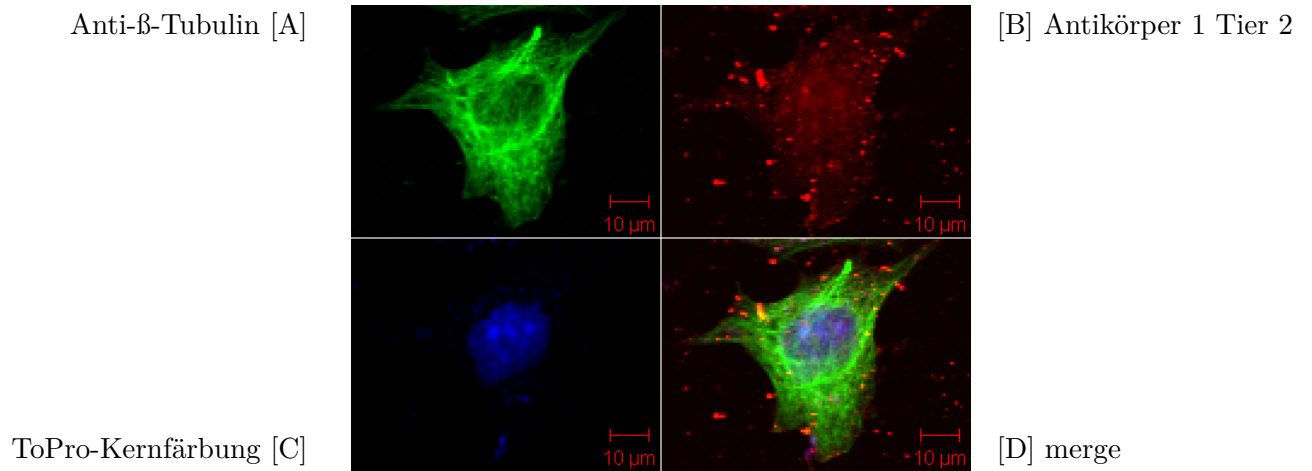


Abb. 6.21: [A]: GFP-tag Spastin-Wildtyp transfizierte HeLa-Zellen inkubiert mit aufgereinigtem Antikörper 1 Tier 2 (rote Fluoreszenz), [B]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-WT-HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelegte Fluoreszenzen); *Färbung und deutlichere Darstellung des transfizierten Spastins der HeLa-Zellen durch den aufgereinigten Antikörper möglich*

6 Ergebnisse

Zur Untersuchung der Anfärbbarkeit des endogenen Spastins wurden native HeLa-Zellen mit dem Antikörper 1 Tier 2 inkubiert. Die Darstellung der Tubulinstruktur in der HeLa-Zelle wurde durch die Inkubation mittels Anti- β -Tubulin-Antikörper hervorgerufen (s. Abb. 6.22 [A]). Das endogene Spastin ist durch den Antikörper 1 Tier 2 nicht anfärbbar (s. Abb. 6.22 (obere Abb. [B])). Das Präimmunsereum zeigte ebenfalls keine Färbung (s. Abb. 6.22 (untere Abb. [B])).



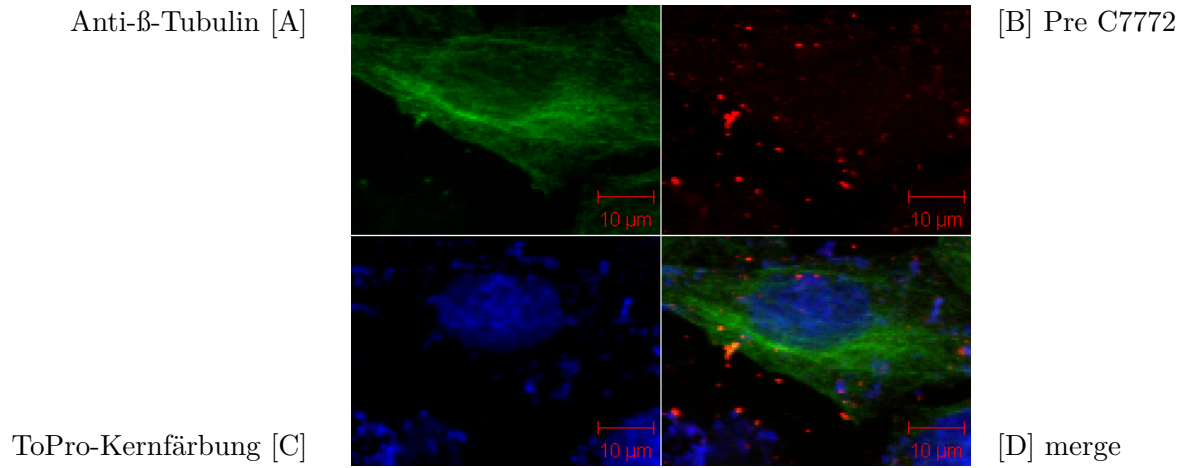


Abb. 6.22: [A]: Darstellung des Tubulin-Apperates der nativen HeLa-Zelle mit Anti- β -Tubulin-Antikörper, [B]: Inkubation der nativen HeLa-Zellen mit nicht aufgereinigtem Antikörper 1 Tier 2 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmunserum (Pre C7772) (untere Abb. [B], [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelagte Fluoreszenzen); *Färbung des nativen Spastins der HeLa-Zellen durch den Antikörper 1 Tier 2 nicht möglich*

Antikörper 2 Tier 1 (A802K C7956) in der Immunzytochemie

Zur Untersuchung der Detektion des Proteins Spastin in Zellen durch den Antikörper 2 Tier 1 wurde der Antikörper auf GFP-tag K388R-HeLa-Zellen inkubiert. Die Kontrolle erfolgte durch Inkubation mit dem Präimmenserum.

Die Fluoreszenz durch die Inkubation mit dem Antikörper 2 Tier 1 (rote Fluoreszenz) (s. Abb. 6.23 (obere Abb. [B])) von GFP-tag K388R transfizierten HeLa-Zellen zeigte keine Übereinstimmung zu der Lokalisation des transfizierten Spastins (grüne Fluoreszenz) (s. Abb. 6.23 [A]). Die Inkubation der Zellen durch das Präimmenserum (rote Fluoreszenz) (s. Abb. 6.23 (untere Abb. [B])) zeigte ebenfalls keine Kolo-kalisation zu dem transfizierten Spastin (grüne Fluoreszenz) (s. Abb. 6.23 [A]).

Die Darstellung des endogenen Spastins auf nativen HeLa-Zellen konnte durch den Antikörper 2 Tier 1 nicht gezeigt werden. Die Darstellung der Tubulinstruktur in der HeLa-Zelle wurde durch die Inkubation mittels Anti- β -Tubulin-Antikörper hervorgerufen (s. Abb. 6.24).

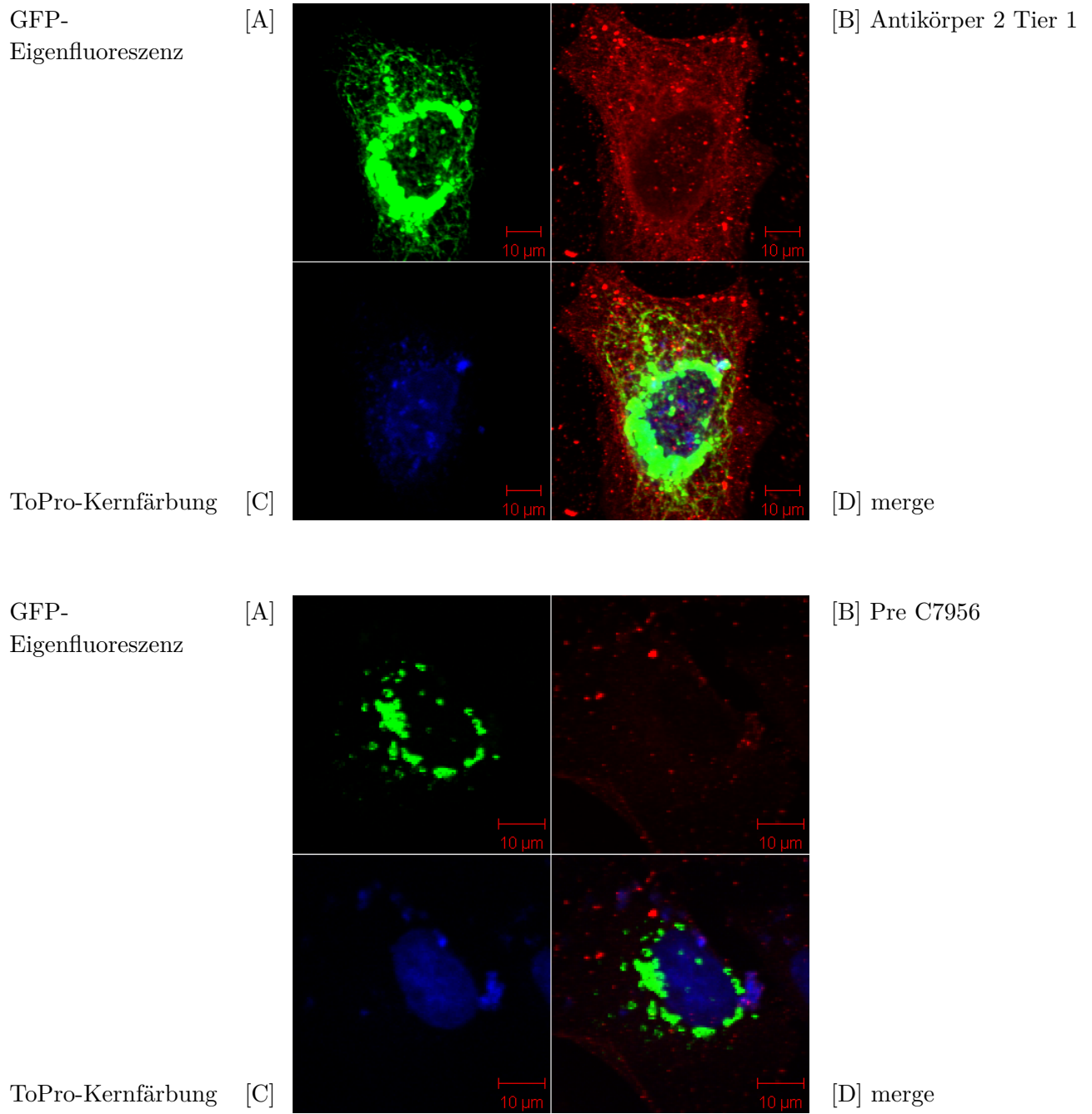


Abb. 6.23: [A]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-tag transfizierten K388R-HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz), [B]: GFP-tag transfizierten K388R-HeLa-Zellen inkubiert mit nicht aufgereinigtem Antikörper 2 Tier 1 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmunsrum (Pre C7956)(rote Fluoreszenz) (untere Abb. [B]), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (überinandergelegte Fluoreszenzen); *Färbung des transfizierten Spastins der HeLa-Zellen durch den Antikörper nicht möglich*

6 Ergebnisse

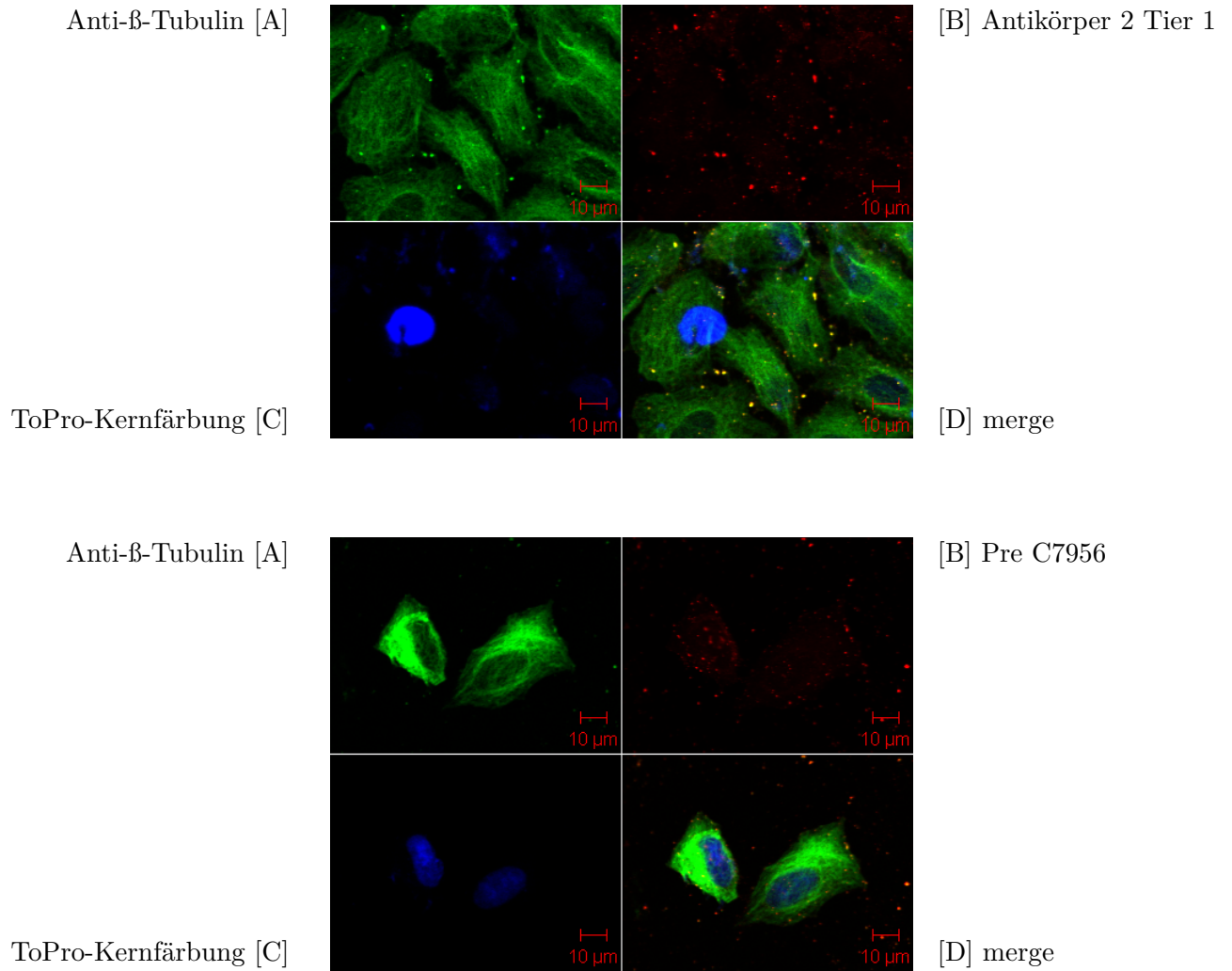


Abb. 6.24: [A]: Darstellung des Tubulin-Apparates der nativen HeLa-Zelle mit Anti- β -Tubulin-Antikörper, [B]: Inkubation der nativen HeLa-Zellen mit nicht aufgereinigtem Antikörper 2 Tier 1 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmenserum (Pre C7956) (untere Abb. [B], [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (überinandergelagte Fluoreszenzen); *Färbung des endogenen Spastins der nativen HeLa-Zellen durch den Antikörper 2 Tier 1 nicht möglich*

Antikörper 2 Tier 2 (A802K C7957) in der Immunzytochemie

Zur Untersuchung der Detektion des Proteins Spastin mit dem Antikörper 2 Tier 2 wurden mit GFP-tag K388R transfizierte HeLa-Zellen mit dem Antiserum und dem Präimmunserum inkubiert.

Die Inkubation durch den Antikörper (rote Fluoreszenz) zeigte keine Kollokalisierung zu dem Spastin in den transfizierten HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz) (s. Abb. 6.25 [A]). Auch die Inkubation mit dem Präimmunserum (rote Fluoreszenz) zeigte keine Kollokalisierung zu dem Spastin (grüne Fluoreszenz) in den transfizierten HeLa-Zellen (s. Abb. 6.25 [B]).

Die Darstellung des endogenen Spastins auf nativen HeLa-Zellen ist durch Antikörper 2 Tier 2 nicht möglich. Die Darstellung der Tubulinstruktur in der HeLa-Zelle wurde durch die Inkubation mittels Anti- β -Tubulin-Antikörper hervorgerufen (s. Abb. 6.26).

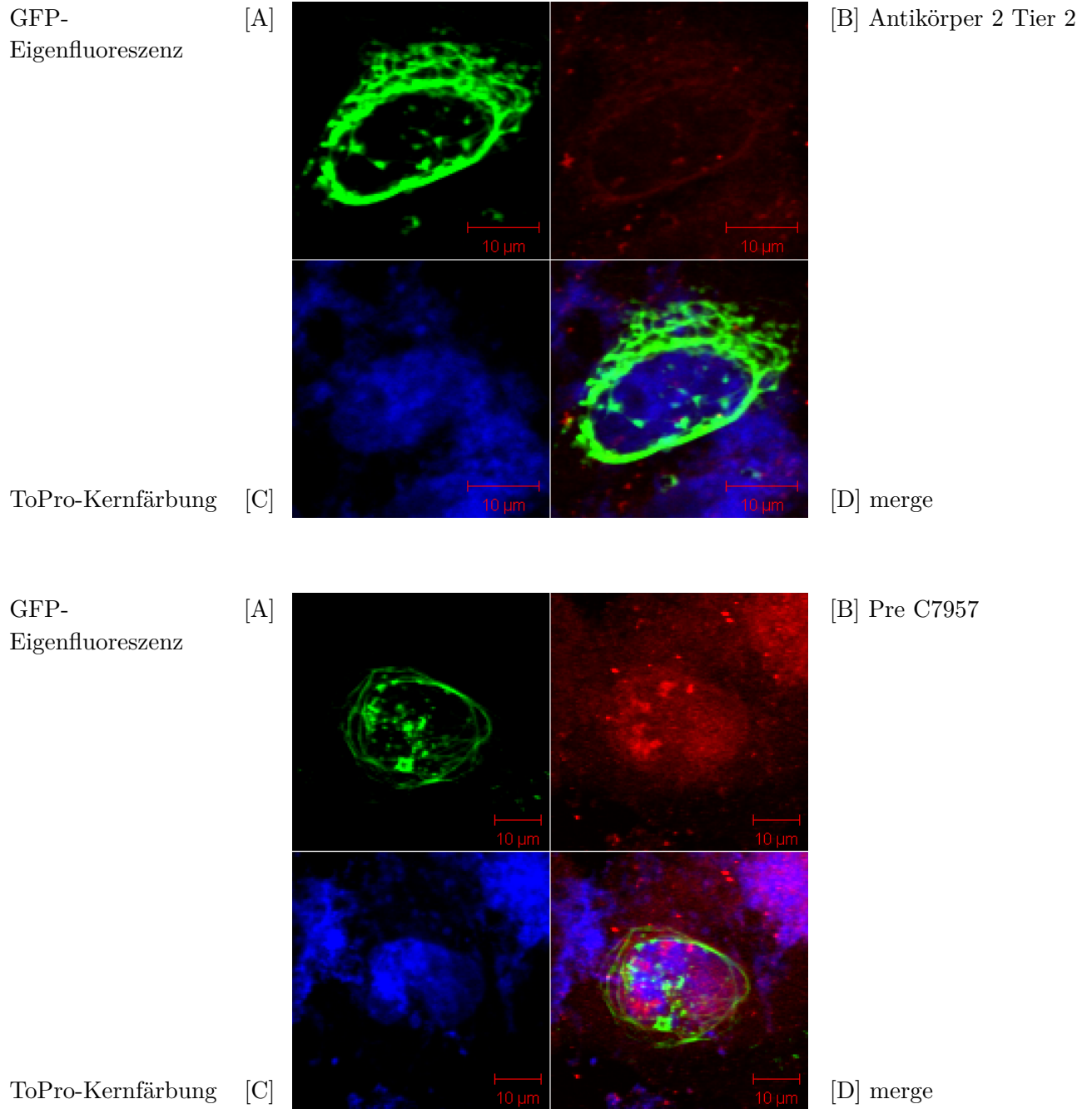


Abb. 6.25: [A]: GFP-Eigenfluoreszenz der GFP-tag transfizierten K388R-HeLa-Zellen (grüne Fluoreszenz), [B]: GFP-tag transfizierten K388R-HeLa-Zellen inkubiert mit nicht aufgereinigtem Antikörper 2 Tier 2 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmunsrum (Pre C7957)(rote Fluoreszenz) (untere Abb. [B]), [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (übereinandergelegte Fluoreszenzen); *Färbung des transfizierten Spastins der HeLa-Zellen durch den Antikörper nicht möglich*

6 Ergebnisse

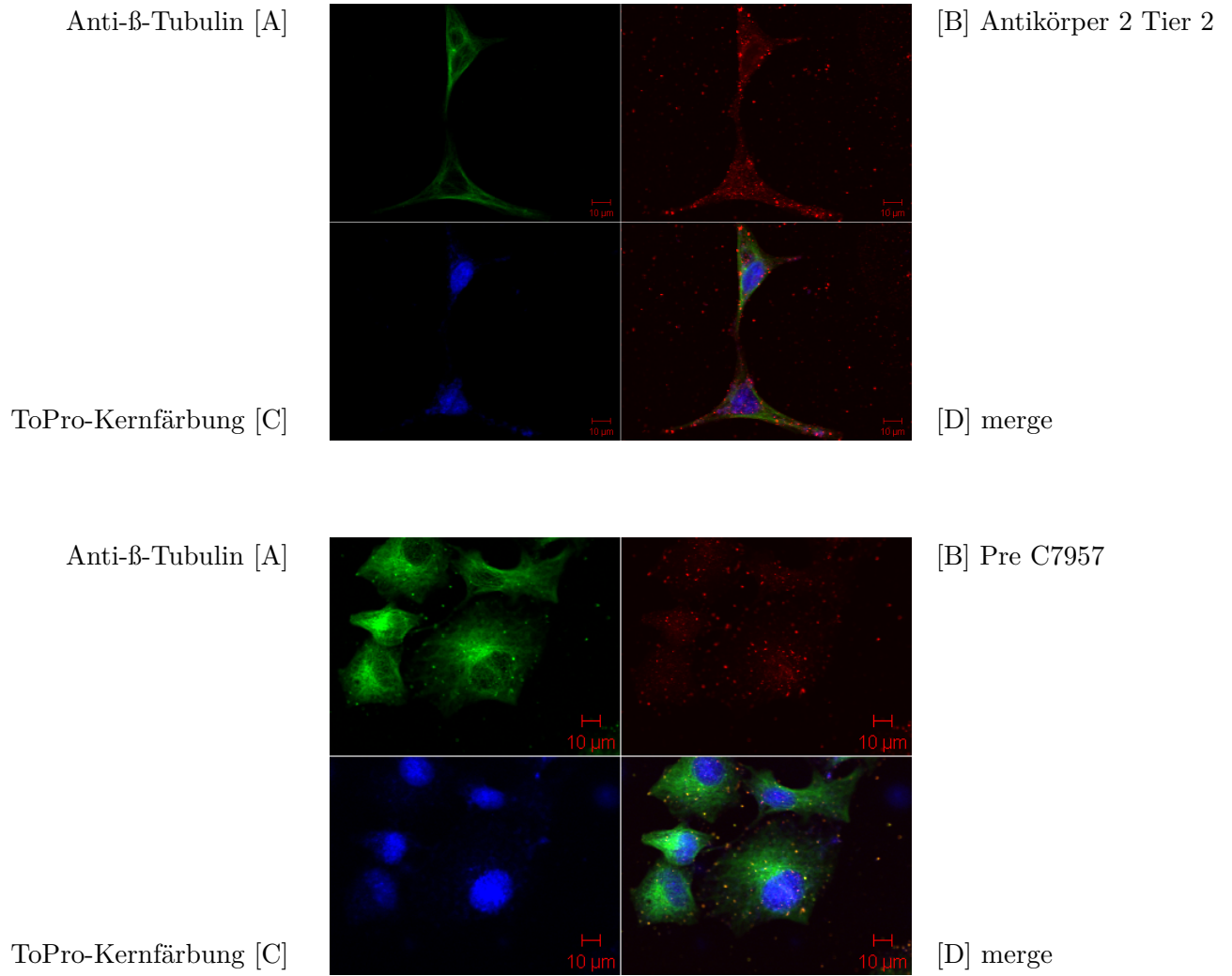


Abb. 6.26: [A]: Darstellung des Tubulin-Apparates der nativen HeLa-Zelle mit Anti- β -Tubulin-Antikörper, [B]: Inkubation der nativen HeLa-Zellen mit nicht aufgereinigtem Antikörper 2 Tier 2 (rote Fluoreszenz) (obere Abb. [B]) und Präimmunsereum (Pre C7957) (untere Abb. [B], [C]: ToPro-Kernfärbung (blaue Fluoreszenz), [D]: merge (überinandergelagte Fluoreszenzen); *Färbung des endogenen Spastins der nativen HeLa-Zellen durch den Antikörper 2 Tier 2 nicht möglich*

6.2.4 Tabellarische Übersicht der Ergebnisse

Tabelle 6.3: Übersicht der Ergebnisse der Charakterisierung des Antikörper 1 (A801K)

	Antikörper1 Tier1 (A801K C7771)	Antikörper1 Tier2 (A801K C7772)
im Western Blot		
verwendete Antikörperkonzentration	1:500	1:500
Aufreinigung des Antiserums		
- über IgG-Chromatographie	kein Unterschied zum Antiserum	kein Unterschied zum Antiserum
- über Spastinpeptid	weniger unspezifische Banden	weniger unspezifische Banden
Spastinpeptiderkennung	positiv	positiv
Bandenhöhenvergleich Antiserum-Präimmunserum		
bei transfizierten Zellen:		
- Spastin plus Flag-tag (1kDa) (HEK-293-Zellen)	68kDa	68kDa
- Färbung mit Flag-Antikörper	gleiche Bande	gleiche Bande
bei untransfizierten Zellen:		
- HEK-293-Zellen	77kDa	51kDa, 77kDa, 85kDa
- HeLa-Zellen	52kDa, 58kDa, 60kDa, 70kDa, 72kDa, 85kDa	64kDa, 70kDa
bei Organen:		
- Maus Leber	60kDa, 68kDa, 77kDa, 85kDa, 90kDa	
- Maus Herz	68kDa, 85kDa, 100kDa	
Bandenspezifisierung durch Peptidpräinkubation bei untransfizierten Zellen und den Organen der Maus	keine spezifische Banden	keine spezifischen Banden
in der Immunzytochemie:		
verwendete Antikörperkonzentration	1:50	1:50
-HEK-293-Zellen	keine Färbung	positive Färbung
-WT-HeLa-Zellen	keine Färbung	positive Färbung
-native HeLa-Zellen	keine Färbung	keine Färbung

Tabelle 6.4: Übersicht der Ergebnisse der Charakterisierung des Antikörper 2 (A802K)

	Antikörper2 Tier1 (A802K C7956)	Antikörper2 Tier2 (A802K C7957)
im Western Blot		
verwendete Antikörperkonzentration	1:1000	1:500
Spastinpeptiderkennung	negativ	negativ
Bandenhöhenvergleich Antiserum-Präimmunsrum bei transfizierten Zellen:		
- Spastin plus Flag-tag (1kDa) (HEK-293-Zellen)	keine spezifischen Banden	keine spezifische Banden
bei untransfizierten Zellen:		
- HEK-293-Zellen	68kDa, 75kDa, 80kDa	75kDa
Bandenspezifizierung durch Peptidpräinkubation bei untransfizierten Zellen	keine spezifische Banden	keine spezifischen Banden
in der Immunzytochemie:		
verwendete Antikörperkonzentration	1:50	1:50
-WT-HeLa-Zellen	keine Färbung	keine Färbung
-native-HeLa-Zellen	keine Färbung	keine Färbung

In Tabelle 6.3 und Tabelle 6.4 ist eine strukturierte Übersicht der Ergebnisse der Charakterisierung der Antikörper 1 (A801K) und Antikörper 2 (A802K) dargestellt. Zusammengefasst wird für die Charakterisierung der Antikörper im Western Blot die Spastinpeptiderkennung, der Bandenhöhenvergleich von Antiserum zu Präimmunsrum auf verschiedenen Zelllysaten sowie Organlysaten, die erfolgte Bandenspezifizierung durch die Peptidpräinkubation und die Aufreinigung des Antiserums aufgelistet. Die immunzytochemischen Ergebnisse der Färbung der HeLa- und HEK-293-Zellen sind aufgeführt.

7 Diskussion

In Verbindung mit der autosomal dominanten hereditären spastischen Paraplegie wurde das Genprodukt Spastin des SPG4 entdeckt (Hazan et al. 1999). Die weitere Erforschung des Proteins weist verschiedene Aussagen bezüglich dessen Funktion und Lokalisation auf. Eine zu betrachtende Divergenz besteht bei den eingesetzten Antikörpern (s. Kap 3.3). In der vorliegenden Arbeit wurden neue polyklonale Antikörper untersucht, die mit Hilfe des Western Blots und der Immunzytochemie Methode analysiert wurden.

In der Diskussion soll zunächst mit der Betrachtung verschiedener Faktoren, die für die Interpretation der Ergebnisse relevant sind, begonnen werden.

7.1 Aspekte zur Interpretation der Ergebnisse

Das durch den Western Blot dargestellte Bandenmusters, welches sich nach der Auftrennung der Proteingemische in Bezug auf das Molekulargewicht darstellt, weist durch Inkubation mit den Antiseren Banden im Bereich von 30kDa bis 140kDa auf (s. Abb. 6.1). Verschiedene kausale Bedingungen können zur Färbung von Banden im Western Blot führen.

Das Serum des Kaninchens, in dem die Antikörper gegen das Spastinpeptid enthalten sind, enthält auch Antikörper, welche gegen andere Antigene gerichtet sind. Dies resultiert aus der normalen Funktion des Immunsystems, die den Organismus vor Fremdeinflüssen und Infektionen schützt (Schecklies 1996).

Innerhalb der IgG-Fraktion sind nach der Immunisierung des Organismus ca. 5-10% des Gesamt-IgG der spezifische Antikörperanteil (Schecklies 1996). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Isolierung der IgG-Fraktion durch die Aufreinigung über die IgG-

Chromatographie kein Unterschied der Darstellung der Banden erzielt (s. Kap. 6.1.3). Dieses Ergebnis war zu erwarten, da durch die IgG- Chromatographie zwar der IgG- Anteil des Antiserums (ca. 70 - 75%) von dem restlichem Proteinanteil des Serums gereinigt wird, aber der spezifische Antikörperanteil der gesamten IgG-Fraktion (von 5-10%) nicht erhöht wird. Die spezifische Aufreinigung über das Spastinpeptid, bei der der spezifische Antikörperanteil der IgG-Fraktion aufkonzentriert wird, ist daher besser.

Durch Aufreinigung der Antiseren gegenüber dem Spastinpeptid wurden die unspezifischen Banden reduziert. Banden, die trotz erhöhter Konzentration der Spastinantikörper in dem aufgereinigten Antiserum mit der gleichen Intensität auf Zellen erschienen, geben einen Hinweis darauf, dass trotz Aufreinigung weiterhin Antikörper, die andere Antigene anfärben im aufgereinigten Serum vorhanden sind (s. Abb. 6.3).

Ein weiterer Aspekt ist, dass die Darstellung der Auftrennung der Banden in Abhängigkeit zu den eingesetzten Zelllinien und Puffern in der Probenvorbereitung variiert (s. Kap. 6.1.2).

Die Probenvorbereitung der Proteingemische für die denaturierende diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese (Western Blot) kann bei instabilen Proteinen chemisch durch Erhitzen in SDS- oder alkanolaminhaltigen Probenauftragspuffern zu einer Proteinfragmentation führen, durch welche die Interpretation, ob es sich um Abbauprodukte des Proteins oder um Kreuzreaktionen handelt, erschwert wird (Kowitz und Maloney 1982). Kubo 1995 hingegen zeigt, dass die Probenvorbereitung bei 100°C in alkanolaminhaltigen Probenauftragspuffern zu einer Proteinfragmentation führt, aber die Spaltung der Peptidbindung durch die Anwesenheit der SDS- Lösungen, sowie Proben in Lithium-Citrat stabil bleiben (Kubo 1995).

In dem experimentellen Teil der vorliegenden Arbeit wurde durch den SDS-haltigen Lysepuffer 1, sowie den SDS-haltigen Proteinauftragspuffer nach Lämmler die bessere Darstellung der Auftrennung der Banden erreicht. Die Möglichkeit einer Proteinfragmentation ist zu bedenken.

Die Auswahl des Einsatzes der Membran hat ebenfalls Einfluß auf die Hintergrunddarstellung und unspezifische Banden im Western Blot. Je höher die Proteinbindungskapazität der Membran (PVDF mit 600 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Nitrocellulose mit 180 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), desto

kleinere und geringere Mengen Peptid werden darstellbar. Dabei verstärkt sich jedoch die Tendenz zu einer unspezifischen Hintergrunddarstellung (Kurien und Scofield 2006). Um die Hintergrunddarstellung zu minimieren wurde in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit der Nitrocellulose-Membran gearbeitet, wobei die Möglichkeit besteht, dass kleinere Mengen von Proteinen dabei nicht mit auf die Membran gebunden worden sind. Schwach gebundene Peptide können nach dem Transfer durch die Blocklösung ersetzt werden. Die Empfindlichkeit zur Ablösung der Peptide nach dem Transfer ist abhängig vom pH-Wert und dem Blockpuffer. Dabei ist ein saurer pH stabiler als der pH bei 7 (Hoffman et al. 1991).

Ein anderer Gesichtspunkt ist Struktur der Proteine. Antikörper erkennen auf dem Protein Epitope (s. Kap. 3.4.1). Die Epitope können sich kontinuierlich darstellen und mit der Sekundärstruktur des Proteins übereinstimmen oder diskontinuierlich von Aminosäuren gebildet werden, die nur innerhalb der Tertiärstruktur des Proteins aneinander liegen (Janeway et al. 2002).

Die Antikörperherstellung beruht auf dem Prinzip, dass Antikörper, welche gegen synthetische Peptidsequenzen induziert werden die Tertiärstruktur der Proteine gelegentlich erkennen (Janeway et al. 2002). Wenn die gewählte Aminosäuresequenz in einem diskontinuierlichen Epitop liegt, kann möglicherweise das Protein nicht mehr erkannt werden. Auch posttranslationale Modifikationen müssen bei der Erkennung des Proteins von dem Antikörper berücksichtigt werden, da Glykosylierungen und Phosphorylierungen die Oberflächenstruktur der Proteine verändern (Janeway et al. 2002).

Anders beschrieben besteht die höchste Wahrscheinlichkeit der Detektion von nativen Proteinen (Tertiärstruktur) bei der Herstellung von Antikörper durch die Immunisierung mittels der nativen rekombinanten Proteine. Soll der Antikörper auf denaturierten Proteinen (Sekundärstruktur) getestet werden besteht die beste Detektion, wenn die Antikörperherstellung gegen die denaturierte Form der Proteine synthetisiert wurde.

Die zu testenden Antikörper sind gegene die Peptidsequenz (Sekundärstruktur) des Proteins Spastin gerichtet.

Bei der Methode der Immunzytochemie werden intakte Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem Antiserum inkubiert (s. Kap. 5.4). Im Gegensatz zu der denaturierenden diskontinuierlichen SDS-Elektrophorese (Western Blot) wird der Antikörper in der Im-

munzytochemie auf der Tertiärstruktur der Proteine inkubiert.

So besteht die Möglichkeit der Färbung des Proteins nach der Denaturierung im Western Blot, während das Protein durch die Immunzytochemie nicht nachgewiesen werden kann.

White et al. 2007 zeigen, dass Spastin sich zu einer Hexamerstruktur zusammensetzt, ähnlich vieler Proteine der AAA-Familie. Im Zentrum der Hexamerstruktur befinden sich Schleifen, welche das C-terminale Ende der Aminosäuren des Tubulins erkennen und somit eine wichtige Rolle bei der Mikrotubulidepolymerisation spielen (White et al. 2007). Die Anordnung der Proteine in Abhängigkeit von deren Aktivität könnte die dreidimensionale Struktur des Proteins Spastin verändern, so dass auch dies bei der Detektion des Proteins zu berücksichtigen ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden neue polyklonale Antikörper getestet, die gegen die Aminosäuresequenz 446-459, welche ein Teil der AAA-Domäne ist, und den Peptidabschnitt 561-575, der in dem alternativ spleißendem Exon 15 liegt, gerichtet ist. Da sich die gewählte Peptidsequenz 561-575 in einem alternativ zu spleißenden Exon befindet, besteht die Möglichkeit, dass die in vivo vorhandene Isoform des Spastins, in dem das Exon deletiert ist, nicht angefärbt werden kann.

Für die Auswahl der Peptidsequenz wurde beachtet, dass möglichst nur eine geringe oder keine Übereinstimmung der Peptidsequenzen zu anderen Proteinen besteht, um mögliche Kreuzreaktionen gering zu halten. Dabei besteht eine geringe Übereinstimmung der humanen Proteine VPS4B und Fidgetin-like protein mit der Aminosäuresequenz 446-459 der AAA-Domäne (s. Abb. 7.1). Das Protein VPS4 (Vacuolar protein sorting 4) wird in der gleichen Subgruppe der AAA-Familie beschrieben, wie das Protein Spastin und enthält ebenfalls eine MIT-Domäne (Vajjhala et al. 2007). Fidgetin-like protein ist ebenfalls ein Protein der AAA-Familie (Park et al. 2007).

Überlappende Proteine der Peptidsequenz 1 (LLCERREGEHDASRR) des Proteins Spastin

Spastin: LFAVARELQPSIIFIDEVDSLLCERREGEHDASRR**LLKTEFLIEFDGVQSAGDDRVLV**MGA
 LFAVAR QP++IFIDE+ D**SL** +R + GEH++ SRR+ KTEFL++ DG ++ +DR+ LV+ GA

Fidgetin-like: LFAVARCQQPAVIFIDEID**SLLSQRGDGEH**ESSRR**IKTEFLVQLDGATTSS**EDRILV**VGA**

Spastin: LFAVARELQPSIIFIDEVDSLLCERREGEHDASRR**LLKTEFLIEFDGVQSAGDDRVLV**MGA
 LF +ARE + PSIIFIDE +D**S** **R E E** +A+ RR+ KTEFL++ GV +D + LV+ GA

VPS4B: LFQLARENKPSIIFIDEID**SLCGSRSENE**SEAARR**IKTEFLVQM**QGV-GVDNDGIL**VGA**

Abb. 7.1: Darstellung von Proteinsequenzen der Proteine Spastin, Fidgetin-like protein und VPS4B. Farblich unterlegt dargestellt sind die übereinstimmenden Aminosäuren der Proteine Fidgetin-like protein und VPS4B innerhalb der Peptidsequenz 1 (446-459) des Proteins Spastin, die für die Antikörperherstellung des Antikörper 1 injiziert wurde.

Mit dem Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) des NCBI (National Centre for Biotechnology Information) wurden keine weiteren Übereinstimmungen zu Proteinen anderer Spezies gefunden, so dass der synthetisierte Antikörper nur eine geringe Kreuzreaktion auf die Proteine des Menschen haben sollte und das Protein Spastin bei anderen Spezies ebenfalls ohne weitere Kreuzreaktionen spezifisch detektieren kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte das native Protein Spastin der Maus nicht spezifisch angefärbt werden (s. Abb. 6.11 [B]). Die Aussage der Speziespezifität des Antikörpers ist jedoch nur eingeschränkt möglich, da der Antikörper das native humane Protein Spastin nicht angefärbt hat.

In den Versuchen wurde gezeigt, dass das Serum des Antikörper 1 eine eindeutige Bandenerkennung des Spastinpeptides zeigt, während das Serum des Antikörper 2 dies nicht anzeigt (s. Kap. 6.2.1).

Eine mögliche Ursache dafür, dass keine Anfärbbarkeit der Spastinpeptidbande durch das Antiserum mit dem Antikörper 2 vorliegt, ist, dass bei der Herstellung der Antikörper keine Immunisierung in dem Kaninchen durch die Peptidsequenz des Antikörper 2 stattgefunden hat.

Dies ist häufiger, wenn die Peptidsequenz, welche injiziert wurde ein Hapten darstellt. Diese meist niedermolekulare chemisch definierte Substanz (Hapten) induziert in einem vorher noch nicht mit ihr in Kontakt gekommenen Organismus nur unter bestimmten Bedingungen eine Immunantwort, z.B. wenn sie an einen Carrier gekoppelt ist. Ist der

Organismus sensibilisiert reagiert das Hapten jedoch aufgrund der Struktur mit spezifischen Antikörpern (Janeway et al. 2002).

Bei der Herstellung der Antikörper wurden beide Peptidsequenzen an einen KLH-Carrier gekoppelt (Invitrogen Ltd, UK). Das KLH (keyhole limpet hemacyanin) hat als Carrier, genau wie BSA (bovine serum albumin), eine große Bedeutung in der Antikörperherstellung, da diese Konjugate normalerweise eine sehr gute Immunantwort induzieren (Lateef et al. 2007).

7.2 Immunzytochemischer Nachweis

In den immunzytochemischen Experimenten der vorliegenden Arbeit erfolgte die Spezifizierung der neuen polyklonalen Antikörper gegen das Protein Spastin.

Bereits Errico et al. beschrieben 2004 für die mit GFP-tag K388R transfizierten HeLa-Zellen ein deutliches bundle-Muster (Errico et al. 2004). Dies kann auch in dieser Arbeit wiederholt gezeigt werden (s. Abb. 6.14).

Eine Übereinstimmung der Färbung des überexprimierten GFP (green fluoreszenz protein) markierten Spastins transfizierter Zellen kann mit Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) demonstriert werden, während dies mit Antikörper 1 Tier 1 (A801K C7771) nicht möglich ist (s. Abb. 6.20, Abb. 6.17). Dieses unterschiedliche Ergebnis der Antiseren, die Antikörper 1 (A801K) enthalten, gibt einen Hinweis darauf, dass bei der Herstellung von polyklonalen Antikörpern die effektive Antikörperfunktion je nach Antiserum abweicht (Schecklies 1996).

Natives Spastin ist mittels Immunzytochemie durch Antikörper 1 (A801K) nicht darstellbar. Die Erkennung des transfizierten Spastins ist somit an intakten und fixierten Zellen nur mit dem Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) möglich.

Die Darstellung durch den aufgereinigten Antikörper 1 Tier 2 weist weniger Hintergrund auf, so dass die aufgereinigte Variante des Antikörpers zur weiteren Verwendung in der Forschung an transfizierten Spastin empfehlenswert erscheint (s. Abb. 6.21). Die in den bisherigen Arbeiten eingesetzten Antikörper wurden ebenfalls aufgereinigt verwendet (Wharton et al. 2003, Charvin et al. 2003, Errico et al. 2004, Salinas et al. 2005).

Eine eindeutige Färbung der transfizierten Zellen mit dem Antikörper 2 Tier 1 (A802K

C7956) und Antikörper 2 Tier 2 (A802K C7957) konnte nicht gezeigt werden (s. Abb. 6.23, Abb. 6.25). Die Darstellung des überexprimierten, sowie auch des nativen Spastins ist durch die Verwendung dieser Antiseren in der Immunzytochemie nicht möglich.

7.3 Molekulargewicht und Varianten von Spastin

Im Western Blot kann das Molekulargewicht des Proteins Spastin experimentell bestimmt werden. Für das Protein Spastin sind zwei Transkriptionsvarianten bekannt, die zu einer Isoform mit 616 Aminosäuren (Spastinisoform 1) und einer Isoform mit 584 Aminosäuren (Spastinisoform 2) führen. Der Unterschied zwischen den Isoformen ist das Fehlen des Aminosäureabschnittes 197-228 bei Spastinisoform 2.

Claudiani et al. 2005 vermuteten zusätzlich alternative Translationsstartpunkte, so dass für eine Transkriptionsvariante jeweils zwei unterschiedliche Proteine entstehen. Diese sind bedingt durch zwei ATG-Startcodons. Beginnt die Proteinisoform bei dem 2. ATG-Startcodon an der 87. Aminosäure entfällt die NLS1 (nuclear localisation sequenz) und die NES (nuclear export sequenz). Dadurch könnte diese Isoform vorwiegend für die nukleäre Lokalisation des Proteins verantwortlich sein (Claudiani et al. 2005). Diese Mechanismen führen theoretisch errechnet zu vier verschiedenen Polypeptiden mit Molekulargewichten bei 55kDa und 64kDa, sowie 60kDa und 67kDa (s. Abb. 7.2).

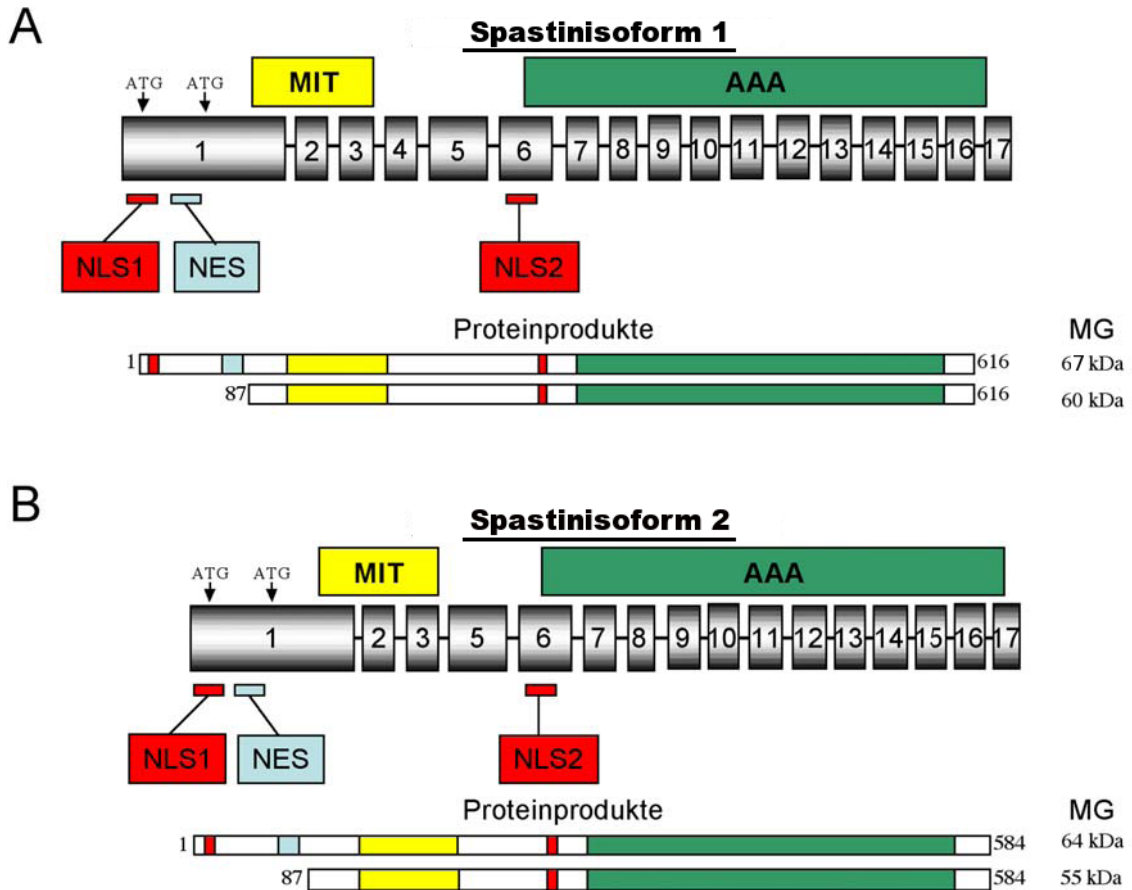


Abb. 7.2: Isoformen von Spastin modifiziert n. Sasse AC 2005 (A) Spastinisoform 1: Schematische Darstellung des Spastingens mit seinen Exons (1-17). Zwei Startcodon (ATG) stehen bei der Expression zur Verfügung. Daraus ergeben sich zwei Polypeptide mit dem Molekulargewicht (MG) von 67kDa und 60kDa. Die Zahlen beziffern die Aminosäuren. (B) Spastinisoform 2. Bei dieser Variante fehlt das Exon 4. Es sind wiederum zwei Startcodons vorhanden, so dass sich zwei Genprodukte bei 64kDa und 55kDa ergeben. NES (blau): nukleäre Export-Sequenz, NLS (NLS1, NLS2, rot): nukleäre Lokalisationssequenz, MIT (gelb): “microtubule interacting and trafficking”-Domäne, AAA (grün): “ATPase associated with diverse cellulare activities”-Domäne

In der Literatur wird das experimentell mittels Western Blot ermittelte Molekulargewicht des endogenen Proteins Spastin verschieden angegeben. Charvin et al. 2003, sowie Wharton et al. 2003 bestimmen das Molekulargewicht experimentell bei 75kDa und 80kDa (Charvin et al. 2003, Wharton et al. 2003). Errico et al. 2004 erkennen hingegen das Protein Spastin in der Höhe des Molekulargewichtes von 62kDa und 68kDa (Errico

et al. 2004). Salinas et al. 2005 bestimmen die Höhe des Molekulargewichtes für Spastin bei 55kDa (Salinas et al. 2005).

Um die experimentell resultierenden Unterschiede zu analysieren, soll der Einsatz der verschiedenen Antiseren und die Validierung der Antikörper näher betrachtet und in Bezug zu den Ergebnissen dieser Arbeit gesetzt werden.

Charvin et al. generieren Antikörper gegen die Aminosäuresequenz 129-143 (176), welche in der MIT-Domäne des Proteins liegt und Antikörper gegen den Peptidabschnitt 204-218 (177). Dieser Peptidabschnitt (177) ist in der Spastinisoform 2 nicht vorhanden. Die aufgereinigten Antikörper (177, 176) werden gegen das rekombinante Maus-Protein validiert. Der Antikörper gegen den Peptidabschnitt 177 kann endogenes Spastin der Maus nicht anfärben. Die Bandenhöhen von 75kDa und 80kDa werden mit dem Antikörper gegen den Peptidabschnitt 176 bestimmt, indem das aufgereinigte Antiserum mit dem Präimmunserum verglichen wird (Charvin et al. 2003).

Charvin et al. vermuten, dass die Diskrepanz des theoretisch errechneten Molekulargewichtes bei 67kDa zu den experimentell erkannten Banden bei 75kDa und 80kDa durch posttranslationale Modifikation mittels Phosphorylierung oder Glykosylierung hervorgerufen wird und erklären die beiden Bandenhöhen durch alternatives Spleißen des Exon 4 (Charvin et al. 2003).

Betrachtet man in der vorliegenden Arbeit das aufgetragene Peptid und vergleicht die Färbung durch das Antiserum im Gegensatz zum Präimmunserum, so wird bei Antikörper 1 das Peptid spezifisch erkannt.

Wird dann das Präimmunserum mit dem Antiserum auf verschiedenen nativen Lysaten verglichen, so zeigen sich Banden, welche nur im Antiserum erscheinen, in der Höhe von mehreren unterschiedlichen Molekulargewichten. Die Höhen der Banden variieren je nach Zellysat und Puffer, so dass eine eindeutige Zuordnung der Bandenhöhe zu dem endogenen Protein Spastin primär durch den Vergleich von Präimmunserum mit Antiserum nicht möglich erscheint.

Da die dargestellten Banden der nativen Zellysate eine sehr hohe Variabilität bezüglich des Bandenmusters aufweisen ist die mögliche Interpretation der Banden als spezifisch aus Gründen einer postrationalen Modifikation oder alternativen Spleißens eher unwahrscheinlich.

Wharton et al. wählen die Aminosäuresequenz 561-573, welche einen alternativ zu spleißenden Anteil des Exon 15 enthält. Die Bandenhöhen von 75kDa und 80kDa werden durch eine Peptidpräinkubation des aufgereinigten Antiserum am humanen okzipitalen Cortex spezifiziert (Wharton et al. 2003).

Wharton et al. erwägen neben Prozessen der posttranslationalen Modifikation durch Glykosylierung auch Prozesse der Ubiquitinierung für die schwächere Bande bei 80kDa (Wharton et al 2003).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine spezifische Blockierung des Antikörpers, bei der Anfärbung des Peptids mit peptidpräinkubiertem Antiserum. Auf nativen Zellysaten kann keine spezifische Bande inhibiert werden, so dass die Vermutung nahe liegt, dass natives Spastin bei dieser Vorbereitung der Zellysate auf dem Western Blot nicht dargestellt werden kann.

Errico et al. 2004 setzen Antiseren ein, welche gegen Fusionsproteine mit dem Aminosäureabschnitt 1-122 und 87-354 gerichtet sind. Dadurch sind mehrere Epitope des Proteins Spastin enthalten, die die Antikörper des Antiserums erkennen können.

Sie können an nicht transfizierten Zellen das endogene Protein Spastin erst nach einer vorangehenden Immunpräzipitation des Proteins und somit dessen Anreicherung bei 68kDa detektieren. In derselben Bandenhöhe kann auch mit transfizierten Zellen das Spastin erkannt werden. Sie stellen die Theorie auf, dass endogenes Protein in so geringer Konzentration vorliegt, dass es nicht detektiert wird (Errico et al. 2004). Svenson et al. 2005 bekräftigen diese Theorie (Svenson et al. 2005), die auch mit den Ergebnissen dieser Arbeit kongruent sind. Eine weitere Bande erkennen Errico et al. 2004 in Zellysaten bei 62kDa, welche durch Peptidpräinkubation spezifisch verschwindet, aber nicht durch Zellen mit transfiziertem Spastin angereichert wird. Bei dieser Bande wird entweder eine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen oder eine Spastinisoform vermutet (Errico et al. 2004).

Svenson et al. 2005 entwickeln ein Antiserum, in dem Antikörper gegen den Peptidabschnitt 308-321 vorhanden sind. Dieser Abschnitt befindet sich außerhalb der AAA-Domäne, MIT-Domäne und auch außerhalb der alternativ spleißenden Exons 4, 8 und

15. Er überlappt mit der NLS 2 (nuclear localisation sequenz), welche sich in dem Aminosäureabschnitt 309-312 im Exon 6 befindet. Sie validieren den Antikörper, indem sie sowohl mit dem entwickelten Antikörper als auch mit einem GFP-Antikörper die gleiche Höhe bei mit GFP-tag transfiziertem Spastin erkennen. Die Bandenhöhe entspricht dem vollständigem Protein (67kDa) addiert mit dem Molekulargewicht des GFP-tag (30kDa). An nicht transfizierten Zelllysaten können sie kein endogenes Spastin nachweisen und nehmen an, dass endogenes Spastin unter der Nachweisgrenze auf dem Western Blot in den Zellen vorhanden ist (Svenson et al. 2005).

Der in dieser Arbeit gewählte Antikörper 1 gegen den Peptidabschnitt 446-459 zeigt bei dem Vergleich von transfizierten Flag-tag-HEK-293-Zellen zu nicht transfizierten Zellen eine Bande mit einem Molekulargewicht bei 68kDa. Dies würde dem theoretisch errechneten Molekulargewicht der vollständigen Proteinisoform mit den 616 Aminosäuren entsprechen von 67kDa, welche mit Flag-tag (ca. 1kDa) verlängert wurde. Ein eingesetzter Flag- Antikörper erkennt in der gleichen Höhe das transfizierte Spastin (s. Abb. 6.8). Eine Detektion von überexprimierten Konstrukten wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, während bei untransfizierten HeLa-Zelle keine Bande dargestellt werden konnte, die eindeutig dem nativen Spastin entspricht. Dies bestätigt die Vermutung, dass Spastin endogen in so geringer Konzentration vorliegt, dass es mittels der Western Blot Methode nicht detektiert werden kann.

Weiterführend könnte zum Nachweis der Detektion von endogenem nativen Spastin eine Anreicherung des Proteins in nativen Zellen durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre dafür die von Errico et al. methodisch beschriebene Immunpräzipitation des endogenen Spastins (Errico et al. 2004).

8 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurden vier Antiseren mit Antikörpern gegen das Protein Spastin charakterisiert.

Dabei konnte das Protein Spastin mittels der Antiseren, welche den Antikörper 2 (A802K) enthalten, nicht detektiert werden, so dass die Empfehlung für den weiteren Einsatz in der Erforschung des Proteins Spastin nicht gegeben werden kann.

Die Färbung des überexprimierten Proteins ist mittels Western Blot durch den Antikörper 1 (A801K) möglich. Natives Spastin kann im Western Blot aus Homogenaten nicht nachgewiesen werden, da es vermutlich unter der Nachweisgrenze für den Western Blot liegt. Eine Erhöhung der Konzentration des endogenen Proteins Spastin z.B. durch Immunpräzipitation würde weiterführend Aufschluss darüber geben.

Bei der Immunzytochemie ist die Färbung des überexprimierten Spastins durch den Antikörper 1 Tier 2 (A801K C7772) gegeben, während Antikörper 1 Tier 1 (A801K TierC7771) das überexprimierte Spastin nicht detektieren kann. Nicht transfizierte Zellen werden in der Immunzytochemie durch die Antikörper nicht angefärbt, so dass natives Spastin nicht nachgewiesen werden kann.

Die Qualität der Ergebnisdarstellung mittels Western Blot und Immunzytochemie wird durch die Aufreinigung des Antiserums über das Spastinpeptid deutlich erhöht, so dass die Verwendung des aufgereinigten Antikörpers für den Einsatz in der weiteren Forschung sinnvoll erscheint.

Die Anwendbarkeit für Antikörper 1 (A801K) ist nur eingeschränkt auf die Detektion von überexprimierten Spastin im Western Blot möglich. Überexprimiertes Spastin wird in der Spastinforschung durch Antikörper dargestellt, die gegen einen an das Spastin gekoppelten Anhang (tag) gerichtet sind. Da die Option besteht, dass der Anhang (tag) das überexprimierte Protein in seiner Struktur verändert, kann diese Möglichkeit durch den Einsatz des Antikörper 1 (A801K) ausgeschlossen werden.

9 Literaturverzeichnis

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

Blumen SC, Bevan S, Abu-Mouch S, Negus D, Kahana M, Inzelberg R, Mazarib A, Mahamid A, Carasso RL, Slor H, Withers D, Nisipeanu P, Navon R, Reid E. 2003. A locus for complicated hereditary spastic Paraplegia maps to Chromosome 1q24-q32. *Ann Neurol* 54:796-803.

Bousslam N, Benomar A, Azzedine H, Bouhouche A, Namewaka M, Klebe S, Charon C, Durr A, Ruberg M, Brice A, Yahyaoui M, Stevanin G. 2005. Mapping a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28). *Ann Neurol* 57: 567-571.

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A. 1998. Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93: 973-983.

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 Gen* 12:71-78.

Cicarelli FD, Proukakis C, Patel H, Cross H, Azam S, Patton MA, Bork P, Crosby AH. 2003. The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia. *Genomics* 81:437-441.

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. *Experimental Cell Research* 309:358-369.

Cole SP, Campling BG, Atlaw T, Kozbor D, Roder JC. 1984. Human monoclonal antibodies. *Mol Cell Biochem* 62(2):109-120.

Crippa F, Panzeri C, Martinuzzi A, Arnoldi A, Redaelli F, Tonelli A, Baschiroto C, Vazza G, Mostacciolo ML, Daga A, Orso G, Profice P, Trabacca A, D'Angelo MG, Comi GP, Galbiati S, Lamperti C, Bonato S, Pandolfo M, Meola G, Musumeci O, Toscano A, Trevisan CP, Bresolin N, Bassi MT. 2006. Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia. *Arch Neurol* 63:750-755.

Dougan DA, Mogk A, Zeth K, Turgay K, Bukau B. 2002. AAA+ proteins and substrate recognition, it all depends on their partner in crime. *FEBS Lett* 529:6-10.

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 NA 14, 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.

Fink JK, Wu CT, Jones SM, Sharp GB, Lange BM, Lesicki A, Reinglass T, Varvil T, Otterud B, Leppert M. 1995. Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q. *Am J Hum Genet* 56:188-192.

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

Fink JK. 2004. Hereditary spastic paraplegia: spastin phenotyp and function. *Arch Neurol* 61:830-833.

Fonknechten N, Mavel D, Byrne P, Davoine CS, Cruaud C, Bonsch D, Samson D, Coutinho P, Hutchinson M, Mc Monagle P, Burgunder JM, Tartaglione A, Heinzlef O, Feki I, Deufel T, Parfrey N, Brice A, Fontaine B, Prud'homme JF, Weissenbach J, Durr A, Hazan J. 2000. Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia. *Hum Mol Genet* 9:637-644.

Fontaine B, Davoine CS, Dürr A, Paternotte C, Feki I, Weissenbach J, Hazan J, Brice A. 2000. A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34. *Am J Hum Genet* 66:702-707.

Goytain A, Hines RM, El-Husseini A, Quamme GA. 2007. NIPA1 (SPG6), the Basis for Autosomal Dominant Form of Hereditary Spastic Paraplegia, Encodes a Functional Mg^{2+} Transporter. *Journal of Biological Chemistry* 282:8060-8068.

Hansen JJ, Durr A, Cournu-Rebeix I, Georgopoulos C, Ang D, Nielsen MN, Davoine CS, Brice A, Fontaine B, Gregersen N, Bross P. 2002. Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60.

Am J Hum Genet 70:1328-1332.

Harding AE. 1981. Hereditary pure spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 44:871-883.

Hazan J, Lamy C, Melki J, Munnich A, de Recondo J, Weissenbach J. 1993. Autosomal dominant familial spastic paraplegia is genetically heterogeneous and one locus maps to chromosome 14q. *Nature Genet* 5:163-167.

Hazan J, Fontaine B, Bruyn RPM, Lamy C, van Deutekom JCT, Rime CS, Dürr A, Melki J, Lyon-Caen O, Agid Y, Munnich A, Padberg GW, de Recondo J, Frants RR, Brice A, Weissenbach J. 1994. Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p. *Hum Mol Genet* 3:1569-1573.

Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, Paternotte C, Samson D, Artiguenave F, Davoine CS, Cruaud C, Dürr A, Wincker P, Brottier P, Cattolico L, Barbe V, Burgunder JM, Prud'homme JF, Brice A, Fontaine B, Heilig R, Weissenbach J. 1999. Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia. *Nat Genet* 23:296-303.

Hedera P, Rainier S, Alvarado D, Zhao X, Williamson J, Otterud B, Leppert M, Fink JK. 1999. Novel locus for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, on chromosome 8q. *Am J Hum Genet* 64: 563-569.

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.

Hodgkinson CA, Bohlega S, Abu-Amero SN, Cupler E, Kambouris M, Meyer BF, Bharucha VA. 2002. A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14. *Neurology* 59:1905-1909.

Hoffman WL, Jump AA, Kelly PJ, Ruggles AO. 1991. Binding of antibodies and other proteins to nitrocellulose in acidic, basic and chaotropic buffers. *Anal Biochem* 198:112-118.

Holländer GA. 2006. *Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis*. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer Verlag.

Hughes CA, Byrne PC, Webb S, McMonagle P, Patterson V, Hutchinson M, Parfrey NA. 2001. SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q. *Neurology* 56:1230-1233.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. 2002. *Immunologie*. Fünfte Aufl. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag.

Jouet M, Rosenthal A, Armstrong G, MacFarlane J, Stevenson R, Paterson J, Metzberg A, Ionasescu V, Temple K, Kenwrick S. 1994. X-linked spastic paraplegia (SPG1), MASA syndrome and X-linked hydrocephalus result from mutations in the L1 gene. *Nature Genet* 7:402-407.

Klebe S, Azzedine H, Durr A, Bastien P, Bouslam N, Elleuch N, Forlani S, Charon C, Koenig M, Melki J, Brice A, Stevanin G. 2006. Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild ataxia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3. *Brain* 126:1456-1462.

Kowit JD, Maloney J. 1982. Protein cleavage by boiling in sodium dodecyl sulfate prior to electrophoresis. *Anal Biochem* 123:86-93.

Kubo K. 1995. Effect of incubation of solutions of proteins containing dodecyl sulfate on the cleavage of peptide bounds in boiling. *Anal Biochem* 225:351-353.

Kurien BT, Scofield RH. 2006. Western blotting. *Methods* 38:283-293.

Lateef SS, Gupta S, Jayathilaka LP, Krishnanchettiar S, Huang JS, Lee BS. 2007. An Improved Protocol for Coupling Synthetic Peptides to Carrier Proteins for Antibody Production Using DMF to Solubilize Peptides. *J of Biomol Tech* 18:173-176.

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

Mc Dermott 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.

McNally FJ, Vale RD. 1993. Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules. *Cell* 75:419-429.

Meijer IA, Cossette P, Roussel J, Benard M, Toupin S, Rouleau GA. 2004. A novel locus for pure hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1. *Ann Neurol* 56: 579-582.

Orlacchio A, Kawarai T, Totaro A, Errico A, George-Hyslop PHS, Rugarli EI, Bernardi G. 2004. Hereditary Spastic Paraplegia: Clinical Genetic Study of 15 Families. *Arch Neurol* 61:849-855.

Orlacchio A, Kawarai T, Gaudiello F, George-Hyslop PHS, Floris R, Bernardi G. 2005. New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1. *Ann Neurol* 58:423-429.

Park SJ, Kim SJ, Rhee Y, Byun JH, Kim SH, Kim MH, Lee EJ, Lim SK. 2007. Fidgetin-like 1 gene inhibited by basic fibroblast growth factor regulates the proliferation and differentiation of osteoblasts. *JBMR* 22(6):889-896.

Patel H, Hart PE, Warner TT, Houlston RS, Patton MA, Jeffery S, Crosby AH. 2001. The Silver syndrome variant of hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 11q12-q14, with evidence for genetic heterogeneity within this subtype. *Am J Hum Genet* 69: 209-215.

Patel H, Cross H, Proukakis C, Hershberger R, Bork P, Ciccarelli FD, Patton MA, McKusick VA, Crosby AH. 2002. SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia. *Nat Genet* 31:347-348.

Patel S, Latterich M. 1998. The AAA team: related ATPases with diverse functions. *Trends Cell Biology* 8:65-71.

Polo JM, Calleja J, Combarros O, Berciano J. 1993. Hereditary "pure" spastic paraplegia: a study of nine families. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56 :175-181.

Rainier S, Chai JH, Tokarz D, Nicholls RD, Fink JK. 2003. NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6). *Am J Hum Genet* 73: 967-971.

Reid E, Connell J, Edwards TL, Duley S, Brown SE, 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.

Reid E. 1999. The hereditary spastic paraplegias. *J Neurol* 246:995-1003.

Reid E, Dearlove AM, Rhodes M, Rubinsztein DC. 1999. A new locus for autosomal dominant 'pure' hereditary spastic paraplegia mapping to chromosome 12q13, and evidence for further genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 65: 757-763.

Reid E, Dearlove AM, Osborn O, Rogers MT, Rubinsztein DC. 2000. A locus for autosomal dominant 'pure' hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13. *Am J Hum Genet* 66:728-732.

Reid E. 2003. Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias. *J Med Genet* 40:81-86.

Roll-Mecak A, Vale RD. 2005. The Drosophila Homologue of the Hereditary Spastic Paraplegia Protein, Spastin, Severs and Disassembles Microtubules. *Current Biology* 15:650-655.

Roll-Mecak A, Vale RD. 2008. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. *Nature* 451: 363-367.

Sanderson CM, Connell JW, Edwards TL, Bright NA, Duley S, Thompson A, Luzio JP, Reid E. 2006. Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners. *Human Molecular Genetics* 15:307-318.

Sasse AC. 2005. Analyse der Lokalisation von Spastin (SPG4) in Wirbeltierzellen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

Saugier-Weber P, Munnich A, Bonneau D, Rozet JM, Le Merrer M, Gil R, Boespflug-Tanguy O. 1994. X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus. *Nature Genet* 6:257-262.

Sauter S, Neesen J, Paulus W, Engel W. 2002. Hereditäre spastische Paraplegie. *Dtsch Arztebl* 99:A434-440.

Schecklies E. 1996. Polyklonale Antikörper; Eine Einführung in die Theorie und Praxis der Antikörperherstellung. Weinheim, VCH.

Seri M, Cusano R, Forabosco P, Cinti R, Caroli F, Picco P, Bini R, Morra VB, De Michele G, Lerone M, Silengo M, Pela I, Borrone C, Romeo G, Devoto M. 1999. Genetic mapping to 10q23.3-q24.2, in a large Italian pedigree, of a new syndrome showing bilateral cataracts, gastroesophageal reflux, and spastic paraparesis with amyotrophy. *Am J Hum Genet* 64: 586-593.

Simpson MA, Cross H, Proukakis C, Pryde A, Hershberger R, Chatonnet A, Patton MA, Crosby AH. 2003. Maspardin is mutated in Mast Syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia. *Am J Genet* 73: 1147-1156.

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

Strümpell A. 1880. Beiträge zur Pathologie des Rückenmarks. *Arch Psychiatr Nervenkr* 10:676-717.

Svenson IK, Kloos MT, Jacon A, Gallione C, Horton AC, Pericak-Vance MA, Ehlers MD, Marchuk DA. 2005. Subcellular localization of spastin: implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia. *Neurogenetics* 6:135-141.

Tamagaki A, Shima M, Tomita R, Okumura M, Shibata M, Morichika S, Kurahashi H, Giddings JC, Yoshioka A, Yokobayashi Y. 2000. Segregation of a pure form of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2. *Am J Med Genet* 94: 5-8.

Trotta N, Orso G, Rosetto 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.

Vajjhala PR, Catchpoole E, Nguyen CH, Kistler C, Munn AL. 2007. Vps4 regulates a subset of protein interactions at the multivesicular endosome. *FEBS Journal* 274:1894-1907.

Valente EM, Brancati F, Caputo V, Bertini E, Patrono C, Costanti D, Dallapiccola B. 2002. Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34. *Ann Neurol* 51: 681-685.

Vazza G, Zortea M, Boaretto F, Micaglio GF, Sartori V, Mostacciolo ML. 2000. A new locus for autosomal recessive spastic paraplegia associated with mental retardation and distal motor neuropathy, SPG14, maps to chromosome 3q27-q28. *Am J Hum Genet* 67: 504-509.

Werdelin L. 1986. Hereditary ataxias: Occurrence and clinical features. *Acta Neurol Scand* 73 (Suppl. 106) 124.

Wharton SB, Mc Dermott 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 spastin gene. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1166-1177.

White SR, Evans KJ, Lary J, Cole JL, Luring B. 2007. Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing. *JCB*

176: 995-1005.

Wilkinson PA, Simpson MA, Bastaki L, Patel H, Reed JA, Kalidas K, Samilchuk E, Khan R, Warner TT, Crosby AH. 2005. A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14. *J Med Genet* 42:80-82.

Zortea M, Vettori A, Trevisan CP, Bellini S, Vazza G, Armani M, Simonati A, Mostacciolo ML. 2002. Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1. *J Med Genet* 39:387-390.

Züchner S, Kail ME, Nance MA, Gaskell PC, Svenson IK, Marchuk DA, Pericad-Vance MA, Ashley-Koch AE. 2006. A new locus for dominant hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 2p12. *Neurogenetics* 7: 127-129.

10 Anhang

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Deufel ganz herzlich für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Thema erforschen zu können und dafür persönliche Unterstützung erhalten zu haben. Ganz besonders hilfreich war dabei die Erlaubnis die Arbeitsräume und das Material der Forschungsabteilung der Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin Jena nutzen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt dabei auch dem sehr netten und aufgeschlossenen Forschungsteam für den Beistand zur Lösung von kniffligen Fragen und nicht zuletzt für den Einsatz bei der Materialbeschaffung.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bedanken bei Frau Dr. Claudia Frömmel, Herrn Torsten Pamminger und Herrn Dr. Christian Beetz für die konstruktiven Ratschläge während der Entstehung dieser Arbeit. In diesem Zusammenhang möchte ich auch PD Dr. Hemmerich und Dr. Jörg Müller danken.

Mein besonderer Dank gilt allen Freunden und Menschen, die mich während dieser Arbeit begleitet haben und mir immer wieder mit wertvollen Hinweisen weitergeholfen haben.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern bedanken, die mir immer wieder aufmunternd zur Seite gestanden haben. Mein extra Dank gilt meinem Bruder, der bei allen computertechnischen Fragen eine exzellente Antwort fand.

Vielen lieben Dank.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. Thomas Deufel, Dr. Claudia Frömmel, Torsten Pamminger, Dr. Christian Beetz, PD Dr. Hemmerich,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 24.06.2008