

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Physik-Department, Lehrstuhl für Biophysik E22

**Kinetische und strukturelle Untersuchung
der beiden Mikrotubuli-schneidenden
Enzyme Spastin und Katanin**

Thomas Eckert

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Physik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Martin Zacharias

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. Günther Woehlke
2. Univ.-Prof. Dr. Thorsten Hugel

Die Dissertation wurde am 16.08.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 19.10.2012 angenommen.

Für meine lieben Eltern

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

Max Planck (1918)

Publikationen

Eckert, T., Le, D. T., Link, S., Friedberg, L., & Woehlke, G. (2012). Spastin's Microtubule-Binding Properties and Comparison to Katanin. PLoS ONE, *in press*.

Eckert, T., Link, S., Le, D. T., Sobczak, J. P., Gieseke, A., Richter, K., & Woehlke, G. (2012). Subunit Interactions and Cooperativity in the Microtubule-severing AAA ATPase Spastin. J Biol Chem, 287(31), 26278-26290.

Herrmann, J. R., Fuchs, A., Panitz, J. C., **Eckert, T.**, Unterreitmeier, S., Frishman, D., & Langosch, D. (2010). Ionic interactions promote transmembrane helix-helix association depending on sequence context. J Mol Biol, 396(2), 452-461.

Posterpräsentationen

Mai 2012

EMBO Conference Series Microtubules - Structure, Regulation and Functions

EMBL Heidelberg, Germany

"Spastin-Microtubule Interactions"

Juli 2011

DGZ/FEBS Workshop. The spider's web: how microtubules organize cellular space; Potsdam, Germany

"Subunit Interactions and Cooperativity in the Microtubule-Severing AAA ATPase Spastin"

Juni 2010

EMBO Conference Series Microtubules - Structure, Regulation and Functions

EMBL Heidelberg, Germany

"Subunit Interactions and Cooperativity in the Microtubule-Severing AAA ATPase Spastin"

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig durchgeführt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

München, den 13.08.2012
(Ort, Datum)

.....
(Thomas Eckert)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....VIII

Zusammenfassung (Abstract).....X

I Materialien und Methoden

I.1 Materialien 1

I.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien 1

I.1.2 Antikörper 4

I.1.3 Enzyme 4

I.1.4 Farbstoffe 5

I.1.5 Kits und Marker..... 5

I.1.6 Medien für die Kultivierung von *E.coli*-Zellen und Sf9-Insektenzellen..... 5

I.1.7 Plasmide 5

I.1.8 Primer 6

I.1.9 Reagenzien 7

I.1.10 Software für Daten-Evaluierung 9

I.1.11 Zellstämme 9

I.2 Molekularbiologische Methoden 10

I.2.1 Agarose-Gelelektrophorese10

I.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)10

I.2.3 Isolierung von DNA via QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)11

I.2.4 Aufreinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick® Gel-Extraktions Kits
(Qiagen).....11

I.2.5 Restriktionsverdau der DNA12

I.2.6 Ligation des DNA-Inserts in einen Vektor.....12

I.2.7 Transformation in chemisch-kompetente *E.coli* DH5- α und BL21-Zellen .12

I.3 Proteinchemische Methoden 13

I.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)13

I.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....14

I.3.3 TCA-Präzipitation von Proteinen15

I.3.4 *Cross-Linking* Studien zur Analyse des Oligomerisierungsgrads15

I.3.5 Extraktion von Tubulin aus Schweinehirn.....	16
I.3.6 Polymerisation von Mikrotubuli	17
I.3.7 Kovalente Modifikation von Tubulin mit Fluorophoren	18
I.3.8 Herstellung von segmentierten und polaritätsmarkierten Mikrotubuli.....	20
I.3.8.1 Guanidin-5'-[(α,β)-Methyleno]-Triphosphat (GMPCPP) Polymerisation	20
I.3.9 Subtilisin-Verdau von Mikrotubuli	22
I.3.10 Herstellung von hybriden Mikrotubuli	23
I.3.11 Cosedimentationsexperimente	23
I.4 Analytische Methoden	24
I.4.1 Messungen mit dem Spektralphotometer.....	24
I.4.1.1 ATPase-Messungen.....	25
I.4.1.2 Lichtstreu-Experimente	27
I.4.2 Fluoreszenzmikroskopie.....	28
I.4.2.1 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)	28
I.4.2.2 Einzelmolekülmessungen und <i>Severing</i> -Studien	29
I.4.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM).....	33
I.4.3.1 Herstellung von EM-Proben und Datenauswertung	34
I.5 Abbildungsverzeichnis	35
I.6 Literaturverzeichnis	35
II Einleitung	
II.1 <i>Severing</i> von Mikrotubuli.....	36
II.1.1 Mikrotubuli-schneidende Enzyme	37
II.2 AAA-Proteine	38
II.2.1 Konservierte Funktionen der AAA-Domäne	38
II.2.2 Zellbiologische Funktionen der AAA-Proteine.....	40
II.2.2.1 <i>Recycling</i>	40
II.2.2.2 Qualitätskontrolle.....	41
II.2.2.3 Mikrotubuli-assoziierte AAA-Proteine	43
II.2.3 Modelle für die Koordination der Untereinheiten	44
II.2.4 Regulation der AAA-Proteine: Adapter-Proteine	45

II.2.5 AAA-Proteine und Krankheiten.....	45
II.3 Hereditäre spastische Paraplegie (HSP).....	47
II.3.1 Klinisches Bild.....	47
II.3.2 Autosomal-dominante HSP.....	48
II.3.3 Autosomal-rezessive HSP	49
II.3.4 X-gebundene HSP	49
II.4 Mikrotubuli	50
II.4.1 Aufbau von Mikrotubuli.....	50
II.4.2 Dynamische Instabilität der Mikrotubuli.....	51
II.4.3 Regulatoren für die dynamische Instabilität der Mikrotubuli	53
II.5 Abbildungsverzeichnis.....	54
II.6 Literaturverzeichnis	54
III Spastin-Projekt	
III.1 Einleitung	63
III.1.1 Struktur von Spastin.....	63
III.1.2 Mutationen im Gen SPG4.....	64
III.1.3 Die Lokalisation von Spastin in der Zelle	65
III.1.4 Mechanismus des Mikrotubuli- <i>Severing</i> Prozesses.....	66
III.1.5 Zielsetzung	68
III.2 Ergebnisse – Kinetik.....	69
III.2.1 Interaktion von Spastin mit Mikrotubuli	69
III.2.2 Einsatz von ATP-Analoga: ATP- γ S und AMPPNP	73
III.2.3 Auswirkung mutierter Untereinheiten auf die Aktivität von	
Wildtyp-Spastin	76
III.2.4 Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und <i>Severing</i> -Aktivität.....	80
III.2.5 Oligomerisierung von Spastin.....	82
III.3 Ergebnisse – Strukturelle Analyse	86
III.3.1 Herstellung der Spastin-Konstrukte und Proteinexpression	86

III.3.2 Insertion von Spastin und GFP in den pGEX6P2-Vektor.....	87
III.3.3 Aufreinigung der Spastin-Fusionskonstrukte	88
III.3.4 Bewegung von GFP-Spastin am Mikrotubulus.....	89
III.3.5 Konzentrationsabhängigkeit der GFP-Spastin <i>Severing</i> -Aktivität.....	91
III.3.6 Elektrostatische-Interaktionsstudien.....	94
III.3.7 Einfluss von Ionen auf den Bindevorgang	95
III.3.8 Einfluss geladener Aminosäuren auf die Mikrotubuli-Bindung	97
III.3.9 Spastin erkennt Defekte im Mikrotubulus	99
III.3.10 Morphologie geschnittener Mikrotubuli	101
III.3.11 Nukleotid-Abhängigkeit der Bindung, Bewegung und Hexamerisierung von Spastin.....	102
III.3.12 Detektion möglicher Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess von Spastin	105
III.3.13 Oligomerisierungs- und ATPase-Studien künstlicher Dimere.....	109
III.4 Methoden; Spastin-Projekt.....	113
III.4.1 <i>Primer</i> für Amplifikationen	113
III.4.2 Proteinexpression im bakteriellen System und Aufreinigung	114
III.4.2.1 Expression und Proteinaufreinigung	114
III.4.2.2 Kationenaustauscher-Chromatographie	115
III.4.2.3 Abspaltung des Affinitäts- <i>Tags</i>	115
III.4.3 Chemische Konjugation von Proteinen mit Fluorophoren	116
III.4.4 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)	117
III.4.4.1 Probenvorbereitung.....	119
III.4.5 Kooperativität der Oligomerisierung	119
III.4.5.1 Oligomerisierungsgleichgewicht.....	119
III.4.5.2 <i>Steady-State</i> ATPase-Kinetik	120
III.4.5.3 Inhibition durch Substrat-Analoga	121
III.4.5.4 Mutanten-Inhibition.....	122
III.4.5.5 Alternatives Modell.....	124
III.4.6 <i>Dm</i> Kinesin-1 <i>Neck Coiled-Coil</i> (<i>DmK1cc</i>).....	125
III.4.6.1 Vergleich der Verhaltensweisen von <i>Coiled-Coil</i> Spastin mit <i>delta227</i> -Spastin.....	126
III.5 Abbildungsverzeichnis	126
III.6 Literaturverzeichnis	128

IV Katanin-Projekt

IV.1 Einleitung	132
IV.1.2 Aufbau und Mechanismus von Katanin	132
IV.1.3 Funktion von Katanin innerhalb der Zelle	133
IV.1.3.1 Katanin in <i>Caenorhabditis elegans</i> Meiose	133
IV.1.3.2 Katanin im Nervensystem	134
IV.1.3.3 Mikrotubuli-Severing in der Zellmigration	135
IV.1.3.4 Katanin in höheren Pflanzen	136
IV.1.4 Zielsetzung	137
IV.2 Ergebnisse – Domänen-Mapping	138
IV.2.1 Herstellung der Katanin-Konstrukte und Proteinexpression	138
IV.2.2 Insertion von Katanin und GFP in den pFastBac™ 1-Vektor	139
IV.2.3 Herstellung des rekombinanten Bacmid-Plasmids	140
IV.2.4 Aufreinigung der Katanin-Fusionskonstrukte	141
IV.2.5 Identifikation der Mikrotubuli-bindenden Domäne von humanem Katanin	141
IV.2.6 Oligomerisierung der generierten <i>Kat</i> -Konstrukte	145
IV.2.7 ATPase-Raten und Mikrotubuli-Severing Aktivität der <i>Kat</i> -Konstrukte	147
IV.3 Ergebnisse – Strukturelle Analyse	149
IV.3.1 Bewegung von GFP-Katanin am Mikrotubulus	149
IV.3.2 Severing durch GFP-Katanin	150
IV.3.3 Mikrotubuli-Depolymerisation	153
IV.3.4 Elektrostatische Interaktionsstudien	155
IV.3.5 Einfluss von Salzen auf den Bindevorgang	156
IV.3.6 Katanin hat eine Präferenz für GTP-Tubulin	158
IV.3.7 Morphologie geschnittener und depolymerisierter Mikrotubuli	160
IV.3.8 Einfluss von Nukleotiden auf Bindung, Bewegung und Hexamerisierung von Katanin	161
IV.3.9 Detektion möglicher Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess von Katanin	166
IV.4 Methoden; Katanin-Projekt	168
IV.4.1 Primer für Amplifikationen	168

IV.4.2 <i>Primer</i> für die PCR Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA.....	170
IV.4.3 Einführung von Punktmutationen	170
IV.4.3.1 PCR-Ansatz und verwendetes Zyklus-Programm.....	171
IV.4.4 Proteinexpression im Baculovirus-Expressionssystem	171
IV.4.4.1 Vorteile des Baculovirus Protein-Expressionssystems	171
IV.4.4.2 Das Baculovirus-Expressionssystem	172
IV.4.4.3 Transposition.....	175
IV.4.4.4 Transfektion der SF9-Zellen mit der rekombinanten Plasmid-DNA	176
IV.4.4.5 Proteinaufreinigung	178
IV.4.5 Analytische Gelfiltration	180
IV.4.6 <i>Western-Blot</i>	180
IV.5 Abbildungsverzeichnis	182
IV.6 Literaturverzeichnis	183
V Gekoppelte Diskussion	
V.1 Kinetik	186
V.2 Analyse der generierten Katanin-Domänen	188
V.3 Einzelmolekülmessungen mit GFP-Spastin und GFP-Katanin	189
V.3.1 Bewegung von Spastin und Katanin am Mikrotubulus.....	190
V.3.2 Spastin erkennt Defekte im Mikrotubulus.....	191
V.3.3 Depolymerisationsverhalten von Katanin	192
V.3.4 Bedeutung des <i>E-Hooks</i> für die Interaktion von Katanin mit Mikrotubuli	194
V.3.5 Einfluss einer Lysin-Triade (MTBD-Domäne) auf die Spastin/MT-Bindung	195
V.3.6 Einfluss der Ionenstärke auf die Binderate und Binfrequenz.....	196
V.3.7 Analyse der detektierten Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess	198
V.4 Interpretation der katalytischen Parameter für <i>Coiled-Coil</i> Spastin	202
V.4.1 Interaktions- und Oligomerisierungsmodell für Spastin	206

V.5 Vergleich zwischen Spastin- und Katanin-ATPase Aktivität	208
V.6 Abbildungsverzeichnis	211
V.7 Literaturverzeichnis	211
VI Appendix	
VI.1 Danksagung	214
VI.2 Lebenslauf.....	215

Abkürzungsverzeichnis

Å	Angstrom
AAA	<i>ATPases associated with various cellular activities</i>
AS	Aminosäure
AUZ	Analytische Ultrazentrifuge
°C	Grad Celcius
AMPPNP	Adenosin-5'-(β,γ -Imido)-Triphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP- γ S	Adenosin-5'-(γ -Thio)-Triphosphat
c	Konzentration
Carb	Carbenicillin
cc	<i>Coiled-Coil</i>
dNTP	2-Desoxynukleotid-5'-Triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDAC	1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid Hydrochlorid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
Genta	Gentamicin
GMPCPP	Guanidin-5'-[(α,β)-Methyleno]-Triphosphat
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinoethan-Sulfonsäure
HSP	Hereditäre spastische Paraplegie
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactose
Kana	Kanamycin
kb	Kilo-Basenpaare
k_{cat}	Katalytische Aktivität
l	Liter
LB	Luria-Bertani
min	Minute
MAPS	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MSD	<i>Mean Squared Displacement</i>

MT	Mikrotubuli
M_w	Molekulargewicht
MWCO	Molekulargewichts-Ausschlussgrenze
NaOH	Natronlauge
NEM	N-Ethylenmaleimid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
nm	Nanometer
N-Terminus	Aminoende einer Polypeptidkette
OD	Optische Dichte
PIPES	1,4-Piperazinediethan-Sulfonsäure
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
<i>Pwo</i>	<i>Pyrococcus woesei</i>
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
<i>Sf</i>	<i>Spodoptera frugiperda</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TCEP	Tris-(2-Chlorethyl)-Phosphat
Tetra	Tetrazyclin
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-Diamin
TIRF	Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie
T_M	Schmelztemperatur
U	Internationale Einheit
UZ	Ultrazentrifuge
V	Volt
v_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen

Zusammenfassung

Mikrotubuli sind mechanisch stabile Strukturen des eukaryotischen Zytoskeletts. Verschiedene zelluläre Prozesse erfordern den Umbau von Mikrotubuli-Filamenten. Ein Weg hierfür stellt deren Spaltung dar. Es sind drei Typen von Enzymen bekannt, die Mikrotubuli zerlegen können: Katanin, Spastin und Fidgetin. Der biophysikalische Mechanismus, durch den diese Enzyme ihre mechanische Wirkung erzielen, ist bisher stark hypothetisch. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die kinetischen und strukturellen Grundlagen für die Klärung des Schneidevorgangs zu untersuchen.

Gegenstand dieser Arbeit waren die Enzyme Spastin und Katanin, die, analog zu Fidgetin, hexamere Ringstrukturen ausbilden können. Sie gehören zur Familie der AAA-ATPasen. Aus bisherigen Publikationen war bekannt, dass andere AAA-ATPasen kooperatives Verhalten zeigen. Für Mikrotubuli-spaltende Enzyme gab es keinerlei Untersuchungen darüber, ob und wie sich die Untereinheiten kinetisch beeinflussen und in welcher Form die Assemblierung der Untereinheiten wichtig für die Funktion ist. Um diese Fragen zu beantworten, wurde (i) die Inhibition der enzymatischen Aktivität von Spastin durch ATP-Analoga charakterisiert, (ii) die Kooperativität in Hill-Plots untersucht und (iii) der Einfluss inaktiver Mutanten auf die Aktivität von Wildtyp ermittelt. In allen drei Fällen zeigte sich, dass (mindestens) zwei Untereinheiten kinetisch gekoppelt sind.

Neben der enzymatischen Aktivität wurde auch die mechanische *Severing*-Aktivität zur Charakterisierung von Spastin und Katanin herangezogen. Hierfür wurde ein fluoreszenzbasierter mikroskopischer Test etabliert. Es zeigte sich, dass die spaltende Aktivität in zwei Phasen erfolgt: einer anfänglichen Warte-Phase, in der die Mikrotubuli scheinbar unversehrt bleiben, und einer Phase, in der die Filamente innerhalb kurzer Zeit brechen. Interessanterweise wurden in dieser Studie für Spastin nur interne Brüche beobachtet, während Katanin unter bestimmten Bedingungen zusätzlich die Mikrotubuli-Enden verkürzen konnte.

Um zu kontrollieren, ob Spastin und Katanin tatsächlich Ringe aus sechs Untereinheiten bilden, wurden *Cross-Linking* Experimente und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Es zeigte sich, dass Oligomere nur transient vorliegen und derart kurzlebig sind, dass sie nicht nachweisbar waren. Nur mit einer Walker B-Mutante und in Gegenwart von ATP konnte der hexamere Zustand stabilisiert und in EM- und *Cross-Linking*-Experimenten bestätigt werden. Zusätzlich zum Spastin-Hexamere wurde ein dimerer Zustand gefunden, der vermutlich ein Assemblierungsintermediat darstellt. Für Katanin wurden sehr ähnliche Oligomerisierungseigenschaften gefunden, mit dem Unterschied, dass als Intermediat ein Trimer auftrat. Dies könnte damit im Zusammenhang stehen, dass die N-terminalen Bereiche von Spastin und Katanin nicht homolog sind. In Einklang hiermit konnte gezeigt werden, dass der N-terminale Abschnitt von Katanin zur Ausbildung von Trimeren befähigt ist.

Für beide Enzyme wurde die Mikrotubuli-Interaktion auf biochemischer und mikroskopischer Einzelmolekülebene untersucht. In Cosedimentationsexperimenten war die Bindung von Enzym an Mikrotubuli unabhängig vom eingesetzten Nukleotid, der Oligomerisierungsgrad erhöhte sich jedoch in Gegenwart von ATP-Analoga. Auf Einzelmolekülebene wurden ionische Wechselwirkungen mit Mikrotubuli nachgewiesen. Im Anschluss daran konnte eine diffusive Bewegung der Enzyme entlang der Filament-Längsachse beobachtet werden. Für humanes Spastin war die Filament-Bindung strikt abhängig von einer Triade basischer Aminosäuren, die außerhalb der katalytischen Domäne lokalisiert ist.

Abstract

Microtubules are mechanically stable structures of the eukaryotic cytoskeleton. Various cellular processes are dependent on the reorganization of microtubule filaments. One way of doing this is through microtubule severing. Three classes of enzymes are known to be able to disassemble microtubules: katanin, spastin and fidgetin. However, the biophysical mechanism underlying the functionality of these enzymes is barely understood. The objective of this study therefore was to shed light on the kinetic and structural principles of the severing process.

This investigation focusses on the enzymes spastin and katanin which, analogous to fidgetin, are able to form hexameric structures. They belong to the AAA-ATPase family of proteins. Based on earlier publications it is known that numerous AAA-proteins are highly cooperative. For microtubule severing proteins, however, no such information is present to date. As a consequence it is not known whether their subunits affect each other kinetically and if so, how this is achieved. Furthermore, the question arises to what extent assembly of the subunits is important in terms of protein function. To address these questions I

(i) characterized the inhibition of spastin's enzymatic activity using diverse ATP-analogues

(ii) investigated the cooperativity via Hill plots and

(iii) evaluated the effect of inactive mutant subunits on the activity of wildtype protein.

All three approaches led to the conclusion that (at least) two subunits are being kinetically coupled to each other.

Apart from the enzymatic activity I also characterized the mechanical severing activity of spastin and katanin. To this end a fluorescent based enzymatic assay was established. It turned out that the severing activity process can be divided into two stages, an initial lag phase in which the microtubules appear to remain uncut, and a second stage in which the filaments were found to be severed within a short period of time. Interestingly, in the case of spastin only internal breaks were observed whereas katanin was also able to shorten microtubule ends under certain conditions.

To find out whether or not katanin and spastin form rings made up of six subunits I carried out cross-linking experiments and electron microscopic investigations. Thereby I found that the oligomers exist only transiently, being thus short-lived that I wasn't able to detect them. Only a Walker B mutant in the presence of ATP turned out to stabilize the hexameric state, as was confirmed by EM and cross-linking experiments. In addition to the spastin hexamer a dimeric state was observed, which probably represents an assembly intermediate. Katanin's oligomerization behaviour was found to be similar to that of spastin except for a trimer being observed as an intermediate-state. This finding could be a result of the non-homologous N-terminal sections of spastin

and katanin, which would be in accordance to the observation that the N-terminus of katanin is capable of forming trimers.

Finally, microtubule interaction studies were performed on both enzymes. Cosedimentation experiments indicate that the interaction with microtubules does not depend on the nucleotide applied, even though the extent of oligomerization increased in the presence of ATP analogues. By means of single molecule microscopy I was able to observe ionic bonding interactions between the enzymes and microtubules. Subsequently, the proteins were found to diffuse along the filaments longitudinal axis. In case of human spastin the filament binding was strictly dependent on the presence of a triad comprised of basic residues being located beyond the catalytic domain.

I Materialien und Methoden

I.1 Materialien

I.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Allgemeine Arbeitsmittel

6-Well Kultur-Platte	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
15 ml bzw. 50 ml Falcon™ Röhrchen	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Chromatographie-Säulenmaterial	GE Healthcare, Freiburg
Deckgläser 18x18 mm / 24x60 mm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Einmalspritzen (steril) Injekt 2 ml, 5 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Erlenmeyerkolben Duran 100, 500, 1000 ml	Schott AG, Mainz
Filtereinheiten für Einmalspritzen (steril) Filtropur S 0,22	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Geltrocknungsfolien	Promega
Kanülen (steril)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Karbon-Gitter	Electron Microscope Sciences, Hatfield, Pennsylvania, U.S.A.
Kolbenhub-Pipetten 2, 10, 20, 100, 200, 1000 µl	Gilson, Middleton, U.S.A.
Neubauer Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pipettenspitzen 10, 200, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
PVDF-Membran	Millipore, Darmstadt
Reaktionsgefäße 0.5, 1, 2 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Serologische Pipetten 1, 5, 10, 20 ml	Sarstedt AG & Co., Nürnbrecht
Latex-Untersuchungshandschuhe Nitril Untersuchungshandschuhe	HPC Healthline, Morden, UK Meditrade, Kiefersfelden
Vivaspin-Konzentratoren MWCO 10, 30, 50-kDa	Sartorius, Göttingen

FPLC-Anlage

ÄKTA-Purifier

GE Healthcare, Freiburg

Gelelektrophoresekammern

Agarosegelelektrophorese-Kammer

Renner GmbH, Dannstadt

Proteingel-Gießstand, Kammer

Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Inkubatoren

CO2 Brutschrank INCOmed

Memmert, Schwabach

Platteninkubator INCU-Line

VWR, Darmstadt

Schüttelinkubator 37°C

Edmund Bühler GmbH, Hechingen

Schüttelinkubator innova 44

New Brunswick Scientific GmbH,
Nürtingen

Tischschüttler CERTOMAT® IS

Sartorius, Göttingen

Kühl- und Gefriergeräte

Herafreeze HFU-Basic Serie

Heraeus, Hanau

Premium U570

New Brunswick Scientific GmbH,
Nürtingen

Mikroskope

CM 100 Transmissionselektronen-
Mikroskop

Philips, Hamburg

TIRF-IX71

Olympus, Hamburg

Küvetten

Halbmikroküvetten

VWR, Darmstadt

Präzisionsküvetten 105.202-QS

Hellma, Müllheim

Photometer

DU® 730 UV/Vis Spektrophotometer	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
NanoDrop ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
UV/Vis Spektrometer Lamda 25	PerkinElmer, Waltham, U.S.A.

Spannungsgeräte

LNG-350	Heinzinger, Rosenheim
Novex PowerEase500	Invitrogen, Karlsruhe

Thermozykler

Advanced Primus 25	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Masterycler Personal	Eppendorf, Hamburg

Waagen

Präzisionswaage CPA1003S	Sartorius, Göttingen
Precisa XR 125SM	Precisa Gravimetrics AG, Dietikon, Schweiz

Wasserbäder

Lauda Ecoline	Lauda, Königshofen
WBT-6	Medingen, Arnsdorf

Wasserfilteranlagen

Barnstead EASYpure II®	Thermo Scientific, Rockford, IL., U.S.A.
Milli-Q Plus	Millipore GmbH, Schwalbach

Zellaufschluss

French® Pressure Cell Press	Fisher Scientific, Schwerte
-----------------------------	-----------------------------

Zentrifugen

Avanti® J-E	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Optima™ L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Optima™ MAX-XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
PerfectSpin 24 R Mikrokühlzentrifuge	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
ProteomLab XL-A	Beckman Coulter, Fullerton, U.S.A.
Rotanta 460 R	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg

I.1.2 Antikörper

Anti-β-Tubulin Antikörper	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Anti-FLAG® Antikörper	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Anti-GFP Antikörper	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Anti-Kanichen IgG	Thermo Scientific, Rockford, IL., U.S.A.

I.1.3 Enzyme

<i>Bam</i> H1	New England Biolabs, Schwalbach
Catalase	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
<i>Nco</i> I	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Not</i> I	New England Biolabs, Schwalbach
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Phusion™ Hot Start High Fidelity	Finnzymes, Espoo, Finnland
PreScission-Protease	GE Healthcare, Freiburg
Pyruvat-Kinase/Laktat-Dehydrogenase Enzym-Mix	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
<i>Pwo</i> -Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Quick Ligase	New England Biolabs, Schwalbach

I.1.4 Farbstoffe

ALEXA Fluor® 555

Invitrogen, Karlsruhe

ATTO 488

ATTO-TEC GmbH, Siegen

I.1.5 Kits und Marker

2-Log DNA Leiter (0,1–10 kb)

New England Biolabs, Schwalbach

Bradford-Reagenz

Bio-Rad, München

Broad Range Marker (6,5–200 kDa)

Bio-Rad, München

ColorPlus Protein Marker (7–175 kDa)

New England Biolabs, Schwalbach

DNA-Auftragspuffer

New England Biolabs, Schwalbach

HMW/LMW Kalibrierungs-Kit

GE Healthcare, Freiburg

Plasmid Mini Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAquick® Gel-Extraction Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QIAquick® PCR-Purification Kit

Qiagen GmbH, Hilden

QuikChange® Multi Site-Directed
Mutagenesis Kit

Stratagene, Waldbronn

I.1.6 Medien für die Kultivierung von *E.coli*-Zellen und Sf9-Insektenzellen

LB-Agar

10 g/l Agar in LB-Medium

LB-Medium

10 g/l Bacto™ Trypton, 5 g/l Bacto™ Hefeextrakt, 10 g/l NaCl

Das Medium wurde auf pH 7.2 eingestellt und 20 Minuten bei 121°C autoklaviert

Sf-900 II SFM (Invitrogen, Karlsruhe)

I.1.7 Plasmide

pEGFP

Clontech, Saint-Germain-en-Laye,
Frankreich

pFastBac™1

Invitrogen, Freiburg

pGEX6P2

GE Healthcare, Freiburg

I.1.8 Primer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Biomers (HPLC-Qualität) synthetisiert. Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Name	Sequenz (5' → 3')
KKCK_Spastin_pGEX6P2 #fw	AATAAT <u>GGATCCA</u> AGAAATGCAAGATGAGTGGAGCTGTTCCA AAAAGAAAAGACCCCTTAACACAC
KKCK_Spastin_pGEX6P2 #rv	AATAAT <u>GCGGCCGC</u> CTATCTCAAACAGTGGTATCTCCAAAGT CCTTGTTCCAACGTATGTACGC
GFP_pGEX6P2 #fw	AATAAT <u>GGATCC</u> GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
GFP_pGEX6P2 #rv	CCTGCG <u>GGATCC</u> GGGTGCTCCTGGTGCTCCCTTGTACAGCT CGTCCATGCCGAGAGTGATCC
Hs_MTBD #fw	GAAGA <u>ACCATGG</u> AAAGCGGACTGTCAATGG
Hs_MTBD #rv	GAAGA <u>AGGATCC</u> TTAATCAGATTCGCCAGATTTG
FLKatanin_pfastBac1 #fw	AATAAT <u>GGATCC</u> ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAA GAAATGCAAGTCTTTACTTATGATTTTCAGAAAACGTTAAATTA GCACGG
FLKatanin_pfastBac1 #rv	AATAAT <u>GCGGCCGC</u> CCTAACAAGAACCGAATTCGAAAATCCAT TTTTCGTAACG
GFP_pFastBac1 #fw	AATAAT <u>GGATCC</u> ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC
GFP_pFastBac1 #rv	CCTGCG <u>GGATCC</u> GGGTGCTCCTGGTGCTCCCTTGTACAGCT CGTCCATGCCGAGAGTGATCC
M13 #fw	GTTTTCCCAGTCACGAC
M13 #rv	CAGGAAACAGCTATGAC
Katanin_E309Q #fw	GCCACAATATTCATTGACCAAATTGATTCTGATCTGC
Katanin_E309Q #rv	GCAGATCGAATCAATCAATTTGGTCAATGAATATTGTGGC
Katanin_AS55 #rv	AATAAT <u>CGCCGGCG</u> CTACACCTGCTGCCATTTCTGTTGCAAG TATGTATCCTTC
Katanin_AS56 #fw	AATAAT <u>GGATCC</u> ATGGATTACAAGGATGACGACGATTGGCA GGAGATAAATGTGGAAGCCAAGCATGTCAAGGATATC
Katanin_AS180 #rv	AATAAT <u>CGCCGGCG</u> CTAGTTGGTTTCTGGTTCCGGTTACCGCT GCAGGAGACTTG
Katanin_AS181 #fw	AATAAT <u>GGATCC</u> ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAATTC GATTC AACGGTTATGATAAAGATCTTGAGGC

I.1.9 Reagenzien

2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
ANTI-FLAG® M2-Affinitätsgel	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Acrylamid-Lösung (30%) Mix 30:0,8 für Molekularbiologie	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agar (für Bakteriologie)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumpersulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
ATP, ATP- γ S, ADP, AMPPNP, GTP, GMPCPP	Jena Bioscience, Jena
BSA	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Bacto™ Hefe-Extrakt	Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
Bacto™ Trypton	Difco Laboratories, Detroit, U.S.A.
Carbenicillin	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Cellfectin® II Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Dichlorodimetylsilan	Fluka, Buchs, Schweiz
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
dNTP	New England Biolabs, Schwalbach
DTT	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
EGTA	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
EDAC	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
FBS	PAA, Cölbe
Flag® Peptid	Invitrogen, Karlsruhe
Fungizone®	Invitrogen, Karlsruhe
Gentamicin-Sulfat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Glutathion-Sepharose 4B	GE Healthcare, Freiburg
Hefe-Extrakt	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
IPTG	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Kanamycin-Monohydrat	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.

Lysozym	AppliChem GmbH, Darmstadt
NADH	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
N-Ethylmaleimid	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
NHS	Thermo Scientific, Rockford, IL., U.S.A.
Paclitaxel	AppliChem GmbH, Darmstadt
PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Phosphoenolpyruvat	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Pluronic® F-127	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
PMSF	Fluka, Buchs, Schweiz
Ponceau-S	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Protease-Inhibitoren	Roche, Penzberg
Reduziertes L-Glutathion	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
SDS	Serva, Heidelberg
SP-Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Freiburg
Subtilisin A	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
TEMED	Bio-Rad, München
TCEP	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Tetrazyclin	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
TMB-Membran-Peroxidase Substrat	KPL, Gaithersburg, Maryland, U.S.A.
Tween® 20	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.
X-Gal	Sigma-Aldrich, St.Louis, U.S.A.

I.1.10 Software für Daten-Evaluierung

CLC-DNA Workbench 6.6 (CLC-Bio)	DNA-Sequenzanalyse
EMAN2	EM Partikel- <i>Averaging</i>
GraphPad Prism (GraphPad Software)	Statistik ATPase-Studien
Igor Pro 6.22A (WaveMetrics)	Datenanalyse ATPase-Studien
ImageJ 1.6.0_20	Analyse TIRFM-Filme
MATLAB 7.14 (MathWorks)	Berechnung der Diffusionskoeffizienten
Oligo Calc (Kibbe, 2007)	Schmelztemperatur-Bestimmung
OpenBox	Partikel- <i>Tracking</i>
ProtParam (Expasy)	Molekulargewicht / isoelektrischer Punkt
UV Winlab 2.85.04 (PerkinElmer)	ATPase-Messungen

I.1.11 Zellstämme

<i>E.coli</i> BI21 (DE3)-Codon Plus	Stratagene, Heidelberg
<i>E.coli</i> DH10Bac™	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E.coli</i> DH5α MAX Efficiency	Invitrogen, Karlsruhe
<i>Sf9</i> -Insektenzellen	Invitrogen, Karlsruhe

I.2 Molekularbiologische Methoden

I.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch (1%) Agarose-Gelelektrophorese separiert. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose-Pulver (Fluka) in TAE-Puffer gelöst. Um DNA visualisieren zu können, wurden 5 µl einer (10 mg/ml) Ethidiumbromid-Stammlösung (Carl Roth) zu 60 ml (1%) Agaroselösung pipettiert. Vor dem Beladen des Gels wurde ein entsprechendes Volumen eines 6X Ladepuffers zu den DNA-Proben hinzugegeben. Der Elektrophorese-Lauf wurde bei 100 V durchgeführt. Die DNA-Detektion erfolgte durch UV-Licht und die Größe der DNA-Fragmente wurde mit Hilfe eines 2-Log DNA-Standards (New England Biolabs) bestimmt.

Lösungen

1L (50X) TAE-Puffer

242 g Tris (pH 8,0)
57 ml Eisessig
100 ml 0,5 M EDTA

Agarose Gelladepuffer

20% (v/v) Glyzerin
0,1 M EDTA
1% (w/v) SDS
0.25% (w/v) Bromphenolblau

I.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden Polymerase-Kettenreaktionen (Saiki et al., 1988) im Thermozykler (PEQLAB, Eppendorf) durchgeführt. Für Standardreaktionen kam die Phusion™ DNA-Polymerase (Finnzymes) zum Einsatz. Die 50 µl Ansätze enthielten 2 mM MgCl₂, 2 ng/µl Ausgangs-DNA, 200 µM dNTP (New England Biolabs), 0.5 µM des 5'- und 3'-Primers sowie 0,5 U Phusion™-Polymerase. Anzahl der Zyklen, Temperatur, Dauer der Denaturierungs-, Annealing- und Elongationsphasen wurden nach Anweisung des Herstellers gewählt. Das PCR-Produkt wurde durch anschließende Gelextraktion mittels QIAquick® Gel-Extraktion (Qiagen) von Nukleotiden und Enzym getrennt (Punkt I.2.4). Das QuikChange® PCR-Protokoll (Stratagene) wurde für das Einführen spezifischer Mutationen benutzt (Punkt IV.4.3). Die dafür pipettierten Reaktionen mit einem Volumen von 50 µl enthielten 2 mM MgCl₂, 0.1–1 ng/µl Ausgangs-DNA, 50 µM dNTP, 0.2 µM 3'- sowie 5'-Primer sowie 2,5 U Pwo-Polymerase (PEQLAB). Anzahl der Zyklen, Temperatur, Dauer der Denatu-

rierungs-, Annealing- und Elongationsphasen wurden nach Anweisung des Herstellers gewählt. Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurde die DNA von der Firma GATC in Konstanz sequenziert, um die Korrektheit der Basensequenz garantieren zu können.

I.2.3 Isolierung von DNA via QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen)

Einzelne von *E.coli* DH5 α -Transformationsplatten gepickte Bakterien-Kolonien wurden bis zur Sättigung bei 37°C über Nacht gezüchtet. Das Anzuchtvolumen betrug 6 ml LB^{Kana}-Medium, welches für Selektionszwecke mit 0,1 mg/ml Kanamycin (AppliChem) versetzt wurde. Die Zellen wurden in sterile 15 ml Falcon-Gefäße überführt und für 15 Minuten bei 1000 x *g* abzentrifugiert (Rotante 460 R, Hettich). Die pelletierten Zellen wurden in 250 μ l Qiagen P1-Puffer aufgenommen und in sterile 1,5 ml Eppendorf-Gefäße transferiert. Für die Zell-Lyse wurden 250 μ l Qiagen P2-Puffer zu jedem Ansatz pipettiert. Durch nachfolgendes Schwenken der Eppendorf-Behälter wurde eine Homogenisierung erreicht. Das Hinzufügen von 350 μ l Qiagen P3-Puffer diente der Neutralisation. Die Ansätze wurden in einer Tisch-Zentrifuge (Perfect Spin 24 R, PEQLAB) bei 10000 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in eine QIAprep® *Spin-Column* gegeben. Die Säulchen wurden nach Zentrifugation bei 10000 x *g* für 1 Minute mit 750 μ l Qiagen PE-Puffer gewaschen und erneut für 1 Minute bei 10000 x *g* zentrifugiert. Der Waschpuffer wurde verworfen und der Zentrifugationslauf wiederholt, um Reste des PE-Puffers zu entfernen. Nach Zugabe von 40 μ l H₂O und kurzer Inkubation, erfolgte die DNA-Elution durch Zentrifugation bei 10000 x *g* für 1 Minute. Die erhaltene DNA wurde bei -20°C gelagert. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des Nano-Drops (PEQLAB) bestimmt.

I.2.4 Aufreinigung der DNA mit Hilfe des QIAquick® Gel-Extraktions Kits (Qiagen)

Alle PCR-Produkte und Restriktionsverdau-Ansätze wurden vor der weiteren Verwendung aus dem Agarose-Gel extrahiert und gereinigt. Die DNA-Banden auf dem Gel wurden mit Hilfe einer UV-Lampe (365 nm) visualisiert. Der DNA-tragende Gel-Abschnitt wurde mit einem sterilen Skalpell entfernt und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Um das Auflösen des Gels herbei zu führen, wurden 500 μ l des Qiagen QG-Puffers in den Ansatz gegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die vollständige Auflösung des Gelstücks. Die Lösung wurde in eine QIAquick® *Spin-Säule* pipettiert und in einer Tisch-Zentrifuge (PerfectSpin 24 R, PEQLAB) bei 10000 x *g* für 1 Minute zentrifugiert. 750 μ l des Waschpuffers Qiagen PE-Puffer wurden hinzugefügt und für 1 Minute bei 10000 x *g* zentrifugiert. Nach dem Entfernen des Waschpuffers wurde der Zentrifugationsvorgang wiederholt, um eine komplette Entfernung des PE-Puffers

zu gewährleisten. Nach dem Pipettieren von 40 µl H₂O auf die Säulen-Membran erfolgte eine kurze Inkubationsphase. Die DNA-Elution erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 x *g* für 1 Minute. Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe des NanoDrops bestimmt.

I.2.5 Restriktionsverdau der DNA

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren sowie Spastin/Katanin-Sequenzen wurden mit dem Endonukleasen-Paar *Bam*HI und *Not*I (New England Biolabs) geschnitten. Zu jeweils 1 µg DNA wurden 1 µl *Bam*HI, 1 µl *Not*I und 5 µl NEBuffer 4 hinzugefügt und mit H₂O ein Reaktionsvolumen von 50 µl eingestellt. Die Inkubation des Ansatzes erfolgte für 1 Stunde bei 37°C. Die analytischen Restriktionsverdauansätze wurden für 1 Stunde, die Präparativen dagegen für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Ansätze aus dem präparativen Verdau wurden mit Hilfe des QIAquick® Gel-Extraktions Kits aus dem Agarosegel gereinigt und anschließend in den Ligationsprozess eingesetzt.

I.2.6 Ligation des DNA-Inserts in einen Vektor

Für die Ligation wurden 50 ng des geschnittenen Vektors mit einem dreifach molaren Überschuss an *Insert* gemischt. Zum Ansatz wurden 10 µl des 2X Ligations-Puffers und 1 µl der *Quick*-DNA Ligase (New England Biolabs) eingesetzt. Das Reaktionsvolumen von 20 µl wurde durch Auffüllen mit H₂O erreicht. Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in kompetente Zellen transformiert.

I.2.7 Transformation in chemisch-kompetente *E.coli* DH5-α und BL21-Zellen

Die chemisch-kompetenten *E.coli* DH5-α (Invitrogen) und BL21-Zellen (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut. Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl Aliquots mit 1–10 ng DNA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte in einem 42°C warmen Wasserbad für 45 Sekunden. Nach dem Hitzeschock wurden die Eppendorf-Gefäße sofort auf Eis gestellt und dort für weitere 5 Minuten platziert. Danach wurde der Ansatz auf eine selektive Agarplatte mit 0,1 mg/ml Kanamycin ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C über Nacht oder so lange, bis einzelne, große Kolonien entstanden sind.

I.3 Proteinchemische Methoden

I.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen voneinander getrennt. Abhängig von der Größe der zu analysierenden Proteine wurden 10% oder 15%ige Polyacrylamid-Gele eingesetzt. Vor dem Beladen wurden die Proteinansätze mit dem identischen Volumen an 1X SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 Minuten bei 100°C aufgeköcht. Der Gel-Lauf erfolgte in 1X Elektrophorese-Puffer und dauerte bei 20–40 mA und 250 V 45–60 Minuten an. Proteinbanden wurden durch 60-minütige Inkubation in Coomassie-Blau-Lösung sichtbar gemacht. Die Entfärbung des Gels erfolgte durch Zugabe einer Entfärbelösung unter Schütteln (20–60 rpm) und 1-stündiger Inkubation. Das Molekulargewicht der auf das Gel applizierten Proteine konnte mittels Proteinmarker analysiert werden. Als Standard wurden der *Broad-Range* Marker der Firma Bio-Rad oder ein ColorPlus Protein-Marker (New England Biolabs) eingesetzt.

Lösungen

Sammelgel-Puffer

140 mM Tris (pH 6,8)

0,1% (w/v) SDS

Trenngel-Puffer

560 mM Tris (pH 8,8)

0,1% (w/v) SDS

5% SDS Protein-Ladepuffer

250 mM Tris (pH 6,8)

500 mM DTT

10% (w/v) SDS

0,5% (w/v) Bromphenolblau

50% (v/v) Glycerin

Lagerung bei -20°C

Coomassie™ Blau-Färbelösung

0,25% (w/v) Coomassie™ Brilliant *Blue* R-250

40% Methanol

10% Essigsäure

Entfärber

40% Methanol

10% Essigsäure

2L (10X) Elektrophorese-Puffer

60,55 g Tris (pH 8,3)

288,4 g Glycin

20 g SDS

I.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Colorimetrische Bestimmung

Die Konzentration der aufgereinigten Proteine wurde mit dem Bio-Rad Protein-Assay® nach der Methode von Bradford bestimmt. Das Prinzip dieser Farbbindungsmethode beruht auf einer Farbänderung der Lösung in Abhängigkeit von vorhandenem Protein (Bradford, 1976). Grundlage des Farbkonzentrats ist Coomassie™ Brilliant Blau G-250, dessen rote Farbe bei der Bindung an Protein nach blau umschlägt (Reisner, Nemes, & Bucholtz, 1975). Dabei geht der Farbstoff hauptsächlich eine Bindung mit basischen und aromatischen Säureketten des Proteins ein. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden anhand einer mit BSA erstellten Standardkurve in die jeweilige Konzentration umgerechnet.

Interner BSA-Standard

Hinsichtlich des *Coiled-Coil*-Konstrukts wurde neben dem aufgereinigten Protein ein interner BSA-Standard, bestehend aus diversen abgestuften Konzentrationen, auf ein SDS-Gel appliziert. Das entfärbte Gel wurde eingescannt und die Banden mit Hilfe von ImageJ (*Plugin: „Gel-Analyzer“*) ausgewertet. Durch die Flächen der BSA-Banden, die proportional zur eingesetzten BSA-Konzentration sind, kann eine Standardgerade erstellt werden. Mit Hilfe dieser Eichkurve kann der ermittelten Fläche eine entsprechende Konzentration zugeordnet werden.

I.3.3 TCA-Präzipitation von Proteinen

Die zu fällenden Proben wurden mit 1/4 Volumen eiskalter 50%iger Trichlor-essigsäure (Sigma-Aldrich) versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation in einer Kühlzentrifuge (PerfectSpin 24 R, PEQLAB) für 15 Minuten, bei 4°C und 10000 x g wurden auf das entstandene Sediment 500 µl eiskaltes Aceton gegeben, um TCA-Reste zu entfernen. Die Probe wurde gemischt und anschließend erneut für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und für die SDS-PAGE in einem entsprechenden Volumen Probenpuffer aufgenommen.

I.3.4 *Cross-Linking* Studien zur Analyse des Oligomerisierungsgrads

Cross-Linking wurde mit Hilfe des chemischen Vernetzers 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-Carbodiimid (EDAC, Invitrogen) in Kombination mit N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS, Thermo Scientific) induziert. EDAC- und NHS-Stammlösungen mit einer Konzentration von jeweils 100 mM wurden kurz vor der Durchführung des Experiments in trockenem DMSO (Sigma-Aldrich) vorbereitet. Für die Studien wurden stets gleiche Konzentrationen an EDAC und NHS eingesetzt. Das finale Reaktionsvolumen belief sich auf 20 µl. Die Konzentration der Enzyme und des *Cross-Linkers* sind in den durchgeführten Versuchen angegeben. Nach Zugabe des Vernetzers wurden die Reaktionsansätze für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch die Hinzugabe von 9 mM Glycin abgestoppt.

Lösungen

100 mM EDAC

100 mM NHS

Reaktionspuffer

50 mM HEPES (pH 7,4)

150 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5% (v/v) Glyzerin

1 mM DTT

I.3.5 Extraktion von Tubulin aus Schweinehirn

Tubulin kann in großen Mengen aus Hirnhomogenat aufgereinigt werden. Dabei profitiert man davon, dass Mikrotubuli bei höheren Temperaturen (37°C) polymerisieren und daraus resultierend pelletiert werden können. Bei niedrigeren Temperaturen kommt es dagegen zu einer raschen Depolymerisation der Filamente. Durch drei aufeinander folgende Polymerisations- und Depolymerisationsschritte sowie der Abtrennung von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPS) via Phosphozellulose-Säule konnte eine hohe Reinheit von Tubulin erzielt werden. Alle Zentrifugationsläufe wurden bei 170000 x *g* (Optima™ MAX-XP, Beckmann Coulter) durchgeführt. Mindestens 10 ganze, frische Schweinehirne wurden im Kühlraum von Bindegewebe, Adern und Hirnhäuten befreit und in 1 Volumen Puffer A im Mixer homogenisiert. Das Homogenisat wurde 70 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden mit 1/4 Volumen vorgewärmtem Glycerin und 2 mM ATP versetzt und 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend erfolgte die Sedimentation des polymerisierten Ansatzes für 45 Minuten bei 37°C. Die Pellets wurden in 5 ml Puffer B gelöst und im Homogenisator zerdrückt. Die Depolymerisation der Mikrotubuli erfolgte durch 25-minütige Inkubation auf Eis. Der Ansatz wurde erneut 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Tubulin-enthaltende Überstand wurde in einer weiteren Runde durch Zugabe von 2 mM ATP bei 37°C für 30 Minuten polymerisiert und 60 Minuten bei 37°C sedimentiert. Das Pellet wurde im Homogenisator mit 50 ml Puffer B resuspendiert, 25 Minuten auf Eis inkubiert und bei 4°C 30 Minuten abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 2 mM ATP und 1/10 Volumen DMSO hinzugefügt und die Mikrotubuli final 30 Minuten bei 37°C polymerisiert und 60 Minuten bei 37°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Puffer D homogenisiert und 30 Minuten auf Eis depolymerisiert. Das Entfernen von Präzipitaten erfolgte durch 30-minütige Zentrifugation bei 4°C. Der Überstand wurde auf eine mit Puffer D äquilibrierte und an die FPLC (GE Healthcare) angeschlossene P11 (Phosphozellulose)-Säule gegeben. Die Elution erfolgte mit der gleichen Puffer-Komponente bei einer Flussrate von 0,2 ml/min. Die Hauptfraktionen wurden vereinigt, mit 0,1 mM GTP (Jena Bioscience) versetzt, portioniert, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Lösungen

Puffer A

0,1 M PIPES (pH 6,9)

2 mM EGTA

1 mM MgSO₄

0,1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer B

0,5 M PIPES (pH 6,94)

2 mM EGTA

1 mM MgSO₄

Puffer C

0,1 M PIPES (pH 6,9)

1 mM EGTA

1 mM MgSO₄

1 mM ATP

1 mM DTT

Puffer D

0,1 M PIPES (pH 6,9)

1 mM EGTA

1 mM MgSO₄

0,05 mM ATP

0,022 mM GTP

1 mM DTT

I.3.6 Polymerisation von Mikrotubuli

Zum extrahierten Tubulin wurde GTP mit einer Endkonzentration von 1 mM hinzugegeben und in einer UZ (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter) für 10 Minuten bei 4°C und 100000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde für insgesamt 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Stabilisierung der Mikrotubuli-Filamente wurden nach 30 Minuten 20 µM Taxol (AppliChem) hinzugefügt, danach wurde der Ansatz für weitere 30 Minuten inkubiert. Um überschüssiges GTP und nicht polymerisiertes Tubulin effizient entfernen zu können, erfolgte nach der Polymerisation eine Trennung der Fraktionen über ein Saccharose-Kissen (40% (w/v) in BRB80+). Dazu wurden die polymerisierten MT auf 200 µl Kissen pipettiert und im vorgewärmten Rotor bei 37°C und 170000 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde mehrmals mit warmem BRB80+ gewaschen und zur Resuspension für 10 Minuten bei 37°C im BRB80-Ausgangsvolumen inkubiert. Nach dem Resuspendieren erfolgte mittels Photometer (PerkinElmer) die Konzentrationsbestimmung der Tubulin-Dimere. Dabei wurde die Extinktion des Tubulins in Anwesenheit von 6,6 M Guanidinium-HCl bei 280 nm bestimmt. Die Konzentration konnte mit folgender Formel kalkuliert werden:

$$c(\text{MT}) = E_{280\text{nm}} \cdot 10,3 \mu\text{M} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Lösungen

100 mM GTP

BRB80 (1X)

80 mM PIPES (pH 6,8)

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

Taxol: 10 mM Stammlösung, in wasserfreiem DMSO auf 100 µM verdünnt.

BRB80+ (BRB80 + 20 µM Taxol)

Saccharose-Kissen

40% (w/v) Saccharose in BRB80+

I.3.7 Kovalente Modifikation von Tubulin mit Fluorophoren

40 mg Tubulin wurden mit dem Farbstoff Alexa Fluor® 555 (Invitrogen) kovalent modifiziert. Für die Prozedur wurden TLA 100.3 Rotor und Ultrazentrifuge (Optima™ MAX-XP) von Beckmann benutzt, die je nach Bedarf vorgekühlt respektive vorgewärmt wurden. Tubulin wurde mit 4 mM MgCl₂ und 1 mM GTP für 5 Minuten auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 37°C aufgewärmt. Danach wurde 1/3 Volumen an vorgewärmtem Glycerin hinzugefügt, der Ansatz homogenisiert und das Homogenisat für 40 Minuten bei 37°C inkubiert. Die polymerisierten MT wurden auf einem *High*-pH Kissen für eine Stunde bei 37°C und 170000 x *g* pelletiert. Jeweils 600 µl des Kissens wurden abgenommen und mit 600 µl vorgewärmtem *Labeling*-Puffer gewaschen. Nach dem Entfernen des gesamten Überstands wurden die MT in einem Endvolumen von 4 ml vorgewärmtem *Labeling*-Puffer vorsichtig bei 37°C resuspendiert. 2 mg Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 555 wurden in 50 µl DMSO gelöst und das komplette Volumen zum Ansatz hinzugefügt - dies entspricht einem 15-molaren Überschuss an Farbstoff. Das Gemisch wurde für 40 Minuten bei 37°C inkubiert und regelmäßig alle 10 Minuten durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Danach wurden 4 ml des vorgewärmten *Quenchers* hinzugefügt und bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde auf *Low*-pH Kissen verteilt und für 30 Minuten bei 37°C und 170000 x *g* pelletiert. Nach dem Waschvorgang mit kaltem H₂O wurden die Pellets in jeweils 375 µl kalten 1X IB resuspendiert und in einen vorgekühlten Homogenisator überführt. Die Suspension wurde für 30 Minuten bei 4°C vorsichtig mit einem Glaspotter homogenisiert und bei 4°C für 10 Minuten bei 170000 x *g* zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein steriles 15 ml Falcon-

Gefäß gegeben, mit 400 µl vorgekühltem 5X BRB80 verdünnt (Endkonzentration BRB80 1X) und mit 1 mM GTP und 4 mM MgCl₂ für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden 850 µl an vorgewärmtem Glyzerin (33% (v/v)) hinzugegeben, gemischt und für 45 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden in einer weiteren Runde die polymerisierten MT auf vorgewärmte *Low-pH* Kissen verteilt und für 30 Minuten bei 170000 x *g* und 37°C pelletiert. Das Kissen wurde zweimal mit warmem H₂O gewaschen, das gesamte Kissen entfernt und das Pellet 2-mal mit warmem 1x BRB80 behandelt. Die Pellets wurden auf Eis gestellt und mit jeweils 200 µl gekühltem IB-Puffer behandelt. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Pellets resuspendiert, vereint und für 7 Minuten bei 170000 x *g* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand (entspricht dem markierten Tubulin) wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lösungen

DMSO

1X, 2X und 5X BRB80

***High-pH* Kissen**

0,1 M HEPES (pH 8,6)

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

60% (v/v) Glyzerin

Labeling Puffer

0,1 M HEPES (pH 8,6)

1 mM MgCl₂

1 mM EGTA

40% (v/v) Glyzerin

Reaktionsstopp (*Quencher*)

2X BRB80

100 mM Kalium-Glutamat

40% (v/v) Glyzerin

***Low-pH* Kissen**

60% (v/v) Glyzerin

1X BRB80

10X IB (Inversionspuffer)

500 mM Kalium-Glutamat

5 mM MgCl₂ (pH des 1X Puffers: ~ 7.0)**I.3.8 Herstellung von segmentierten und polaritätsmarkierten Mikrotubuli**

Segmentierte und polaritätsmarkierte Mikrotubuli sind für viele *in vitro* TIRF-Studien von großer Bedeutung. So kann beispielsweise überprüft werden, ob Enzyme einen bestimmten Tubulin-Nukleotidzustand bevorzugen, oder ob das entsprechende Protein ein favorisiertes Lauf- und Bindevverhalten zu einem der beiden Mikrotubulus-Enden aufweist. Bei segmentierten Mikrotubuli handelt es sich um Filamente mit hellen Regionen und schwächer fluoreszierenden elongierten Segmenten. Polaritätsmarkierte Mikrotubuli besitzen dagegen hauptsächlich ein schwach fluoreszierendes Filament mit einer hellen Kappe, die das Minus-Ende des Mikrotubulus signalisiert.

I.3.8.1 Guanidin-5'-[(α,β)-Methyleno]-Triphosphat (GMPCPP) Polymerisation

Für die Polymerisation von Mikrotubuli ist GMPCPP das effizienteste GTP-Analogon. In Gegenwart von Kalium kann GMPCPP innerhalb des Mikrotubuli-Netzwerks nur sehr langsam hydrolysiert werden. GMPCPP ist ein potenter Nukleator für Mikrotubuli. Bei einer Tubulin-Konzentration ≥ 1 mg/ml entstehen in Gegenwart von GMPCPP sehr viele und vornehmlich kurze Mikrotubuli. Werden längere GMPCPP-Mikrotubuli gebraucht, so kann die Nukleation durch Verringerung der Tubulin-Konzentration auf 0,2–0,3 mg/ml limitiert werden. Für die durchgeführten Messungen wurde GMPCPP-Tubulin mit einer Konzentration zwischen 1 und 3 mg/ml hergestellt und Aliquots bei -80°C gelagert. Direkte Polymerisation führte zu kurzen GMPCPP-Nukleationskeimen, während eine Verdünnung des Ansatzes längere GMPCPP-Mikrotubuli lieferte.

Lösungen**BRB80 (1X)****100 mM GTP****100 mM GMPCPP****Taxol:** 10 mM Stammlösung, in wasserfreiem DMSO auf 100 μM verdünnt.

Herstellung von GMPCPP-Nukleationskeimen

Mit Alexa Fluor® 555 konjugierte sowie unmarkierte Tubulin-Dimere (1–3 mg/ml) wurden in einem Verhältnis von 1:3 in BRB80-Puffer inklusive 1 mM DTT und 1 mM GMPCPP (Jena Bioscience) auf Eis gemischt und anschließend für 10 Minuten inkubiert. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 170000 x *g* (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter) und 4°C zentrifugiert und der Überstand in 5 µl Portionen aufgeteilt. Nach dem Schockgefrieren der Aliquots erfolgte deren Lagerung bei -80°C.

Segmentierte Taxol-stabilisierte Mikrotubuli

Die zuvor hergestellten GMPCPP-Nukleationskeime wurden in einem ersten Schritt für 30 Minuten bei 37°C polymerisiert. Während dieser Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung des Elongationsansatzes, der sich aus 15 µM Tubulin (1 Teil Alexa Fluor® 555 und 10 Teile unmarkiertes Tubulin) in 1X BRB80, 1 mM DTT und 1 mM GTP zusammensetzte. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsvorgang bei 170000 x *g* für 5 Minuten bei 4°C (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter). Im nächsten Schritt wurde der schwach markierte Elongationsansatz für 1 Minute bei 37°C inkubiert und 1:5–1:20 des GMPCPP-Volumens hinzugefügt. Danach wurde der Ansatz für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert, um Polymerisation zu ermöglichen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 20 µM Taxol, um eine Stabilisierung der Mikrotubuli zu gewährleisten.

Polaritätsmarkierte Taxol-stabilisierte Mikrotubuli

Die zuvor hergestellten GMPCPP-Nukleationskeime wurden in einem ersten Schritt für 30 Minuten bei 37°C polymerisiert. Während dieser Inkubationszeit erfolgte die Vorbereitung des schwach markierten, polaren Elongationsansatzes, welcher sich aus 15 µM Tubulin (1 Teil Alexa Fluor® 555 und 10 Teile unmarkiertes Tubulin) und 12 µM NEM (N-Ethylmaleimid, Sigma-Aldrich) GTP-Tubulin in 1X BRB80, 1 mM DTT sowie 1 mM GTP zusammensetzte. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation mit 170000 x *g* für 5 Minuten bei 4°C (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter). Im nächsten Schritt wurde der schwach markierte Elongationsmix für 1 Minute bei 37°C inkubiert und 1:5–1:20 des GMPCPP-Volumens hinzugefügt. Danach wurde der Ansatz für weitere 20 Minuten bei 37°C inkubiert, um Polymerisation zu ermöglichen. Abschließend erfolgte die Zugabe von 20 µM Taxol, um eine Stabilisierung der Mikrotubuli zu gewährleisten.

Lösungen

BRB80 (1X)

100 mM GTP

100 mM GMPCPP

Taxol: 10 mM Stammlösung, in wasserfreiem DMSO auf 100 μ M verdünnt.

Heller GMPCPP-Nukleationskeim Ansatz (2 mg/ml, 1 Teil Alexa Fluor® 555-Tubulin zu 10 Teilen unmarkiertem Tubulin).

NEM GTP-Tubulin: Inkubation von Tubulin (7 mg/ml) in BRB80 + 0,5 mM GTP mit 1 mM NEM (N-Ethylmaleimid; 50 mM NEM-Stammlösung, die kurz vor Verwendung frisch hergestellt wurde) für 10 Minuten bei 4°C. Das *Quenchen* von NEM erfolgte durch 8 mM 2-Mercaptoethanol (Carl Roth) für 10 Minuten bei 4°C. Aliquots wurden hergestellt und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

NEM GMPCPP-Tubulin: Inkubation von Tubulin (7 mg/ml) in BRB80 + 0,5 mM GMPCPP mit 1 mM NEM (N-Ethylmaleimid; 50 mM NEM-Stammlösung, welche kurz vor Verwendung frisch hergestellt wurde) für 10 Minuten bei 4°C. Das *Quenchen* von NEM erfolgte durch 8 mM 2-Mercaptoethanol für 10 Minuten bei 4°C. Aliquots wurden hergestellt und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

I.3.9 Subtilisin-Verdau von Mikrotubuli

Mikrotubuli wurden analog zu Punkt I.3.6 polymerisiert und durch Zugabe von Taxol stabilisiert. Die C-terminalen Enden von α - und β -Tubulin (*E-Hook*) wurden durch Inkubation von 0,6 mg/ml Tubulin mit Subtilisin A (Verhältnis 1:0,8) (Sigma-Aldrich) in BRB80+ Puffer entfernt. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 37°C. Danach wurde der Verdau durch Zugabe von 2 mM PMSF (Fluka), welches in Isopropanol gelöst wurde, gestoppt. Die Inkubation mit PMSF erfolgte für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Subtilisin-behandelte Mikrotubuli wurden bei 100000 $\times g$ (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter) für 25 Minuten pelletiert. Die Pellets wurden mit BRB80+ gewaschen und die Mikrotubuli im gleichen Puffer inklusive 1 mM GTP resuspendiert. Um den Verdau zu bestätigen, wurden die behandelten Mikrotubuli parallel mit nativem Tubulin, welches als Kontrollansatz diente, auf einem SDS-Gel analysiert.

I.3.10 Herstellung von hybriden Mikrotubuli

Taxol stabilisierte, mit Subtilisin verdaute Mikrotubuli wurden analog zu den Punkten I.3.6 und I.3.9 hergestellt. Natives Tubulin wurde zur Elongation der Mikrotubuli eingesetzt. Beide Sorten von Mikrotubuli wurden mit Taxol (20 μM) stabilisiert. Lediglich eine Sorte, entweder Subtilisin-behandeltes oder natives Tubulin, wurde für die Detektion mittels Fluoreszenzmikroskops mit Alexa Fluor® 555 markiert. Die daraus resultierenden hybriden Mikrotubuli wurden anschließend mit jeweils 20 nM GFP-gekoppeltem Spastin oder Katanin inkubiert.

I.3.11 Cosedimentationsexperimente

Mit Cosedimentationsläufen kann eine Aussage über den Bindegrad von Spastin und Katanin an Mikrotubuli getroffen werden. In den Messungen wurden unterschiedliche Konzentrationen an Tubulin-Dimeren und Enzymen eingesetzt. In einer Projekt-Reihe wurden bei einer konstanten MT-Konzentration von 1 respektive 2 μM diverse Spastin und Katanin-Konzentrationen eingesetzt, die sich zwischen 0 und 10 μM erstreckten. In einer weiteren experimentellen Reihe blieb die Enzymkonzentration dagegen konstant (1 μM), während die MT-Konzentration sukzessive erhöht wurde (0 bis 10 μM). Um den Effekt unterschiedlicher Nukleotide auf die Bindekapazität zu überprüfen, wurden Analysen in Gegenwart von 1 mM des entsprechenden Nukleotids (ADP, ATP, ATP- γS ; Jena Bioscience) durchgeführt. Das Endvolumen der Reaktionsansätze belief sich stets auf 40 μl . Nach 20-minütiger Inkubation des Reaktionsansatzes bei Raumtemperatur erfolgte die Separation der an Mikrotubuli gebundenen Fraktion von freiem Protein mittels Zentrifugation (Optima™ MAX-XP, Beckman Coulter). Der Reaktionsansatz wurde für 15 Minuten bei 175000 $\times g$ und 37°C zentrifugiert. 25 μl des Überstands wurden mit 5 μl 2X SDS-Probenpuffer versetzt und der restliche Überstand abpipettiert. Das Pellet wurde vorsichtig mit 80 μl BRB80+ gewaschen und in 40 μl 2X SDS-Probenpuffer resuspendiert. Von den Proben wurde jeweils ein Volumen von 10 μl auf ein SDS-Gel appliziert, um die Binefähigkeit der eingesetzten Konstrukte an Mikrotubuli zu überprüfen. Die Analyse der erhaltenen Gelbilder erfolgte durch das ImageJ-Plugin „Gel-Analyzer“.

Lösungen

SDS-Probenpuffer (2X)

100 mM Tris (pH 6,8)

25% Glycerin (v/v)

2% SDS (w/v)

0,01% Bromphenolblau (w/v)

10% 2-Mercaptoethanol (v/v)

I.4 Analytische Methoden

I.4.1 Messungen mit dem Spektralphotometer

Sowohl Atomgruppen oder Bindungen als auch spezifische Substanzen sind in der Lage, Licht bestimmter Wellenlänge zu absorbieren. Dabei hängt die Menge der Absorption von der Anzahl der bestrahlten Moleküle und der eingesetzten Substanz ab. Will man diese Erscheinungen nutzen, kann man sich eines Spektralphotometers bedienen. Das Prinzip des Photometers ist in Abbildung I.1 dargestellt.

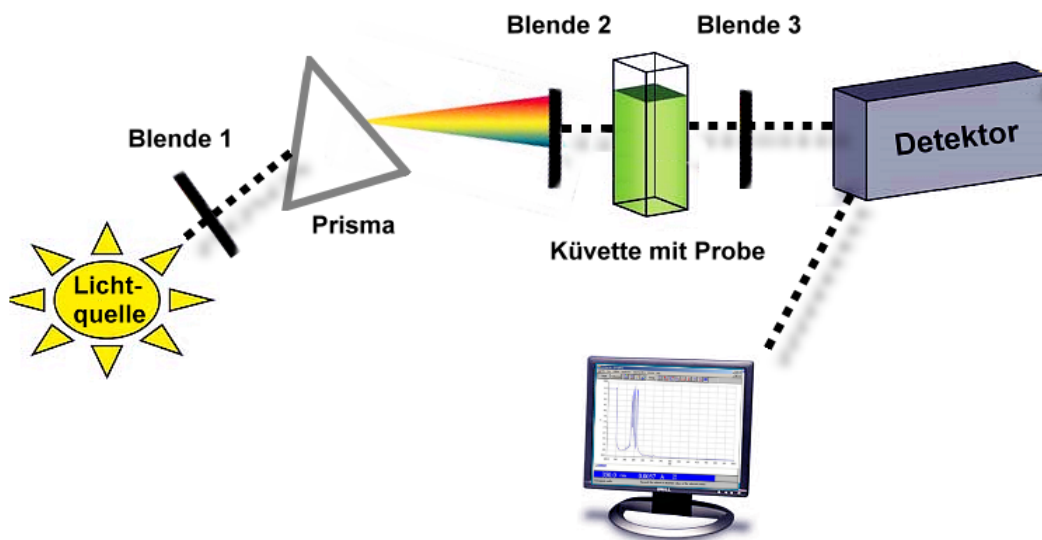


Abbildung I. 1: Aufbau eines Spektralphotometers.

Durch die Kombination aus Prisma und Blenden wird ein monochromatischer Lichtstrahl aus dem Spektrum einer Xenonlampe selektiert und durch eine Probenkuvette geleitet. Abhängig von Substanz und Moleküldichte wird eine spezifische Absorption von einem Detektor, der zumeist eine Photozelle darstellt, registriert.

Eine Lichtquelle strahlt weißes Licht aus. Dabei handelt es sich um eine Kombination aller im spektralen Bereich vorhandener elektromagnetischer Wellen. Aus dem kugelförmig ausgestrahlten Licht wird durch die erste Blende ein schmales Lichtbündel heraus selektiert. Dieses Bündel stellt weiterhin einen polychromatischen Lichtstrahl dar. Um für die Probenanalysen einen monochromatischen Lichtstrahl zu erhalten, erfolgt der Transfer des Lichtstrahls durch ein Prisma. Abhängig von ihrer entsprechenden Wellenlängen werden die Strahlen unterschiedlich stark gebrochen. Dadurch wird erreicht, dass die Lichtstrahlen in einem voneinander abweichenden Winkel aus dem Prisma austreten. Dabei werden elektromagnetische Wellen mit geringen Wellenlängen schwach und solche mit großen Wellenlängen dagegen stark abgelenkt. Dadurch wird auf effizientem Weg eine Trennung der polychromatischen Strahlung gewährleistet. Um einen monochromatischen Lichtstrahl selektieren zu können dient eine zweite eingebaute Blende. Aufgrund der sehr geringen Öffnung ist es möglich, nur einen Lichtstrahl einer spezifischen Frequenz durchzulassen. Dieser monochromatische

Lichtstrahl kann nun eingesetzt werden, um Reaktionsansätze zu analysieren. Dabei finden Quarzglas-Küvette Verwendung, durch die der Lichtstrahl geschickt wird. Abhängig von der im Reaktionsansatz enthaltenen Substanz und Anzahl an Molekülen erfolgt eine unterschiedlich starke Absorption. Abschließend erreicht der Lichtstrahl einen Detektor, welcher zumeist eine Photozelle darstellt. Diese registriert die Intensität des auftreffenden Lichts und leitet die Information an das Anzeiginstrument weiter.

I.4.1.1 ATPase-Messungen

Messungen zur ATPase-Aktivität von Spastin und Katanin wurden mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests durchgeführt:

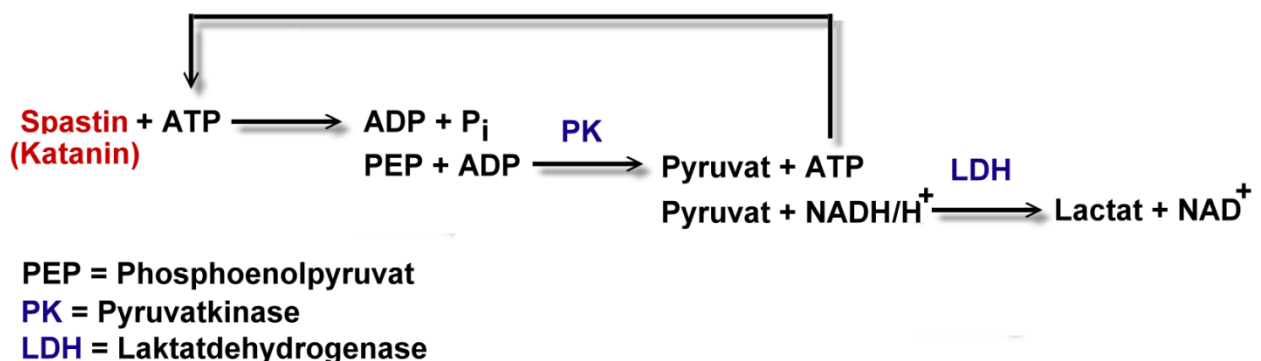


Abbildung I. 2: Schema des verwendeten gekoppelten enzymatischen Tests.

Durch den Einsatz der Hilfsenzyme Pyruvatkinase und Laktatdehydrogenase konnte ein ATP-regenerierendes System erhalten werden.

Die eingesetzten *Severing*-Enzyme hydrolysieren ATP zu ADP und Orthophosphat. Die ATP-Regeneration wird dadurch gewährleistet, dass das Hilfsenzym Pyruvatkinase einen Phosphatrest von Phosphoenolpyruvat auf ADP transferiert. Das gleichzeitig gebildete Pyruvat wird durch das zweite Hilfsenzym, die Laktatdehydrogenase, unter NADH-Verbrauch zu Laktat reduziert. Im Photometer kann die Abnahme des NADHs bei 340 nm beobachtet werden. Dabei ist die Reduktion proportional zur Hydrolyserate des ATPs. Für die Durchführung der ATPase-Messreihen wurde stets ein *Premix*, bestehend aus 2 U/ml Pyruvatkinase, 3 U/ml Laktat-Dehydrogenase (Sigma- Aldrich), 2 mM Phosphoenolpyruvat (PEP, Sigma-Aldrich) sowie 0,3 mM NADH (Carl Roth) in BRB80+ hergestellt. Dieser Ansatz wurde je nach Messung mit unterschiedlichen Konzentrationen von diversen Nukleotiden (ATP, ATP- γ S und AMPPNP) und Mikrotubuli versetzt. Die Vorinkubation der Proben erfolgte bei 25°C in Eppendorf-Gefäßen und die Reaktion wurde durch Zugabe von Spastin oder Katanin gestartet. Für die photometrische Messung wurden Quarzküvetten (Hellma) mit einem Kammer-Volumen von 80 μ l herangezogen. Die Extinktionsabnahme bei 340 nm wurde über einen Zeitraum von 4 Minuten im Photometer (Lambda 25 UV/VIS Spektralphotometer, PerkinElmer) beobachtet.

Berechnung von K_M und k_{cat}

Mithilfe des Programms Igor Pro (Wavemetrics) wurde die maximale zeitliche Extinktionsabnahme für die einzelnen ATPase-Tests bestimmt. Trägt man die maximale Extinktionsabnahme (v) in Abhängigkeit der ATP-Konzentration oder Mikrotubuli-Konzentration $[S]$ auf, entsteht eine hyperbolische Kurve. Diese kann unter Zuhilfenahme von Igor Pro mithilfe der Michaelis-Menten Gleichung an eine nicht-lineare Regressionskurve angepasst werden.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Aus dem Ergebnis der Kurvenregression können die Werte für die Michaelis-Menten Konstante K_M und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit v_{max} (in der Einheit $\Delta E/s$) erhalten werden. K_M entspricht dabei der Substratkonzentration, bei der halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit registriert wird. Ein wichtiger Analysefaktor stellt die ATP-Umsatzrate durch das eingesetzte Enzym, $k_{cat} = (\Delta[ATP]/(\Delta t \cdot [Enzym]))$, dar. Dieser Faktor kann aus der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt werden. Dafür müssen zunächst die Menge an verbrauchtem ATP pro Sekunde sowie die verwendete Enzym-Konzentration im Reaktionsansatz berechnet werden. Nach Lambert-Beer gilt:

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d, \text{ also } \frac{\Delta c}{\Delta t} = \frac{\Delta E \cdot d}{\Delta t \cdot \varepsilon}$$

(mit E: Extinktion, c: Konzentration, ε : Extinktionskoeffizient, d: Schichtdicke der Küvette, t: Zeit). Da jeder ATP-Hydrolyseschritt mit der Oxidation von NADH verbunden ist, entspricht die Abnahme der Konzentration $\Delta c/\Delta t$ von ATP der zeitlichen Konzentrationsreduktion von NADH. Weitere Parameter sind für die Berechnung der verbrauchten ATP-Menge pro Sekunde erforderlich: NADH weist einen molaren Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon(\text{NADH}) = 6,22 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ auf und die Schichtdicke der verwendeten Küvette beträgt $d = 1 \text{ cm}$. Mit folgender Formel kann der ATP-Umsatz pro Zeit kalkuliert werden:

$$\frac{\Delta[ATP]}{\Delta t} = \left(\frac{\Delta E_{340\text{nm}}}{\Delta t} \right) / (6,22 \cdot 10^3 \cdot \text{M}^{-1})$$

Damit die molare Konzentration der eingesetzten Proteine berechnet werden kann, muss ihr Molekulargewicht berücksichtigt werden. So gilt:

$$c[\text{Protein}] \left(\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right) = \left(\frac{c[\text{Protein}] \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right)}{\text{MW} \left(\frac{\text{g}}{\text{mol}} \right) \cdot \text{Verdünnungsfaktor}} \right)$$

Aus dem Verhältnis des verbrauchten ATPs zur Menge des eingesetzten Enzyms kann schließlich die Umsatzrate k_{cat} bestimmt werden:

$$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1}) = \left(\frac{\Delta[\text{ATP}]}{\Delta t} \right) / [\text{Enzym}]$$

I.4.1.2 Lichtstreu-Experimente

Um den Bündelungseffekt von Mikrotubuli durch die Spastin-Mutante E442Q besser studieren zu können, wurden Lichtstreu-Experimente durchgeführt. Die Bündelung wurde bei einer Wellenlänge von 350 nm und einer Spaltbreite von 3 nm detektiert. Die Absorption wurde dabei über einen Zeitraum von 10 Minuten alle 10 Sekunden detektiert. Das finale Reaktionsvolumen betrug 80 μl . In der Reaktion wurden jeweils 10 μM Tubulin in BRB80+ mit variierenden Proteinkonzentrationen (0,5 und 1 μM E442Q) sowie 1 mM ATP gemischt und anschließend vermessen. Alle Messungen wurden bei einer konstanten Temperatur von 25°C durchgeführt.

I.4.2 Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem verwendeten TIRF konnten sowohl Mikrotubuli als auch die zu analysierenden AAA-Proteine visualisiert werden. Der Fokus lag dabei auf zwei Schwerpunkten:

- um den Effekt von Spastin und Katanin auf Mikrotubuli visualisieren zu können, wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor® 555 markierte Mikrotubuli in einem Objektiv-basierten TIRF-Mikroskop (invertiertes Mikroskop IX71, Olympus) betrachtet.
- um eine detaillierte Aussage über die Funktionsweise der beiden *Severing*-Enzyme auf dem Mikrotubulus-Filament machen zu können, wurden die beiden AAA-Proteine mit dem Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt und deren Bewegung und Arbeitsweise auf dem Filament studiert.

I.4.2.1 Interne Totalreflexionsfluoreszenzmikroskopie (TIRFM)

Sobald Licht auf die Grenzfläche zweier Medien mit unterschiedlichen Brechungsindizes $n(1)$ und $n(2)$ fällt werden die Lichtstrahlen in Abhängigkeit ihrer Einfallswinkel gebrochen. Dieser Sachverhalt wird durch das Snelliussche-Brechungsgesetz beschrieben. Dabei tritt bei einem spezifischen kritischen Einfallswinkel $\theta(c)$ Totalreflektion des Lichts auf:

$$\theta(c) = \sin^{-1} \cdot \left(\frac{n(2)}{n(1)} \right) \text{ mit } n(1) > n(2)$$

Dadurch wird ein evaneszentes Feld erzeugt, das exponentiell mit der Weglänge abfällt. Weiterhin dringt es nur wenige hundert Nanometer in die wässrige Probe ein (Abbildung I.3B). Somit wird sichergestellt, dass nur der kleine Anteil von Fluoreszenzmolekülen angeregt wird, der sich im evaneszenten Feld befindet. Dagegen ist die Fluoreszenz außerhalb des Feldes minimal. Störende Hintergrundsignale werden durch dieses Prinzip reduziert und daraus resultierend ein gutes Signal-zu-Rausch Verhältnis ermöglicht. Die Beleuchtung im TIRF-Winkel kann auf unterschiedlichen Wegen erfolgen: zum einen durch den Einsatz eines Prismas oder wie im eingesetzten TIRF-Mikroskop von Olympus durch ein spezielles Objektiv. Hinsichtlich des Olympus-Mikroskops erfolgt der Transfer des Laserstrahls durch das Mikroskop in die Objektivlinse mit einer numerischen Apertur $> 1,36$. Die Probe befindet sich dabei oberhalb der Objektivlinse auf der Oberfläche des unteren Deckglases (Abbildung I.3A).

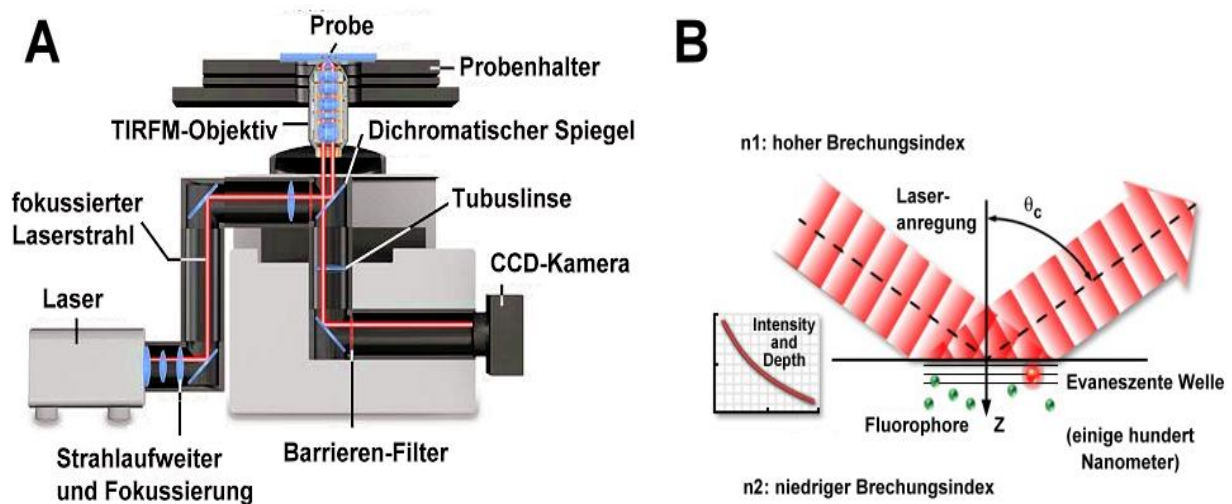


Abbildung I. 3: Schematische Darstellung des TIRF-Mikroskops und Prinzip der Totalreflexion.

(A) Mehrere Linsen ermöglichen die Aufweitung des Laserstrahls. Dieser wird gleichzeitig fokussiert und durch einen installierten dichromatischen Spiegel in das TIRF-Objektiv geleitet. Der Laserstrahl wird totalreflektiert, da er im kritischen Winkel auf die Grenzfläche von Objektträger und Probe trifft. Fluoreszenzmoleküle, die im evaneszenten Feld angeregt werden, strahlen längerwelliges Licht ab. Durch spezielle Filter wird dieses zur Detektion in die CCD-Kamera weiter geleitet.

(B) Im kritischen Winkel $\theta(c)$ trifft der Laserstrahl auf die Grenzfläche von Objektträger mit hohem Brechungsindex n_1 und wässriger Probe mit niedrigem Brechungsindex n_2 . Durch die Totalreflexion entsteht eine evaneszente Welle, die eine sehr dünne Schicht von Molekülen in der Nähe der Grenzfläche anregt.

(Informationen und Abbildungen entnommen von Olympus (www.olympus.de)).

I.4.2.2 Einzelmolekülmessungen und *Severing*-Studien

Vorbereitung der Flusskammer

Für die Herstellung von Flusskammern wurde mit Hilfe von Vakuumsfett ein zentrales Reservoir auf den silanbeschichteten mikroskopischen Deckgläschen (Carl Roth) geschaffen. Dazu wurden die Fettstreifen jeweils an den Rand des Deckglases gegeben, so dass ein Zwischenraum von etwa 5 mm entstand. Im nächsten Schritt wurde ein kleines Deckglas auf die Fettstreifen platziert und durch vorsichtiges Andrücken mit einer Pinzette stabilisiert. Silanbeschichtete Deckgläser wurden nach folgendem Protokoll hergestellt: Nach der biologischen Reinigung der Deckgläser mit Wasser und Ethanol wurde eine 0,05% Dichlorodimethylsilan-Lösung (Fluka) zu den Deckgläsern gegeben. Nach 1-stündiger Inkubation wurde die Blockierungssuspension entfernt und die Deckgläser erneut mit Wasser und Ethanol behandelt. Nach dem letzten Ethanol-Waschschritt erfolgte die Trocknung der silanbeschichteten Deckgläser im 70°C Trockenschrank.

Die Komponenten, die in die Flusskammer pipettiert wurden, sind im Folgenden aufgelistet. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte stets eine 5-minütige Inkubationsphase.

- 1) 100 μ l Anti- β -Tubulin Antikörper (1:500) (Sigma-Aldrich)
- 2) 200 μ l BRB80+ Puffer
- 3) 100 μ l BRB80+ Puffer inklusive 5% Pluronic®-F127 (Sigma-Aldrich)
- 4) 200 μ l BRB80+ Puffer
- 5) 100 μ l Alexa Fluor® 555-markierte Mikrotubuli (200 nM)
- 6) 200 μ l BRB80+ Puffer
- 7) GFP-Spastin/Katanin (5–1000 nM) in Gegenwart von O-Radikalfängern

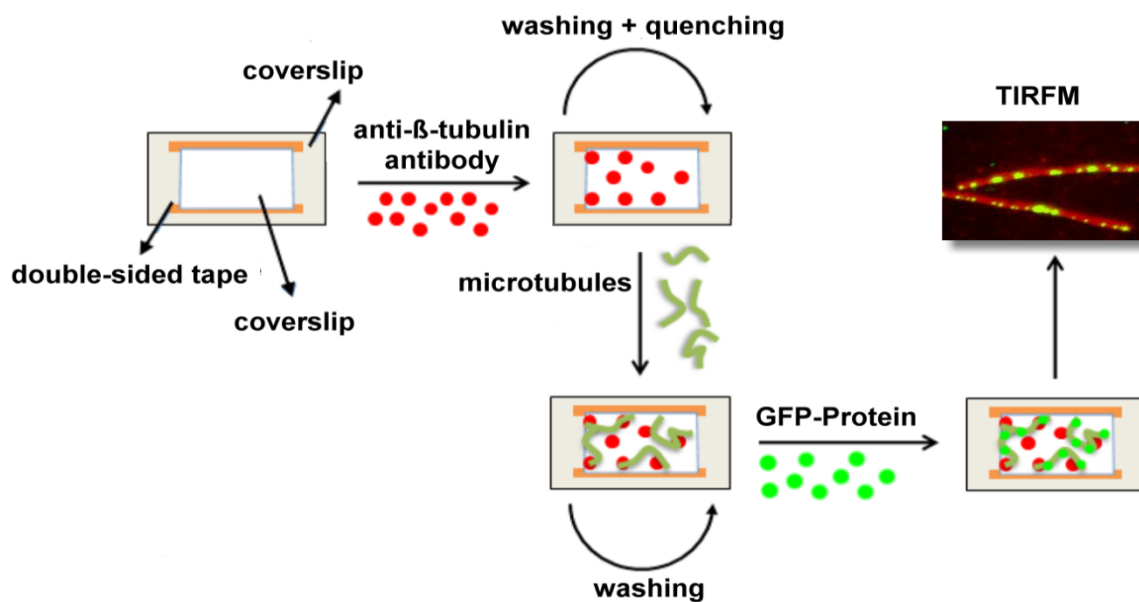


Abbildung I. 4: TIRF-Versuchsaufbau.

Aufbau der Flusskammer und Darstellung der einzelnen Pipettierphasen, die bei der Durchführung von *Severing*-Studien und Einzelmolekülmessungen eingesetzt wurden.

Daten wurden sofort nach Hinzugabe des Enzyms in die Flusskammer gesammelt. Tubulin wurde in Reaktionspuffer verdünnt und hatte eine Konzentration zwischen 50 und 200 nM. Die Verdünnung von GFP-Spastin/GFP-Katanin erfolgte ebenfalls mit BRB80-Puffer. Die finale Spastin/Katanin-Konzentration erstreckte sich dabei in einem Bereich zwischen 5 und 1000 nM. Anti- β -Tubulin Antikörper (Stammlösung = 5 mg/ml) wurde 1:500 in BRB80-Puffer verdünnt. Für die Aufnahme von TIRF-Videos wurde eine Belichtungszeit von 100 oder 200 ms gewählt. Einzelne Momentaufnahmen oder gesamte Filme wurden mithilfe einer CCD-Kamera (CCD Digital Camera C9100, Hamamatsu) und dem Softwareprogramm CellR (Olympus) festgehalten. Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mit dem Analyseprogramm ImageJ.

Lösungen

Reaktionspuffer (5X BRB80)

400 mM Pipes (pH 6,85)

10 mM MgCl₂

15 mM Mg-Acetat

2,5 mM EGTA

O-Radikalfänger

Glucose: 450 mg/ml in H₂O ($\approx 2,25$ M)

2-Mercaptoethanol: 50% (v/v) ($\approx 7,15$ M)

Glucose-Oxidase: 20 mg/ml (Sigma-Aldrich)

Catalase: 3,5 mg/ml (Sigma-Aldrich)

Reaktionsansatz

40,5 μ l Reaktionspuffer

1 μ l (0,1 M) ATP

2 μ l 2-Mercaptoethanol

2 μ l Glucose-Oxidase

2 μ l Catalase

2 μ l Glucose

0,5 μ l GFP-Spastin/GFP-Katanin

Datenanalyse: *Severing* Frequenz, Bindedauer und Diffusionskoeffizient

Die TIRF-Daten wurden von der Software CellR in Form von 16-bit Bildern festgehalten. Die Bewegung von GFP-Einzelmolekülen wurde durch das Erstellen von Kymographen analysiert, die mit Hilfe des *Plugins „Multiple-Kymograph“* (J. Rietdorf und A. Seitz, EMBL, Heidelberg) erstellt wurden. Depolymerisationsraten wurden bestimmt, indem der Durchschnittswinkel des Signalverlusts am Ende des Mikrotubulus gemessen wurde (Abbildung IV.16A). Die Tangente lieferte die Depolymerisationsrate in Pixel (Distanz pro Zeiteinheit). Mit Hilfe von Maßstab und Zeitintervall konnten die Daten in nm/s umgerechnet werden. Für die Bestimmung der *Severing* Frequenz wurde die Anzahl der registrierten Schnitte für jeden Mikrotubulus manuell bestimmt. Die Anzahl an *Severing*-Ereignissen in einem Video wurde dann durch die Gesamtlänge der Mikrotubuli zu Beginn des Videos sowie durch die Gesamtdauer des Schneideprozesses

dividiert. Die Bestimmung der Bindefrequenz erfolgte durch manuelles Zählen der Bindeereignisse. Die Bindedauer wurde mit Hilfe von Kymographen erhalten. Der prozentuale Anteil an *Severing*-Ereignissen an GMPCPP-Arealen und dem GDP-Tubulin Restfilament wurden bestimmt, indem die Schnitte in den beiden Regionen manuell gezählt und durch die Gesamtanzahl an Schnittereignissen dividiert wurde. Filme mit diffundierenden GFP-Spastin Molekülen wurden in das Programm „Open-Box“ (http://openbox.org/wiki/Main_Page) importiert und mit der Funktion „Partikel-Tracking“ studiert. Die Bewegung der selektierten Partikel wurde aufgezeichnet und eine Datei mit den entsprechenden X- und Y-Positionswerten erstellt. Die erhaltenen Positionsdaten wurden in MatLab (MathWorks) importiert und mit Hilfe eines hauseigenen Analyseprogramms evaluiert. Die Auswertung lieferte *Plots*, in denen die *Mean Squared Displacement* (MSD)-Werte in [μm^2] gegen die Zeit t in [s] aufgetragen wurden. Ein linearer Fit lieferte schließlich den Diffusionskoeffizienten [D] einzelner Spastin- oder Katanin-Partikel in [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]. Die erhaltenen Diffusionskoeffizienten wurden in einem Histogramm zusammengefasst und ein exponentieller Fit lieferte den gemittelten Diffusionskoeffizienten für Spastin respektive Katanin.

Photobleaching

Die Messungen wurden in Flusskammern durchgeführt, wie sie bereits für Einzelmolekülmessungen und *Severing*-Studien zum Einsatz gekommen sind (Abbildung I.4). Abweichend von diesen Experimenten kam bei den Ausbleich-Studien ein Anti-GFP-Antikörper (Sigma-Aldrich) mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml zum Einsatz. Dadurch wurde sichergestellt, dass ausschließlich GFP-Katanin und GFP-Spastin-Komplexe mittels TIRF detektiert werden konnten. Die Messungen wurden in Anwesenheit von drei unterschiedlichen Nukleotiden durchgeführt: ATP, ATP- γ S und AMPPNP. Videos wurden ohne Verzögerung (129 ms Bildintervalle) aufgenommen und die Laserbestrahlung blieb konstant, damit *Photobleaching* induziert werden konnte. Die *Photobleaching*-Daten wurden analysiert, indem die Fluoreszenzintensität registrierter GFP-Moleküle über die Zeit gemessen wurde. Die Visualisierung der Daten erfolgte mit dem ImageJ-Plugin „Time-Series Analyzer 2.0“. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität gegen die Zeit aufgetragen. Moleküle, die klare Ausbleichschritte zeigten, wurden manuell ausgewertet. Bei Partikel, die viele oder parallel auftretende Ausbleichschritte aufwiesen, wurde die Intensität des letzten Bleichschritts registriert und die Ausgangsfluoreszenz des Komplexes berücksichtigt. Mit diesen Informationen konnte die Anzahl der im Komplex enthaltenen GFPs bestimmt werden, indem die Fluoreszenzintensität des Oligomers durch die Intensität eines GFP-Einzelmoleküls dividiert wurde.

I.4.3 Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM)

Die Auflösung eines Mikroskops (d_{\min}) wird durch seine numerische Apertur $n \cdot \sin \alpha$ (mit dem Brechungsindex n und dem Öffnungswinkel α) sowie durch die Wellenlänge der verwendeten Strahlung λ begrenzt. Dieser Sachverhalt wird durch das Gesetz von Abbé beschrieben:

$$d_{\min} = \lambda / (n \cdot \sin \alpha)$$

Im TEM hat die Beschleunigungsspannung einen wichtigen Einfluss auf die Wellenlänge der Elektronen. Diese ist wesentlich kleiner als die von sichtbarem Licht, sodass mit modernen Elektronenmikroskopen Abstände bis zu 0,2 nm sichtbar gemacht werden können. Im Transmissions-Elektronenmikroskop werden Elektronen durch den Aufheizprozess einer Glühkathode erzeugt. Eine angelegte Hochspannung ermöglicht anschließend im Vakuum die Beschleunigung der Elektronen zur Anode. Der Elektronenstrahl wird durch Kondensoren auf das entsprechende Objekt geleitet, während Objektivlinsen eine Fokussierung des Strahls gewährleisten. Zwischen- und Projektivlinsen ermöglichen eine Vergrößerung des Bildes, welches auf einem Fluoreszenzschirm dargestellt und mit Hilfe einer installierten CCD-Kamera digitalisiert wird (Abbildung I.5).

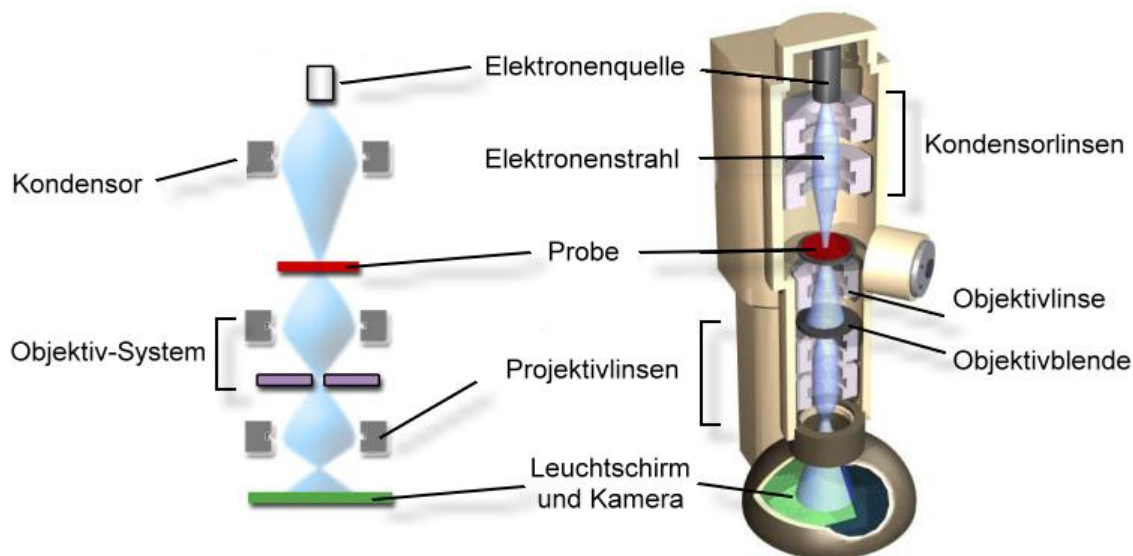


Abbildung I. 5: Schematischer Aufbau eines TEMs mit Strahlengang.

Durch eine angelegte Spannung werden die Elektronen zur Anode hin beschleunigt. Abhängig von der Dichte der zu analysierenden Probe erfährt der Elektronenstrahl eine unterschiedlich starke Streuung. Während Objektivlinsen den Elektronenstrahl fokussieren, entsteht durch Projektivlinsen ein vergrößertes Bild, das durch eine nachgeschaltete CCD-Kamera detektiert wird.

(Informationen und Abbildungen entnommen von Philips (www.philips.com)).

Abhängig von der Ordnungszahl der Atome, aus denen das bestrahlte Untersuchungsobjekt besteht, wird eine unterschiedlich starke Streuung der durchstrahlten Elektronen ausgelöst. Eine im TEM installierte Objektivblende filtert gestreute Elektronen heraus, so dass ausschließlich nichtgestreute Elektronen passieren können. Durch diesen Selektionsschritt wird der Kontrast in einem Bild

erzeugt. Da biologische Moleküle ausschließlich Atome mit niedrigen Ordnungszahlen enthalten und daraus resultierend kontrastarm sind, kommt es zum Einsatz von Schwermetallsalzen. Durch die Einbettung der Proben in das stark streuende Material, beispielsweise Uranylformiat oder Uranylacetat (*Negative Staining*), wird eine erhöhte Kontrastierung gewährleistet.

I.4.3.1 Herstellung von EM-Proben und Datenauswertung

Für die strukturelle Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie wurden im Rahmen der Probenherstellung Karbon-Gitter eingesetzt (*Electron Microscope Sciences*). Die Gitter wurden zunächst mit einem Plasma-Reiniger behandelt und anschließend mit 5 μl des entsprechenden Ansatzes beschichtet. Nach 5-sekündiger Inkubation wurden die Proben 2-mal mit H_2O gewaschen und mit Uranylformiat fixiert. Die Proben wurden für 5 Minuten luftgetrocknet und standen anschließend zur Verwendung bereit. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einem CM100-Transmissions-Elektronenmikroskop der Firma Philips gemacht, das mit einer 4 Megapixel-Kamera (AMT, Woburn, Massachusetts, U.S.A.) ausgestattet war. Die Verdünnung der Ansätze auf eine Konzentration zwischen 100 und 200 μM erfolgte unter Verwendung des BRB80-Puffers. Bei höheren Proteinkonzentrationen war das Gitter mit Protein überbeschichtet, so dass keine einzelnen Partikel detektiert werden konnten. Um *Severing*-Ereignisse im Mikrotubulus-Filament studieren zu können, wurden in Gegenwart von 1 mM ATP Wildtyp-Spastin/Katanin-Konzentrationen im nanomolaren Bereich zu einer konstanten Menge an Tubulin hinzugegeben. Für die Visualisierung hexamerer Strukturen mussten die inaktiven Walker B-Mutanten hochkonzentriert vorinkubiert werden. Kurz vor dem Pipettieren der Ansätze auf die Karbon-Gitter erfolgte deren Verdünnung in den pikomolaren Bereich - durch diese Strategie blieben die Ringstrukturen stabil. Zumeist wurden Konzentrationen zwischen 20 und 40 μM in Anwesenheit von 1 mM ATP verwendet. Für das Partikel-*Averaging* wurden elektronenmikroskopische Bilder herangezogen und mit dem Programm EMAN2 (<http://blake.bcm.edu/emanwiki/>) ausgewertet. Für die Erstellung einer Molekül-Klasse wurden zwischen 500 und 2000 Partikel ausgewählt. Für die Analyse diverser Strukturen wurde die Option EMAN2-*Picker* aktiviert. Nach der Auswahl eines Primär-Partikels konnten durch diese Funktion Partikel mit ähnlicher Form und Größe automatisch detektiert und in einen *Pool* transferiert werden. Aus diesem *Pool* wurden deformierte Partikel und solche mit schlechter Qualität entfernt. Durch diese nachträgliche Modifikation konnte eine sehr hohe Mittelungsqualität herbeigeführt werden.

I.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung I. 1: Aufbau eines Spektralphotometers.	24
Abbildung I. 2: Schema des verwendeten gekoppelten enzymatischen Tests. ...	25
Abbildung I. 3: Schematische Darstellung des TIRF-Mikroskops und Prinzip der Totalreflexion.	29
Abbildung I. 4: TIRF-Versuchsaufbau.	30
Abbildung I. 5: Schematischer Aufbau eines TEMs mit Strahlengang.	33

I.6 Literaturverzeichnis

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Kibbe, W. A. (2007). "OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator." *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W43-46.
- Reisner, A. H., P. Nemes, et al. (1975). "The use of Coomassie Brilliant Blue G250 perchloric acid solution for staining in electrophoresis and isoelectric focusing on polyacrylamide gels." *Anal Biochem* **64**(2): 509-516.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**(4839): 487-491.

II Einleitung

II.1 *Severing* von Mikrotubuli

Mikrotubuli sind dynamische zytoskelettale Polymere, die wichtige Aufgaben in Zellteilung, Morphogenese und Motilität erfüllen. Um adäquat funktionieren zu können, müssen sich Mikrotubuli in eine Reihe höherer Strukturen assemblieren, welche sehr dynamisch einer kontinuierlichen Umgestaltung unterworfen sind (Mitchison und Kirschner 1984). Damit wird sichergestellt, dass die Zelle in ihren wechselnden Phasen durch Mikrotubuli stabilisiert werden kann. Diese Plastizität wird hauptsächlich von einer Gruppe regulatorischer Proteine herbeigeführt, die durch Bindung das dynamische Verhalten von Mikrotubuli beeinflusst. Die meisten dieser Mikrotubuli-Regulatoren – die Mikrotubuli-destabilisierende Kinesin-13 Familie und das polymerisationsfördernde End-Bindeprotein (EB1), (Gouveia und Akhmanova 2010) inbegriffen – realisieren ihre Funktion an den Enden von Mikrotubuli. Eine weitere Gruppe von Proteinen, bekannt als Mikrotubuli-schneidende Enzyme, arbeiten, indem sie Mikrotubuli in kleine Fragmente zersetzen (Vale 1991; Roll-Mecak und Vale 2005; Mukherjee, Valencia et al. 2012). *In vitro* Beobachtungen deuten darauf hin, dass die *Severing*-Aktivität besonders für den schnellen Abbau des Mikrotubuli-Netzwerks geeignet ist, da der Endpunkt der *Severing*-Reaktion gleichzeitig den vollständigen Abbau von Mikrotubuli darstellt (Vale 1991; McNally und Vale 1993). Allerdings ist das Schicksal geschnittener Mikrotubuli innerhalb des zellulären Milieus komplexer, da die zellulären Funktionen der *Severing*-Enzyme *in vivo* wesentlich umfangreicher sind. Forschungsergebnisse der letzten Jahre unterstützen die Ansicht, dass Mikrotubuli-schneidende Enzyme frequentiert in aufbauende Prozesse involviert sind, beispielsweise als Initiatoren des Mikrotubulus-Wachstums, der Freisetzung von Mikrotubuli aus Nukleationsstellen und dem Transport zwischen unterschiedlichen Domänen innerhalb der Zelle (Baas, Karabay et al. 2005; Roll-Mecak und McNally 2010). In anderen Fällen spielen *Severing*-Proteine in der Regulation und dem Aufbau von Mikrotubuli-Enden eine tragende Rolle (Diaz-Valencia, Morelli et al. 2011; Zhang, Grode et al. 2011).

II.1.1 Mikrotubuli-schneidende Enzyme

Bisher konnten drei Klassen von Mikrotubuli-schneidenden Enzymen identifiziert werden: Katanin, Spastin und Fidgetin. Die Entdeckung und Charakterisierung der drei *Severing*-Enzyme erfolgte auf unterschiedlichen Wegen. Katanin wurde dabei als erstes Protein mit Mikrotubuli-schneidender Funktion identifiziert (Vale 1991) und später aus Seeigel-Eiern aufgereinigt. Dort existiert das Protein als Hetero-Dimer, bestehend aus einer 60-kDa AAA-Domäne mit katalytischer Aktivität (*p60*, KATNA1) und einer 80-kDa Untereinheit (*p80*, KATNB1), die regulatorische Aufgaben wahrnimmt (McNally und Vale 1993). Es stellte sich heraus, dass Katanin *p60* und *p80* in Tieren, höheren Pflanzen und Protozoen hochkonserviert ist. Viele Organismen, darunter *Drosophila melanogaster* und der Mensch, besitzen zusätzliche Katanin-*p60* ähnliche Proteine (Roll-Mecak und McNally 2010). Im Gegensatz zu Katanin wurde Spastin lange vor seiner Identifizierung als Mikrotubulus-schneidendes Protein studiert. Dies lag daran, dass das Protein mit der neurodegenerativen Krankheit HSP (hereditäre spastische Paraplegie) im Zusammenhang steht, die durch Degeneration von Axonen im peripheren Nervensystem hervorgerufen wird. Primäres Symptom ist eine fortschreitende Lähmung der unteren Extremitäten. Der hauptsächliche Auslöser der autosomal-dominanten HSP (Hazan, Fonknechten et al. 1999) liegt in diversen Mutationen innerhalb des Spastin-Gens. Es wurde entdeckt, dass Spastin zudem mit einer Reihe von Bindepartnern interagieren kann, die seine Aktivität bei der Ausübung zellulärer Aufgaben stark modifizieren können (Errico, Claudiani et al. 2004; Sanderson, Connell et al. 2006). Die Entdeckung von Fidgetin begann in den 1940er Jahren, als eine spontane Mutation in einem Bestand von Mäusen zu einem unkontrollierten Kopfschütteln führte, was als Zappelphillip- (= *fidget*) Phänotyp bezeichnet wurde (Carter und Gruneberg 1950). Mäuse mit derartigem Phänotyp zeigen ausgeprägte Defekte des Gehörsinns, eine degenerierte Augen- und Skelettentwicklung mit frequentiertem Auftreten einer Gaumenspalte (Wallace 1950; Yang, Mahaffey et al. 2006). Nahezu 60 Jahre nach dieser Entdeckung konnte gezeigt werden, dass die pleiotropen Effekte durch eine einzelne Retrotransposon-Insertion im zweiten Intron des Fidgetin-Lokus hervorgerufen werden. Das Protein wurde schließlich in Fidgetin umbenannt (Cox, Mahaffey et al. 2000). Überexpression von *Drosophila* Fidgetin in Gewebekultur-Zellen führt zur Zerstörung zellulärer Mikrotubuli (Zhang, Rogers et al. 2007). Dies war ein Indikator dafür, dass es sich dabei um ein Mikrotubulus-schneidendes Protein handelt. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass auch humanes Fidgetin *in vitro* Mikrotubuli unter ATP-Hydrolyse abbauen kann (Mukherjee, Valencia et al. 2012). Vertebraten enthalten zusätzlich zwei Fidgetin-ähnliche Proteine, FIGNL1 und FIGNL2, deren Funktionen bisher noch nicht identifiziert werden konnten (Cox, Mahaffey et al. 2000).

II.2 AAA-Proteine

AAA-Proteine (*ATPases associated with various cellular activities*) wurden erstmals in den 1990er Jahren untersucht. Dabei wurde eine Untergruppe von P-Loop ATPasen auf die Homologie ihrer ATP-Bindedomäne hin definiert. Diese Proteine sind von Prokaryoten bis zum Menschen hochkonserviert und stellen wichtige makromolekulare Maschinen dar. Dabei nutzen sie die aus der ATP-Hydrolyse erhaltene Energie, um ihre Zielsubstrate auf unterschiedlichen Wegen umzubauen. So sind AAA-ATPasen in Aufgabenbereiche wie Membranfusion, Proteinabbau und DNA-Replikation involviert. Während AAA-Proteine eine hochkonservierte ATPase-Domäne besitzen, welche zumeist am C-Terminus lokalisiert ist, zeigen andere Regionen nur eine geringe Ähnlichkeit. Im Folgenden werden AAA-Proteine hinsichtlich ihrer Funktionen näher beleuchtet.

II.2.1 Konservierte Funktionen der AAA-Domäne

Die Mitglieder der AAA-ATPasen weisen mehrere konservierte Struktur motive auf. Diese beinhalten neben Sequenzen, die für die ATPase-Aktivität essentiell sind, zwei weitere Motive. Letztere Regionen sind nicht unmittelbar an der Ausprägung der ATPase-Aktivität beteiligt, verfügen aber über Sequenzabschnitte innerhalb der AAA-Domäne: *N-Linker*, welcher die Energie aus der ATP-Hydrolyse zum Rest des Proteins weiterleiten kann und Schleifen, die die Pore des AAA-Oligomers auskleiden (Wang, Song et al. 2001; Yamada-Inagawa, Okuno et al. 2003; Lum, Tkach et al. 2004; Schlieker, Weibezahn et al. 2004; Siddiqui, Sauer et al. 2004; Smith, Contreras-Moreira et al. 2004). Manche AAA-Proteine, wie zum Beispiel der *N-Ethylmaleimide-Sensitive* Faktor (NSF) besitzen zwei AAA-Domänen pro Monomer (als D1 und D2 bezeichnet), während andere Vertreter (z.B. Spastin) nur eine Domäne aufweisen. Mitglieder dieser Familie bilden hauptsächlich Hexamere, die in Form von Ringstrukturen mit einer zentralen Pore auftreten. Die ATPase-Domäne der AAA-Proteine umfasst eine Länge von 200-250 Aminosäuren und wird von mehreren Domänen charakterisiert, die für ATP-Bindung und Hydrolyse erforderlich sind. Zu diesen wichtigen Domänen gehören der Walker A P-Loop, das Walker B-Motiv, *Sensor-1* und *Sensor-2* Regionen sowie der Arginin-Finger. Die konservierten Stellen sind in zwei Sub-Domänen lokalisiert, einer großen AAA-Domäne, die auf einer Rossman-Faltung basiert, und einer kleinen AAA-Domäne, die hauptsächlich α -helikale Elemente zeigt (Iyer, Leipe et al. 2004). Bindung und Hydrolyse von ATP werden für die Umgestaltung ihrer Substrate benötigt. Wie der Umsatz von ATP an Oligomerisierung, Konformationsänderung und Substratumsatz gekoppelt ist, ist nicht allgemein bekannt. Die ATP-Bindetasche wird im aktiven Ringzustand des

AAA-Proteins von Aminosäureresten benachbarter Monomere gebildet, so dass ATP-Bindung die Oligomerisierung mancher AAA-Proteine regulieren könnte. Die Stabilität der oligomeren Strukturen scheint unter den AAA-Domänen stark zu variieren. Oligomerisierung eröffnet auch den Weg zur kooperativen ATP-Hydrolyse. Dieses Phänomen konnte bei einigen AAA-Proteinen, beispielsweise Hsp104 und p97/VCP, beobachtet werden (Hattendorf und Lindquist 2002; DeLaBarre, Christianson et al. 2006).

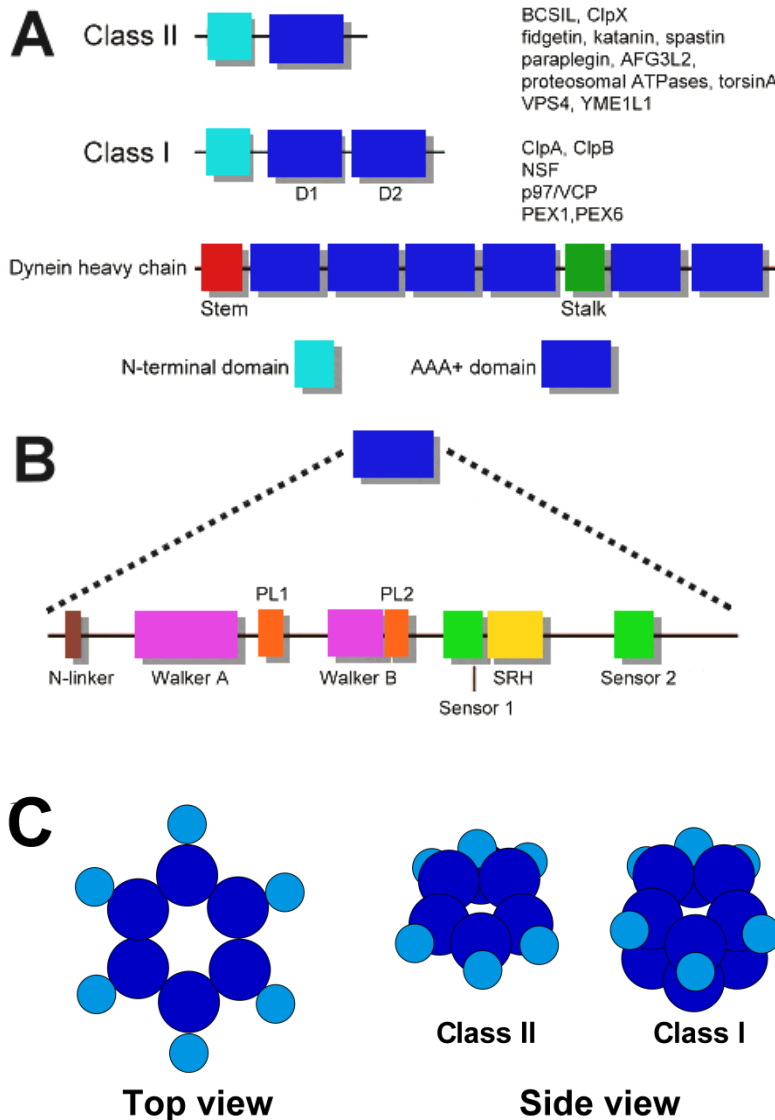


Abbildung II. 1: Konservierte Funktionen der AAA-Proteine.

(A) Aufbau der Domänen. Klasse II AAA-Proteine besitzen eine AAA-Domäne, während Klasse I AAA-Proteine über zwei AAA-Domänen als Tandem in einem Polypeptid verfügen. Einige untypische AAA-Proteine, zu denen beispielsweise Dynein gehört, haben 6 kovalent miteinander verbundene Domänen.

(B) Hochkonservierte Motive mit N-Linker, Walker A und Walker B sowie den Schleifen (Pore Loops 1/2).

(C) Oligomerisierung. Die aktive Struktur der meisten AAA-Proteine stellt eine Hexamerstruktur dar. AAA-Proteine mit zwei ATPase-Domänen sind gestapelt oder treten als Doppelringstrukturen auf.

(Abbildung modifiziert nach White und Lauring 2007)

II.2.2 Zellbiologische Funktionen der AAA-Proteine

AAA-Proteine sind in viele Aufgaben zellulärer Prozesse involviert. Im Folgenden werden die Proteine in drei Kategorien eingeteilt, um zu illustrieren, wie AAA-Proteine einen gemeinsamen Mechanismus für die Erfüllung verschiedener Aufgaben nutzen. Die zwei größten Kategorien sind Mitglieder der AAA-Familie, die Proteinkomplexe umgestalten ohne diese entfalten oder zerstören zu müssen sowie Proteine, die für die Kontrolle der Proteinqualität zuständig sind und Entfaltungsprozesse realisieren. Die dritte Gruppe beherbergt AAA-Proteine, die in der Lage sind mit Mikrotubuli zu assoziieren, um beispielsweise Transportprozesse am Substrat ausüben zu können.

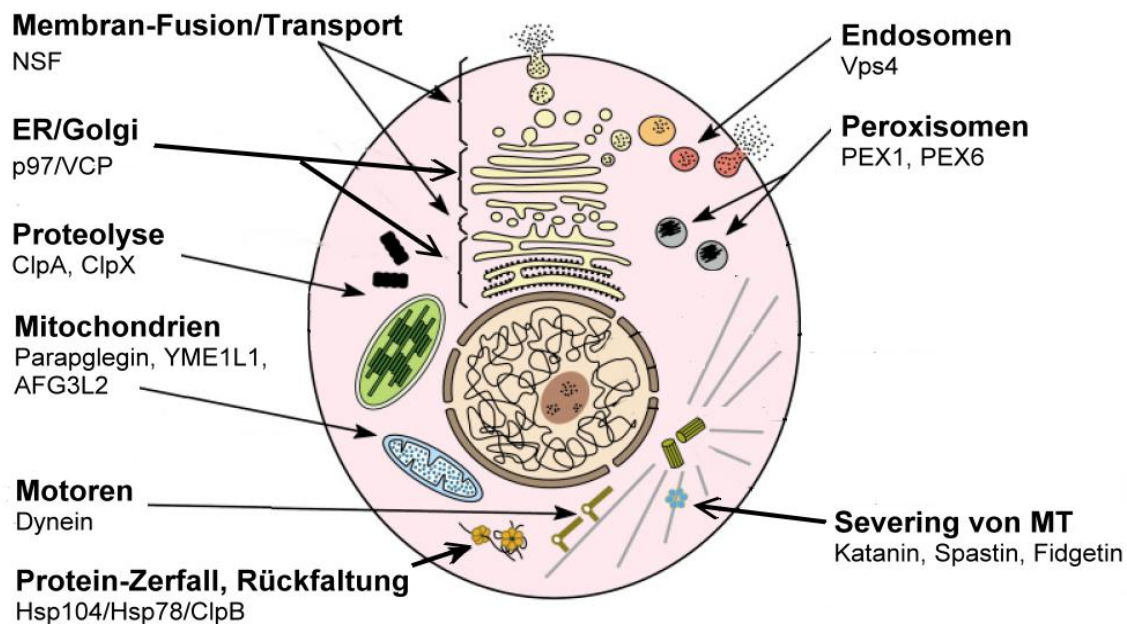


Abbildung II. 2: Subzelluläre Lokalisation der AAA-Proteine.

Das Diagramm zeigt die Verteilung der entsprechenden AAA-Proteine innerhalb der Zelle. (Abbildung modifiziert nach Ogura und Wilkinson 2001)

II.2.2.1 Recycling

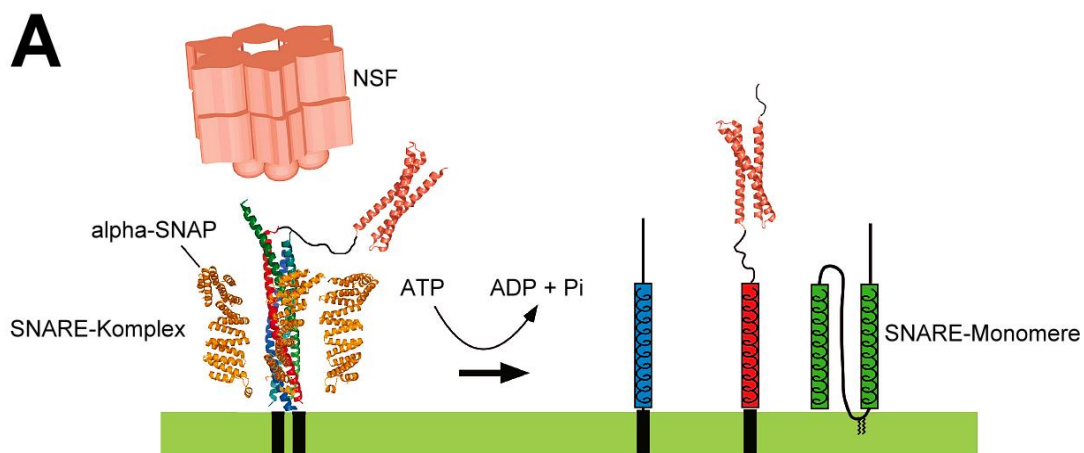
Zerlegung und Abbau von Proteinkomplexen durch AAA-Proteine spielen für zahlreiche zellbiologische Funktionen, wie Membran-Dynamik und Assemblierung von Organellen, eine sehr wichtige Rolle. In diesen Fällen wird das Zielprotein nicht vollständig entfaltet sondern vielmehr aus einem größeren Komplex funktionsfähig entfernt (*Recycling*), damit es für spätere Vorgänge wieder Verwendung finden kann. NSF war eines der ersten eukaryotischen AAA-Proteine, welches bis ins Detail studiert worden ist. NSF ist ein essentieller Bestandteil im vesikulären Transport (Block, Glick et al. 1988). Es konnte gezeigt werden, dass NSF den

Abbau von *cis*-SNARE Komplexen induziert. Dadurch werden freie SNAREs regeneriert, welche für die Fusion von Vesikeln und Membranen eingesetzt werden können (Ungermann, Nichols et al. 1998). Ein weiterer Vorgang innerhalb der Membrandynamik stellt die Knospung in das Lumen von Endosomen dar. Dieser Vorgang erfordert das Mitwirken eines weiteren AAA-Proteins, Vps4. Diese Variante ist bei der Disassemblierung des ESCRT-III Komplexes in Endosomen entscheidend, da es für den intralumenalen Vesikel-aufbau zuständig ist. In anderen Fällen sind zwei AAA-Abbau Maschinen im Bereich der Biogenese von Organellen beteiligt. PEX1 und PEX6 sind in den Rekrutierungsprozess peroxisomaler Matrixproteine eingebunden. Viele dieser Proteine besitzen eine Peroxisomen-Zielsequenz (PTS), an die ein Rezeptor bindet. PEX1 und PEX6 bilden einen Komplex, welcher für den Rücktransport des PTS-Rezeptor Komplexes zum Zytosol erforderlich ist. Damit steht der Rezeptor für weitere Importvorgänge zur Verfügung (Platta, Grunau et al. 2005).

II.2.2.2 Qualitätskontrolle

Zahlreiche AAA-Proteine sind bei der Regulation von Entfaltungs-, Rückfaltungs- oder proteolytischen-Prozessen beteiligt. Dies betrifft Proteine, die entweder geschädigt sind, für den Abbau markiert wurden oder posttranslational modifiziert werden müssen. Einige AAA-Proteine fungieren sogar als Chaperone. Beispielsweise dissoziiert ClpB, das zur Clp/Hsp 100 Familie gehört, Polypeptide aus Aggregate. Anschließend werden die Peptide entfaltet, so dass sie mit Co-Chaperonen, beispielsweise dem DnaK-Komplex interagieren können, um eine Rückfaltung zu erhalten (Goloubinoff, Mogk et al. 1999). Weitere Mitglieder derselben Gruppe, ClpA und ClpX, binden an die ringförmige Protease ClpP. Diese AAA-Proteine entfalten Proteinkomplexe indem sie ihre Substrate durch die zentrale Pore in die Protease hinein bewegen. Eine derartige Kombination aus Entfaltungseinheit und Protease stellt sicher, dass nur von ClpA und ClpX erkannte Substrate degradiert werden können (Hoskins, Pak et al. 1998; Kim, Burton et al. 2000). Auf demselben Weg erhalten AAA-Proteine, welche die Kappen des 26S Proteasoms bilden, Zutritt zur proteolytisch aktiven Einheit (Glickman, Rubin et al. 1998). Die innere mitochondriale Membran beherbergt zwei Proteasen, die aufgrund ihrer Eigenschaften einzigartig sind. In diesem Fall sind die AAA- und Peptidase-Domänen auf der gleichen Polypeptidkette zu finden. Diese nahe miteinander verwandten Proteasen unterscheiden sich allerdings deutlich in ihrer Topologie: die m-AAA Protease zeigt in die Richtung der Matrix während die i-AAA Protease zum intermembranen Raum gerichtet ist. Zusätzlich zu ihrer Funktion als Schneidewerkzeuge für mitochondriale Proteine sind sie auch im Bereich der Qualitätskontrolle beteiligt. So werden respiratorische Kettenkomplexe überprüft und nicht assemblierte Membranproteine abgebaut. Die m-AAA Protease besteht aus zwei AAA-Proteinen, Paraplegin und

AFG3L2 (Casari, De Fusco et al. 1998; Banfi, Bassi et al. 1999). Für die Entwicklung zahlreicher wichtiger mitochondrialer Proteine, wie zum Beispiel OPA1, ist eine posttranslationale Modifikation durch die Protease erforderlich (Ishihara, Fujita et al. 2006). Paraplegin kann auch durch Membran-Dislokation die Entwicklung von Proteinen kontrollieren. Dies geschieht sogar häufiger als über den alternativen Weg der Proteolyse. Es konnte gezeigt werden, dass Paraplegin die Cytochrom-C-Peroxidase in der Membran korrekt positionieren kann (Tatsuta, Augustin et al. 2007). Dort findet eine intramembrane Modifikation statt, die durch eine weitere Protease durchgeführt wird. Die mitochondriale i-AAA Protease besteht ebenfalls aus einem AAA-Protein, YMEIL1, das zur Homooligomerisation befähigt ist (Coppola, Pizzigoni et al. 2000). Diese Protease erfüllt eine Funktion in der Translokation der Polynukleotid-Phosphorylase in den Intermembranen Bereich (Rainey, Glavin et al. 2006). Ein weiteres AAA-Protein, das p97/Valosin-enthaltende Protein (VCP), ist im Bereich der Qualitätskontrolle tätig. Um sicherzustellen, dass ausschließlich richtig gefaltete Proteine in den sekretorischen Signalweg eingespeist werden, erfolgt die Aussonderung fehlgefalteter Proteine aus dem ER. Diese werden mit zahlreichen Ubiquitinen markiert, so dass schließlich ein Abbau durch Proteasomen erfolgt (Ye, Meyer et al. 2001). P97/VCP enthält eine Ubiquitin-Bindedomäne und liefert für einige Substrate die treibende Kraft für Membran-Dislokationen. P97/VCP übernimmt weiterhin Funktionen in der Aufrechterhaltung des ERs und der Re-Assemblierung des Golgi-Apparates nach der Mitose (Latterich, Frohlich et al. 1995; Rabouille, Levine et al. 1995; Hetzer, Meyer et al. 2001). P97/VCP realisiert diese unterschiedlichen Funktionen durch die Interaktion mit einer Reihe von Adapter-Proteinen (Ye 2006). Im Zuge des Abbaus im endoplasmatischen Retikulum bildet p97/VCP einen Komplex mit Ufd1 und Npl4, während es für die Membranfusion mit p47 interagiert (Latterich, Frohlich et al. 1995; Rabouille, Levine et al. 1995; Ye, Meyer et al. 2001).



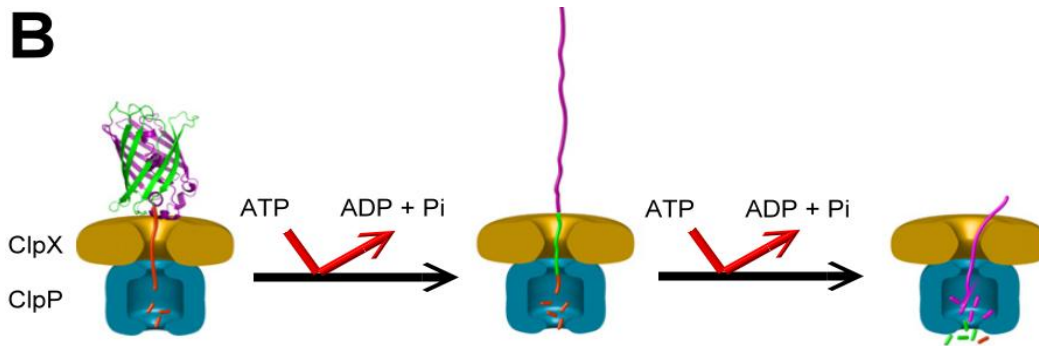


Abbildung II. 3: AAA-Proteine verwenden ähnliche Mechanismen um unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle auszuüben.

(A) Recycling. NSF ist in den Abbauprozess des *Coiled-Coil* SNARE-Komplexes involviert, welcher durch Vesikel-Fusion entsteht. Aus dem Komplex entfernte SNAREs stehen für weitere Fusionszyklen zur Verfügung.

(Abbildung modifiziert nach Winter, Chen et al. 2009)

(B) Qualitätskontrolle. Bestimmte AAA-Proteine, beispielsweise ClpX, entfalten Proteine und führen diese einer assoziierten Protease zu.

(Abbildung modifiziert nach Maillard, Chistol et al. 2011)

II.2.2.3 Mikrotubuli-assoziierte AAA-Proteine

Eines der am besten untersuchten AAA-Proteine ist das cytoplasmatische Dynein. Dynein ist ein zum Mikrotubulus Minus-Ende gerichtetes Protein, welches zahlreiche zelluläre Bestandteile transportiert und unterschiedlichste Prozesse, darunter Transport von Vesikeln und Organellen, Aufrechterhaltung des Golgi-Apparates und Orientierung der Mitosespindel, ermöglicht (Schroer, Steuer et al. 1989; Corthesy-Theulaz, Pauloin et al. 1992; Li, Yeh et al. 1993). Die schwere Kette von Dynein ist ein untypisches AAA-Protein, da seine sechs Untereinheiten auf einem einzigen Polypeptid zusammengefasst sind. Zudem ist ungewöhnlich, dass nur vier der sechs AAA-Domänen eine Walker A Konsensus-Sequenz besitzen, die für Nukleotidbindung erforderlich ist (Hattendorf und Lindquist 2002). Dynein bindet mit seinem „Stiel“, der zwischen der vierten und fünften Domäne lokalisiert ist, unter Einfluss von ATP an Mikrotubuli (Goodenough und Heuser 1984; Gee, Heuser et al. 1997; Koonce und Tikhonenko 2000). Der N-terminale Bereich der schweren Kette, der als „Stamm“ bezeichnet wird, bindet zahlreiche akzessorische Proteine (Habura, Tikhonenko et al. 1999; Tynan, Gee et al. 2000). Bewegungen in „Stamm“, „Ring“ und „Stiel“ generieren einen Kraftschlag, der Dynein zur Fortbewegung befähigt (Oiwa und Sakakibara 2005). Im Wesentlichen wurde dies durch die Kristallstruktur bestätigt (Carter, Cho et al. 2011; Kon, Oyama et al. 2012). Eine weitere wichtige Gruppe Mikrotubuli-assoziiierter Proteine stellen die bereits vorgestellten *Severing*-Proteine mit den Vertretern Spastin, Katanin und Fidgetin dar.

II.2.3 Modelle für die Koordination der Untereinheiten

Da AAA-Oligomere mehrere ATPase-Domänen beinhalten, stellt sich die Frage, auf welche Weise die ATP-Hydrolyse zwischen den Untereinheiten koordiniert ist. Eine Möglichkeit besteht darin, dass eine zirkuläre Struktur AAA-Proteine dazu befähigt, als rotierende Motoren zu arbeiten. Diese zeigen der Ringstruktur entlang sequentielle ATP-Hydrolyse, wodurch das Substrat tiefer in die Pore befördert wird (Mancini, Kainov et al. 2004). Allerdings sind auch andere Varianten der ATP-Hydrolyse möglich, die eine konzertierte Hydrolyse in allen Untereinheiten zeigen. Zusätzlich ist zu bedenken, dass sich nicht alle in einem Hexamer lokalisierten ATP-gebundenen Untereinheiten im selben Stadium des Hydrolysezyklus befinden müssen (Hersch, Burton et al. 2005). Martin et al. konnten durch die Fusion von sechs Monomeren die ATP-Hydrolyse im Hexamer untersuchen. Sie zeigten, dass ClpX für die Translokationsaktivität lediglich ein Monomer mit ATPase-Aktivität erfordert. Für den Fall, dass mehrere aktive Monomere zur Verfügung standen, konnten diese für die Ausführung der Funktion eine beliebige Stelle innerhalb des Rings einnehmen. Dies ist ein Indikator dafür, dass ClpX hinsichtlich der ATP-Hydrolyse weniger eine organisierte als vielmehr eine unkoordinierte Aktivität der Untereinheiten favorisiert. Dies ist für Proteine mit vielen unterschiedlichen Substraten vorteilhaft. Sobald ein Monomer mit dem entsprechenden Substrat in Kontakt tritt, wird ATP-Hydrolyse induziert, wodurch die Anzahl unproduktiver Hydrolyseschritte limitiert wird (Martin, Baker et al. 2005). Doyle et al. haben für ClpB und Hsp104 ATP-Hydrolyse in unterschiedlichen Untereinheiten der Ringstruktur analysiert. Es wurde gezeigt, dass durch die Bindung des ATP- γ S an ATP-Bindestellen – was eine Verlangsamung der Hydrolyse zur Folge hat – ClpB und Hsp104 unabhängig von Chaperonen arbeiten können, die sie unter normalen Bedingungen benötigen würden. Die Autoren interpretieren das Ergebnis folgendermaßen: der Vorgang illustriert den Unterschied zwischen dem Festhalten eines Substrats, welches ATP-Bindung erfordert und Entfaltung, die ATP-Hydrolyse benötigt. Womöglich erlaubt die Bindung von ATP- γ S die Kopplung eines Substrats ohne die Unterstützung eines Chaperons (Doyle, Shorter et al. 2007).

II.2.4 Regulation der AAA-Proteine: Adapter-Proteine

Alle AAA-Proteine besitzen Domänen ausserhalb der AAA-Region, die für ihre zelluläre Funktion entscheidend sind. Betrachtet man die Gemeinsamkeiten der AAA-Proteine so stellt sich die Frage, wie diese funktionelle Spezifität erlangen können. Die Antwort dieser Frage liegt höchstwahrscheinlich in ihrer kaum konservierten N-terminalen Domäne, die für die Interaktion mit Adapter-Proteinen Verwendung findet. So bindet Spastin über seine N-terminale Domäne an Atlastin, welches Spastin zum Golgi-Apparat lokalisiert (Evans, Keller et al. 2006). Vps4 bewegt sich durch die Interaktion mit CHMP1B/Did2 zu den Endosomen. Der AAA-Komplex reguliert zudem die Dissoziation des ESCRT-III-Komplexes (Nickerson, West et al. 2006; Zhang, Rogers et al. 2007). Dynein stellt ein AAA-Protein dar, welches mit einer Vielzahl von Adapter-Proteinen wechselwirkt. Zusätzlich zur Interaktion der schweren Kette mit anderen Ketten zeigt Dynein auch Wechselwirkungen mit Dynactin, LIS1 und einer großen Anzahl weiterer Proteine. Dadurch wird gewährleistet, dass seine zahlreichen zellbiologischen Funktionen adäquat ausgeübt werden können (Collins und Vallee 1989; Hirokawa, Sato-Yoshitake et al. 1990; Holzbaur, Hammarback et al. 1991; Faulkner, Dujardin et al. 2000; Smith, Niethammer et al. 2000). Zudem wurden Adapterproteine gefunden, die durch Bindung an einmalig auftretenden Stellen innerhalb der AAA-Domäne die ATPase-Aktivität regulieren können. In Hefe bindet Vta1 an die Vps4- β -Domäne und stabilisiert dadurch das Vps4-Oligomer (Azmi, Davies et al. 2006; Zhang, Rogers et al. 2007). Diese erhöhte Stabilität stimuliert die ATPase-Aktivität von Vps4. Umgekehrt wirkt sich *in vivo* der Verlust von Vta1 negativ auf die Vps4-Funktion aus (Azmi, Davies et al. 2006; Lottridge, Flannery et al. 2006). Cdc48, das Hefe-Homolog zu p97/VCP, bindet über seine D2-Domäne an die zwei Adapterproteine Ufd2 und Ufd3. Diese konkurrieren um die gleiche Bindestelle in Cdc48 und besitzen entgegengesetzte Aktivitäten. Während Ufd2 durch das Anhängen von Ubiquitin-Resten den Abbau-Prozess fördert, verhindert Ufd3 die Degradation (Rumpf und Jentsch 2006).

II.2.5 AAA-Proteine und Krankheiten

Die wichtige Rolle der AAA-Proteine in zellulären Arbeitsabläufen zeigt sich anhand der großen Anzahl unterschiedlicher Krankheiten, die sich durch Funktionsstörungen innerhalb der AAA-Proteine ausprägen können. Der erste Krankheitstypus, welcher durch AAA-Mutanten hervorgerufen wird, betrifft Prozesse innerhalb des Entwicklungsstadiums. Die Auswirkungen sind gravierend und treten bereits im Kindesalter auf. Während für zytoplasmatisches Dynein beim Menschen bisher wenige genetische Krankheiten gefunden wurden (Harms,

Ori-McKenney et al. 2012), verursacht eine Mutation im stark verwandten axonemalen Dynein Ziliendyskinesie (Olbrich, Haffner et al. 2002). Drei Proteine, die in die Assemblierung von Organellen involviert sind, führen bei Fehlfunktion ebenfalls zu Erkrankungen. Sowohl PEX1 als auch PEX6 sind für den Proteinimport in die Matrix der Peroxisomen beteiligt. Ihr Funktionsverlust führt zum Zellweger-Syndrom, das im Säuglings- oder Kindesalter zu gravierenden Fehlfunktionen in zahlreichen Organen führt (Fukuda, Shimozawa et al. 1996; Yahraus, Braverman et al. 1996; Portsteffen, Beyer et al. 1997; Reuber, Germain-Lee et al. 1997). Mutationen in BCS1L, ein Chaperon das für den Aufbau von Komplex-III in Mitochondrien benötigt wird, führt zu drei unterschiedlichen autosomal-rezessiven Krankheitsbildern. Diese Krankheiten, bezeichnet als Komplex III-Defizienz, GRACILE-Syndrom und Bjornstad-Syndrom, beinhalten organische Anomalien und führen im Kindesalter häufig zum Tod. Während *Nonsense*- und *Frameshift*-Mutationen in allen drei Phänotypen registriert wurden, besitzen Patienten mit dem abgeschwächten Bjornstad-Syndrom zumindest ein Allel, das teilweise funktionsfähig ist. Mutationen in der AAA-Domäne, die für das Auftreten des GRACILE-Syndroms und der Komplex III-Defizienz verantwortlich sind, befinden sich an Stellen, welche mit ATP und Magnesium interagieren. Im Gegensatz dazu verlagern sich Mutationen, die das Bjornstad-Syndrom auslösen können, an äußere Regionen der AAA-Domäne, wodurch Protein-Protein-Interaktionen wahrscheinlich verhindert werden (Hinson, Fantin et al. 2007). Der zweite Krankheitstypus, der durch Mutationen in AAA-Proteinen hervorgerufen wird, betrifft primär das neuronale System. Eine Mutation im TOR1A-Lokus führt zur Inhibition der Ausbildung des TorsinA Proteins und resultiert in einer Torsions-Dystonie. Diese Krankheit tritt im Kindesalter auf und ist durch krankhafte Drehbewegungen gekennzeichnet (Ozelius, Hewett et al. 1997). TorsinA ist ein peripheres Membranprotein, das im Lumen des endoplasmatischen Retikulums und in der Kernpore gefunden wurde (Kustedjo, Bracey et al. 2000; Liu, Zolkiewska et al. 2003). Seine Funktion wurde bisher nur sehr vage charakterisiert. Im ATP-gebundenen Zustand ist TorsinA in der Kernhülle lokalisiert, so dass davon ausgegangen wird, dass sein Substrat in diesem Areal angelagert ist (Naismith, Heuser et al. 2004). Die mutierte Version ($\Delta E302/3$) führt in der Kernhülle zu destruktiven Vorgängen (Goodchild und Dauer 2004). Zwei homologe Transmembran-Proteine wurden identifiziert, die mit TorsinA interagieren. Es handelt sich dabei um das Lamina-Polypeptid 1, das in der Kernhülle ansässig ist sowie um LULL1 im endoplasmatischen Retikulum. Beide Versionen stellen potentielle Substrate für TorsinA dar (Goodchild und Dauer 2005).

Zwei Formen von hereditärer spastischer Paraplegie werden durch veränderte AAA-Proteine verursacht. Bei Patienten treten dabei fortschreitende Degenerationserscheinungen an Axonen spinaler Neuronen auf. Dadurch kommt es zu gravierenden Lähmungserscheinungen. HSP wird durch Mutation oder Deletion

des Spastin-Gens hervorgerufen (Casari, De Fusco et al. 1998; Hazan, Fonknechten et al. 1999). Spastin besitzt eine Funktion in der mitotischen Spindel, seine primäre Funktion liegt aber in der Bildung von nicht-zentrosomalen Mikrotubuli, die für den Erhalt spezialisierter axonemaler Mikrotubuli-Felder essentiell sind (Baas und Joshi 1992). Mutationen in Paraplegin, eine Untereinheit der mitochondrialen m-AAA ATPase, führt ebenfalls zu HSP. Es konnte gezeigt werden, dass Paraplegin für zwei Funktionen erforderlich ist, die bei Ausfall zur Degeneration von Axonen führen. Paraplegin erfüllt eine wichtige Funktion in der Qualitätskontrolle und sichert die Aufrechterhaltung der respiratorischen Funktionsfähigkeit (Rugarli und Langer 2006). Neuere Studien haben gezeigt, dass Paraplegin eine zusätzliche Funktion im respiratorischen Bereich übernimmt. Es ist in der Lage mitochondriale Zielsequenzen zu schneiden. Dies betrifft beispielsweise MrpL32, eine Untereinheit mitochondrialer Ribosomen. Somit wird Paraplegin für den korrekten Aufbau von Ribosomen benötigt (Nolden, Ehses et al. 2005). Ein weiterer Typus von Neurodegeneration wird durch Mutationen in p97/VCP hervorgerufen. Die Krankheit äußert sich durch eine Inclusion-Body Myopathie in Kombination mit einer Paget-Knochenkrankheit und fronttemporaler Demenz (IBMPFD) (Watts, Wymer et al. 2004). Die meisten zur IBMPFD führenden Mutationen in p97/VCP befinden sich in der N-terminalen Ubiquitin-Bindedomäne und eine dieser Mutationen beeinflusst ERAD (Weihl, Dalal et al. 2006). Dieser degenerative Prozess erfolgt über einen Signalweg, der mit dem endoplasmatischen Retikulum (ERAD) assoziiert ist. Die Beobachtungen deuten darauf hin, dass p97/VCP Störungsprozesse in ERAD initiieren kann. Ein derartig beeinflusster ERAD-Signalweg könnte zu aggregierten und fehlgefalteten Proteinen führen, wodurch degenerative Prozesse eingeleitet werden.

II.3 Hereditäre spastische Paraplegie (HSP)

II.3.1 Klinisches Bild

Der Name „hereditäre spastische Paraplegie“ bezeichnet eine Gruppe seltener, genetisch und klinisch heterogener Erkrankungen, die durch Degeneration der langen Axone des Cortikospinaltrakts gekennzeichnet ist (McDermott, White et al. 2000). Es können zwei klinische Formen von HSP unterschieden werden. Im Fall der reinen oder unkomplizierten Variante beschränken sich die Symptome auf die unteren Extremitäten. Die komplizierte Form wird dagegen von neurologischen Symptomen, wie Epilepsie, Demenz sowie Taubheit begleitet (Reid 1999). Die Erbgänge können bei beiden Formen sowohl autosomal-

rezessiv, autosomal-dominant als auch X-chromosomal gebunden sein (Harding 1981). Dabei stellt die autosomal-dominante HSP mit 70 bis 80 Prozent den größten Anteil an Erkrankungen. Wesentlich seltener kommt dagegen die autosomal-rezessive HSP mit einem Anteil von 20 Prozent vor. Die X-chromosomal rezessive Form tritt nur in Einzelfällen auf. Für die hereditäre spastische Paraplegie sind mehr als 40 Genloci bekannt (Klebe, Azzedine et al. 2006).

II.3.2 Autosomal-dominante HSP

Bei der autosomal-dominanten HSP handelt es sich um eine genetisch stark heterogene Form. 13 unterschiedliche Loci konnten bisher beschrieben werden, die für die Entstehung der autosomal-rezessiven HSP verantwortlich sind. SPG3 (Hazan, Lamy et al. 1993), SPG4 (Hazan, Fontaine et al. 1994), SPG6 (Rainier, Chai et al. 2003), SPG8 (Hedera, Rainier et al. 1999), SPG9 (Reid, Dearlove et al. 1999), SPG10 (Wharton, McDermott et al. 2003), SPG12 (Reid, Dearlove et al. 2000), SPG13 (Fontaine, Davoine et al. 2000), SPG17 (Patel, Hart et al. 2001), SPG19 (Valente, Brancati et al. 2002), SPG29 (Orlacchio, Kawarai et al. 2005), SPG31 (Zuchner, Kail et al. 2006) und SPG33 (Mannan, Krawen et al. 2006). SPG3 codiert für Atlastin, das als GTPase in der Familie der Dynamine fungiert. Das Genprodukt von SPG4 ist Spastin. Studien haben gezeigt, dass Spastin mit Atlastin interagieren kann. (Mannan, Krawen et al. 2006). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass SPG6 für einen Magnesium-Transporter (NIPA1) codiert (Goytain, Hines et al. 2007). Das Genprodukt von SPG10 stellt das Protein KIF5A dar (Ebbing, Mann et al. 2008), welches in der schweren Kette von Kinesin vorkommt und Aufgaben im axonalen Transportprozess wahrnimmt (Reid 2003). Das mitochondriale Chaperonin Cpn60 ist das Genprodukt von SPG13 (Hansen, Durr et al. 2002). Hazan et al. konnten 1999 das SPG4-Gen isolieren und durch Analysen feststellen, dass bei Patienten mit autosomal-dominanter Paraplegie Mutationen in diesem Gen manifestiert waren (Hazan, Fonknechten et al. 1999). In der Regel treten durch mutagene Prozesse im SPG4-Gen unkomplizierte Formen der HSP auf. Die anderen Varianten der autosomal-dominanten HSP sind schwächer frequentiert und bewegen sich im Bereich von weniger als zehn Prozent. Hinsichtlich dieser Loci tritt, analog zu SPG4, jeweils eine unkomplizierte Form der HSP auf. SPG9 bildet dabei eine Ausnahme im Krankheitsbild, da es in diesem speziellen Fall zur Entwicklung einer komplizierten Form der HSP kommt. Diese ist gekennzeichnet durch Katarakt, Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs und Skelettanomalien (Reid 1999).

II.3.3 Autosomal-rezessive HSP

Bisher konnten 15 Loci für die autosomal-rezessive Form der HSP in Verbindung gebracht werden. Zu ihnen gehören SPG5 (Hentati, Pericak-Vance et al. 1994), SPG7 (Casari, De Fusco et al. 1998), SPG11 (Fink, Wu et al. 1995), SPG14 (Vazza, Zortea et al. 2000), SPG15 (Hughes, Byrne et al. 2001), SPG20 (Patel, Cross et al. 2002), SPG21 (Simpson, Cross et al. 2003), SPG23 (Blumen, Bevan et al. 2003), SPG24 (Hodgkinson, Bohlega et al. 2002), SPG25 (Zortea, Vettori et al. 2002), SPG26 (Wilkinson, Simpson et al. 2005), SPG27 (Meijer, Cossette et al. 2004), SPG28 (Bouslam, Benomar et al. 2005), SPG30 (Hazan, Lamy et al. 1993). 1998 konnten Casari et al. das Gen SGP7 isolieren (Casari, De Fusco et al. 1998). Die genomische Struktur dieses Gens wurde durch Settasatian et al. beschrieben (Settasatian, Whitmore et al. 1999). SPG7 enthält 17 Exons und umfasst eine Region von etwa 52 kb. Das Genprodukt stellt Paraplegin, ein Mitglied der AAA-Proteinfamilie, dar. Dieses Protein ist in den Mitochondrien lokalisiert. Mutationen in SPG7 können neben einer unkomplizierten auch eine komplizierte HSP zur Folge haben. Mutationsanalysen bei Familienmitgliedern mit autosomal-rezessiver HSP haben jedoch gezeigt, dass nur in wenigen Fällen Mutationen im SPG7-Gen nachgewiesen werden konnten (Casari, De Fusco et al. 1998).

II.3.4 X-gebundene HSP

Im Fall der x-gebundenen HSP konnten bisher drei verantwortliche Loci identifiziert werden. Mutationen im Gen L1-CAM (*Neural Cell Adhesion Molecule L1*) in SPG1 verursachen eine komplizierte Form der HSP, welche durch mentale Retardierung charakterisiert ist. Diverse Mutationen im gleichen Gen können sowohl zur Ausprägung des x-gebundenen „Wasserkopfs“ als auch zur Entstehung des MASA-Syndroms führen (mentale Schwächung, Aphasie, schleppende Gangart, Arthrogryposis) (Jouet, Moncla et al. 1995). Durch Mutationen im PLP-Gen (Myelin-Proteolipidprotein) in SPG2 kann neben einer komplizierten Form auch eine unkomplizierte Form der HSP entwickelt werden. Weiterhin kann in seltenen Fällen das Pelizaeus-Merzbacher-Syndrom, eine seltene Myelinisierungsstörung des zentralen Nervensystems, auftreten (Saugier-Weber, Munnich et al. 1994). Der dritte Locus betrifft das SPG16-Gen, auf dem eine NOR-Insertion (Nucleolus Organizer Region) beschrieben wurde (Tamagaki, Shima et al. 2000). Die Autoren gehen davon aus, dass diese Insertion ein noch unbekanntes Gen zerstört, und so die Entwicklung einer komplizierten Form der HSP einleitet.

II.4 Mikrotubuli

II.4.1 Aufbau von Mikrotubuli

Mikrotubuli (MT) sind die wichtigsten dynamischen Strukturkomponenten in eukaryotischen Zellen. Sie spielen für eine Vielzahl von zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. Während der Zellteilung bilden Mikrotubuli die mitotische Spindel und organisieren die räumliche Verteilung der Chromosomen (Karsenti und Vernos 2001). Sie stellen die bedeutendsten strukturellen Komponenten in Cilien und Flagellen dar, welche die Zellen zur Bewegung befähigen (Scholey 2003). Zudem fungieren Mikrotubuli als Leitschienen, auf denen Motorproteine wie Kinesin und Dynein ihre Fracht, beispielweise Organellen, transportieren (Hirokawa 1998). Auf gleiche Art und Weise fungieren Mikrotubuli innerhalb eines Neuronen-Axons als Bahnen für den Transport diverser Frachten an unterschiedliche Zellorte (Hirokawa und Takemura 2005). Mikrotubuli sind zudem in den granulären Transport in Pigmentzellen involviert (Rodionov, Gyoeva et al. 1991). Mikrotubuli stellen Polymere aus Tubulin-Einheiten dar, die aus zwei unterschiedlichen globulären Untereinheiten bestehen (Desai und Mitchison 1997; Nogales 2001). Dabei unterscheidet man zwischen α - und β -Tubulin. Für die Ausbildung langer Strukturen verbinden sich die Heterodimere in 8 nm Intervallen Kopf-an-Schwanz, wodurch sogenannte Protofilamente entstehen (Nogales, Wolf et al. 1998). In diesen Filamenten folgt einem α -Tubulin stets ein β -Tubulin Element. Innerhalb der meisten Mikrotubuli assoziieren 13 Protofilamente zu einer hohlen zylindrischen Struktur mit einem Durchmesser von 25 nm. Diese Polymerstruktur der Mikrotubuli wurde erstmals in den 1950er Jahren mit Hilfe eines Elektronenmikroskops beobachtet. Durch die parallele Anordnung aller Heterodimere entsteht eine strukturelle Polarität des Mikrotubulus (Mitchison und Kirschner 1984). Die zellulären Funktionen der Mikrotubuli sind sehr eng mit ihrem polaren Charakter verbunden. Beispielsweise ist die Polarität entscheidend für die Fähigkeit eines Motorproteins, in einem gerichteten Prozess an ein spezifisches Ende des Polymers zu wandern. Die Polarität ist auch hinsichtlich der unterschiedlich ausgeprägten Dynamik der beiden Mikrotubulus-Enden wichtig. Am Mikrotubulus Ende mit langsamerer Polymerisationsrate, auch als Minus-Ende bezeichnet, sind α -Tubulin Einheiten exponiert. Am schneller polymerisierenden Ende, dem Plus-Ende, sind dagegen β -Tubulin Elemente angeordnet. 1998 wurde die 3D-Struktur des Tubulin-Heterodimers durch Elektronen-Kristallographie mit einer Auflösung von 3.7 Å bestimmt (Nogales, Whittaker et al. 1999). α - und β -Tubulin sind ähnliche Proteine und zeigen eine 50%ige Homologie bezüglich ihrer Aminosäuresequenz (Burns 1991).

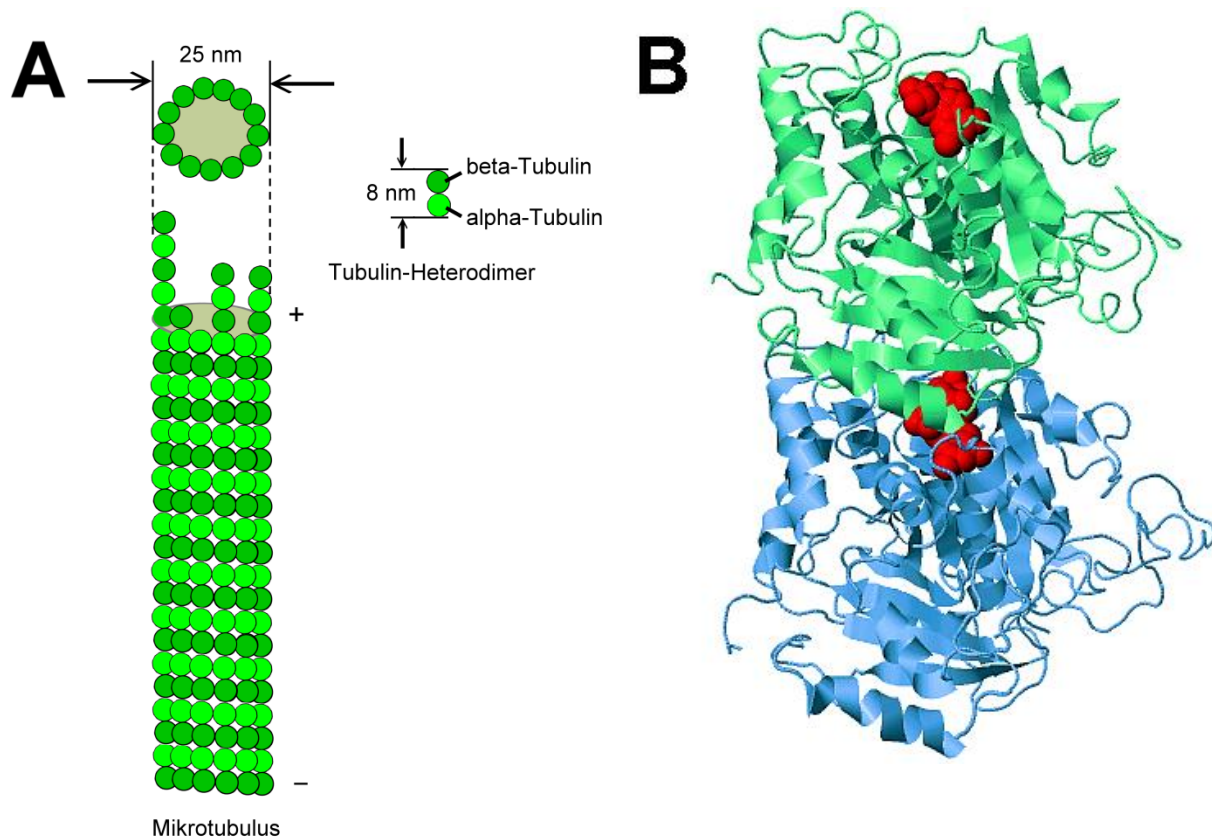


Abbildung II. 4: Struktur eines Mikrotubulus.

(A) Durch Kopf-Schwanz-Interaktionen entstehen lineare Protofilamente. 13 Protofilamente assoziieren lateral und bilden eine hohle zylindrische Struktur, den Mikrotubulus.

(B) Bänder-Modell des Tubulin-Dimers. Zu sehen ist ein Heterodimer, das aus α -Tubulin (blau) und β -Tubulin (grün) zusammengesetzt ist. GTP-Moleküle sind in roter Farbe dargestellt (PDB Eintrag: 1tub).

II.4.2 Dynamische Instabilität der Mikrotubuli

Mikrotubuli sind aufgrund des stetigen Wechsels zwischen Polymerisation (Wachstum) und Depolymerisation (Schrumpfen) hochgradig dynamische Strukturen. Diese dynamische Eigenschaft wird durch den Term „dynamische Instabilität“ ausgedrückt (Mitchison und Kirschner 1984). Die Energie für die Realisierung der dynamischen Instabilität stammt aus der Hydrolyse von Guanosin-Triphosphat (GTP). Tubulin stellt eine GTPase dar, deren Aktivität durch Polymerisation stimuliert wird. Das durch Hydrolyse entstandene Guanosin-Diphosphat (GDP) wird im Polymerfilament nicht ausgetauscht und verbleibt somit in der GDP-Form. Im Gegensatz dazu bleibt das von der α -Untereinheit gebundene GTP im Heterodimer gefangen und kann nicht hydrolysiert werden. GTP-Hydrolyse und Austausch finden somit ausschließlich in der β -Untereinheit von Tubulin statt. Die kinetischen Eigenschaften von GTP- und GDP-Tubulin

unterscheiden sich. GDP-Tubulin neigt zur Depolymerisation. Da sich Tubulin nur im GTP-gebundenen Status an beide Enden des Mikrotubulus anheften kann, befindet sich am Plus-Ende (β -Tubulin) normalerweise eine GTP-Tubulin Kappe. Diese GTP-Kappe schützt den Mikrotubulus vor dem Zerfall. Sobald die Hydrolyse von GTP die Spitze des Mikrotubulus erreicht hat, erfolgt eine plötzliche und sehr rasche Depolymerisationsphase. Dieser Vorgang wird auch als „Katastrophe“ bezeichnet. Neben der „Katastrophe“ gibt es zudem eine „Rettung“, die eintritt, wenn zahlreiche GTP-Tubulin Einheiten an die Spitze des Mikrotubulus gekoppelt werden. Dadurch entsteht eine neue Schutzkappe, welche die Depolymerisation inhibiert. Beide Phasen, „Katastrophe“ und „Rettung“ sind essentielle Bestandteile der „dynamischen Instabilität“ (Inoue und Salmon 1995). Das Plus-Ende des Mikrotubulus zeigt im Vergleich zum Minus-Ende eine erhöhte Polymerisationsrate. Zusätzlich treten am Plus-Ende mehr „Katastrophen“-Ereignisse auf, während die „Rettungen“ am Minus-Ende frequentierter sind. Somit zeigen die Plus-Enden eine höhere Rate an dynamischer Instabilität als die Minus-Enden.

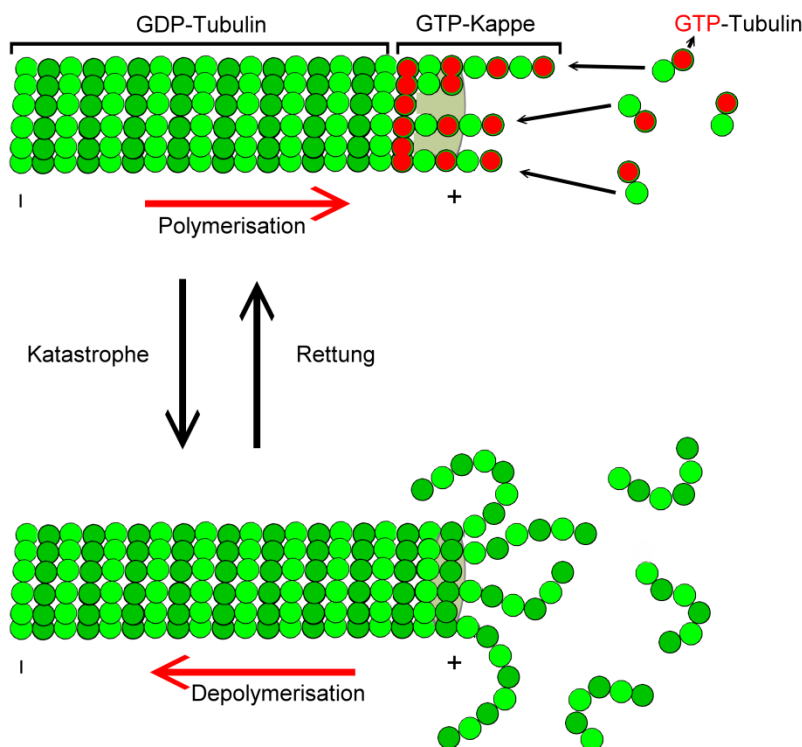


Abbildung II. 5: Dynamische Instabilität der Mikrotubuli.

Dynamische Instabilität ist durch eine Koexistenz von Polymerisation und Depolymerisation charakterisiert. Am wachsenden MT-Ende wird das gebundene GTP während oder kurz nach der Polymerisation hydrolysiert. Das Mikrotubulus-Filament besteht hauptsächlich aus GDP-Tubulin. Polymerisierende MT wechseln in die Depolymerisations-Phase über („Katastrophe“).

Schrumpfende MT können wieder in die Polymerisationsphase übergehen („Rettung“).

II.4.3 Regulatoren für die dynamische Instabilität der Mikrotubuli

Die dynamische Instabilität der Mikrotubuli wird durch MAPs reguliert, die an Tubulin binden. Für die Stabilisierung und Destabilisierung von Mikrotubuli sind zwei Hauptgruppen von MAPs zuständig. Zu den stabilisierenden Versionen gehören MAP1, MAP2, MAP4 und tau (Vallee 1982; Tokuraku, Matsushima et al. 2003). XMAP215 aus *Xenopus*-Eiern konnte ebenfalls als wichtiger Regulator für das Wachstum am Plus-Ende des Mikrotubulus identifiziert werden (Vasquez, Gard et al. 1994). Diese Proteine stabilisieren und fördern sowohl den Polymerisationsvorgang als auch die „Rettung“ oder aber inhibieren Depolymerisation und „Katastrophen“. Einen weiteren Regulator stellt der γ -Tubulin Ringkomplex (γ -TuRC) dar. Dieser Komplex fungiert als Initiator für die Tubulin-Polymerisation indem er MT-Nukleation fördert (Moritz, Braunfeld et al. 2000; Wiese und Zheng 2000). Studien haben gezeigt, dass die meisten an Plus-Enden bindenden Proteine (+TIPs), darunter befinden sich CLIP (zytoplasmatisches *Linker*-Protein)-170 und EB1 (*End-Binding* 1), Wachstum am gleichen Ende begünstigen (Schuyler und Pellman 2001). Zu den Proteinen mit destabilisierender Funktion gehören Stathmin/Oncoprotein 18 (Op18), Kin-13 (Kinesin mit eingebauter katalytischer Domäne), Spastin, Katanin und Fidgetin. Stathmin/Op18 interagiert mit freiem Tubulin und verhindert den Einbau der Einheiten in den Mikrotubulus (Cassimeris 2002). Kin-13 fördert „Katastrophen“ (Desai, Verma et al. 1999), während Spastin, Katanin und Fidgetin Tubulin-Dimere aus dem Filament entfernen können (Vale 1991; Roll-Mecak und Vale 2005).

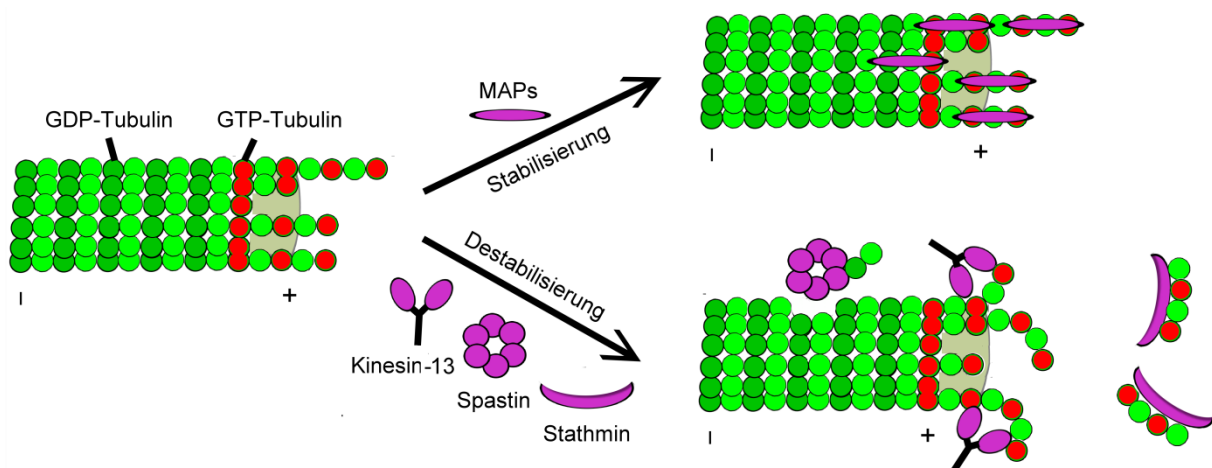


Abbildung II. 6: Regulatoren der dynamischen Instabilität.

Beispiele von Faktoren, die MT stabilisieren respektive destabilisieren. MAPs zeigen eine stabilisierende Wirkung, während Kinesin-13, Spastin und Stathmin eine destabilisierende Funktion ausüben.

II.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung II. 1: Konservierte Funktionen der AAA-Proteine.	39
Abbildung II. 2: Subzelluläre Lokalisation der AAA-Proteine.	40
Abbildung II. 3: AAA-Proteine verwenden ähnliche Mechanismen um unterschiedliche Funktionen innerhalb der Zelle auszuüben	42/43
Abbildung II. 4: Struktur eines Mikrotubulus.	51
Abbildung II. 5: Dynamische Instabilität der Mikrotubuli.	52
Abbildung II. 6: Regulatoren der dynamischen Instabilität.	53

II.6 Literaturverzeichnis

- Azmi, I., B. Davies, et al. (2006). "Recycling of ESCRTs by the AAA-ATPase Vps4 is regulated by a conserved VSL region in Vta1." *J Cell Biol* **172**(5): 705-717.
- Baas, P. W. and H. C. Joshi (1992). "Gamma-tubulin distribution in the neuron: implications for the origins of neuritic microtubules." *J Cell Biol* **119**(1): 171-178.
- Baas, P. W., A. Karabay, et al. (2005). "Microtubules cut and run." *Trends Cell Biol* **15**(10): 518-524.
- Banfi, S., M. T. Bassi, et al. (1999). "Identification and characterization of AFG3L2, a novel paraplegin-related gene." *Genomics* **59**(1): 51-58.
- Block, M. R., B. S. Glick, et al. (1988). "Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(21): 7852-7856.
- Blumen, S. C., S. Bevan, et al. (2003). "A locus for complicated hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1q24-q32." *Ann Neurol* **54**(6): 796-803.
- Bousslam, N., A. Benomar, et al. (2005). "Mapping of a new form of pure autosomal recessive spastic paraplegia (SPG28)." *Ann Neurol* **57**(4): 567-571.
- Burns, R. G. (1991). "Alpha-, beta-, and gamma-tubulins: sequence comparisons and structural constraints." *Cell Motil Cytoskeleton* **20**(3): 181-189.
- Carter, A. P., C. Cho, et al. (2011). "Crystal structure of the dynein motor domain." *Science* **331**(6021): 1159-1165.
- Carter, T. C. and H. Gruneberg (1950). "Linkage between fidget and agouti in the house mouse." *Heredity (Edinb)* **4**(3): 373-376.
- Casari, G., M. De Fusco, et al. (1998). "Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in paraplegin, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease." *Cell* **93**(6): 973-983.
- Cassimeris, L. (2002). "The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers." *Curr Opin Cell Biol* **14**(1): 18-24.
- Collins, C. A. and R. B. Vallee (1989). "Preparation of microtubules from rat liver and testis: cytoplasmic dynein is a major microtubule associated protein." *Cell Motil Cytoskeleton* **14**(4): 491-500.
- Coppola, M., A. Pizzigoni, et al. (2000). "Identification and characterization of YME1L1, a novel paraplegin-related gene." *Genomics* **66**(1): 48-54.

- Corthesy-Theulaz, I., A. Pauloin, et al. (1992). "Cytoplasmic dynein participates in the centrosomal localization of the Golgi complex." *J Cell Biol* **118**(6): 1333-1345.
- Cox, G. A., C. L. Mahaffey, et al. (2000). "The mouse fidgetin gene defines a new role for AAA family proteins in mammalian development." *Nat Genet* **26**(2): 198-202.
- DeLaBarre, B., J. C. Christianson, et al. (2006). "Central pore residues mediate the p97/VCP activity required for ERAD." *Mol Cell* **22**(4): 451-462.
- Desai, A. and T. J. Mitchison (1997). "Microtubule polymerization dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 83-117.
- Desai, A., S. Verma, et al. (1999). "Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes." *Cell* **96**(1): 69-78.
- Diaz-Valencia, J. D., M. M. Morelli, et al. (2011). "Drosophila katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects." *Biophys J* **100**(10): 2440-2449.
- Doyle, S. M., J. Shorter, et al. (2007). "Asymmetric deceleration of ClpB or Hsp104 ATPase activity unleashes protein-remodeling activity." *Nat Struct Mol Biol* **14**(2): 114-122.
- Ebbing, B., K. Mann, et al. (2008). "Effect of spastic paraplegia mutations in KIF5A kinesin on transport activity." *Hum Mol Genet* **17**(9): 1245-1252.
- Errico, A., P. Claudiani, et al. (2004). "Spastin interacts with the centrosomal protein NA14, and is enriched in the spindle pole, the midbody and the distal axon." *Hum Mol Genet* **13**(18): 2121-2132.
- Evans, K., C. Keller, et al. (2006). "Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(28): 10666-10671.
- Faulkner, N. E., D. L. Dujardin, et al. (2000). "A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function." *Nat Cell Biol* **2**(11): 784-791.
- Fink, J. K., C. T. Wu, et al. (1995). "Autosomal dominant familial spastic paraplegia: tight linkage to chromosome 15q." *Am J Hum Genet* **56**(1): 188-192.
- Fontaine, B., C. S. Davoine, et al. (2000). "A new locus for autosomal dominant pure spastic paraplegia, on chromosome 2q24-q34." *Am J Hum Genet* **66**(2): 702-707.
- Fukuda, S., N. Shimozawa, et al. (1996). "Human peroxisome assembly factor-2 (PAF-2): a gene responsible for group C peroxisome biogenesis disorder in humans." *Am J Hum Genet* **59**(6): 1210-1220.
- Gee, M. A., J. E. Heuser, et al. (1997). "An extended microtubule-binding structure within the dynein motor domain." *Nature* **390**(6660): 636-639.
- Glickman, M. H., D. M. Rubin, et al. (1998). "A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3." *Cell* **94**(5): 615-623.
- Goloubinoff, P., A. Mogk, et al. (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(24): 13732-13737.
- Goodchild, R. E. and W. T. Dauer (2004). "Mislocalization to the nuclear envelope: an effect of the dystonia-causing torsinA mutation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(3): 847-852.
- Goodchild, R. E. and W. T. Dauer (2005). "The AAA+ protein torsinA interacts with a conserved domain present in LAP1 and a novel ER protein." *J Cell Biol* **168**(6): 855-862.

- Goodenough, U. and J. Heuser (1984). "Structural comparison of purified dynein proteins with in situ dynein arms." *J Mol Biol* **180**(4): 1083-1118.
- Gouveia, S. M. and A. Akhmanova (2010). "Cell and molecular biology of microtubule plus end tracking proteins: end binding proteins and their partners." *Int Rev Cell Mol Biol* **285**: 1-74.
- Goytain, A., R. M. Hines, et al. (2007). "NIPA1 (SPG6), the basis for autosomal dominant form of hereditary spastic paraplegia, encodes a functional Mg²⁺ transporter." *J Biol Chem* **282**(11): 8060-8068.
- Habura, A., I. Tikhonenko, et al. (1999). "Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains." *J Biol Chem* **274**(22): 15447-15453.
- Hansen, J. J., A. Durr, et al. (2002). "Hereditary spastic paraplegia SPG13 is associated with a mutation in the gene encoding the mitochondrial chaperonin Hsp60." *Am J Hum Genet* **70**(5): 1328-1332.
- Harding, A. E. (1981). "Hereditary 'pure' spastic paraplegia: a clinical and genetic study of 22 families." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **44**(10): 871-883.
- Harms, M. B., K. M. Ori-McKenney, et al. (2012). "Mutations in the tail domain of DYNC1H1 cause dominant spinal muscular atrophy." *Neurology* **78**(22): 1714-1720.
- Hattendorf, D. A. and S. L. Lindquist (2002). "Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants." *EMBO J* **21**(1-2): 12-21.
- Hazan, J., N. Fonknechten, et al. (1999). "Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia." *Nat Genet* **23**(3): 296-303.
- Hazan, J., B. Fontaine, et al. (1994). "Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p." *Hum Mol Genet* **3**(9): 1569-1573.
- Hazan, J., C. Lamy, et al. (1993). "Autosomal dominant familial spastic paraplegia is genetically heterogeneous and one locus maps to chromosome 14q." *Nat Genet* **5**(2): 163-167.
- Hedera, P., S. Rainier, et al. (1999). "Novel locus for autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, on chromosome 8q." *Am J Hum Genet* **64**(2): 563-569.
- Hentati, A., M. A. Pericak-Vance, et al. (1994). "Linkage of 'pure' autosomal recessive familial spastic paraplegia to chromosome 8 markers and evidence of genetic locus heterogeneity." *Hum Mol Genet* **3**(8): 1263-1267.
- Hersch, G. L., R. E. Burton, et al. (2005). "Asymmetric interactions of ATP with the AAA+ ClpX6 unfoldase: allosteric control of a protein machine." *Cell* **121**(7): 1017-1027.
- Hetzer, M., H. H. Meyer, et al. (2001). "Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly." *Nat Cell Biol* **3**(12): 1086-1091.
- Hinson, J. T., V. R. Fantin, et al. (2007). "Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome." *N Engl J Med* **356**(8): 809-819.
- Hirokawa, N. (1998). "Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport." *Science* **279**(5350): 519-526.
- Hirokawa, N., R. Sato-Yoshitake, et al. (1990). "Brain dynein (MAP1C) localizes on both anterogradely and retrogradely transported membranous organelles in vivo." *J Cell Biol* **111**(3): 1027-1037.

- Hirokawa, N. and R. Takemura (2005). "Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons." Nat Rev Neurosci **6**(3): 201-214.
- Hodgkinson, C. A., S. Bohlega, et al. (2002). "A novel form of autosomal recessive pure hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 13q14." Neurology **59**(12): 1905-1909.
- Holzbaur, E. L., J. A. Hammarback, et al. (1991). "Homology of a 150K cytoplasmic dynein-associated polypeptide with the Drosophila gene Glued." Nature **351**(6327): 579-583.
- Hoskins, J. R., M. Pak, et al. (1998). "The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpAP." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12135-12140.
- Hughes, C. A., P. C. Byrne, et al. (2001). "SPG15, a new locus for autosomal recessive complicated HSP on chromosome 14q." Neurology **56**(9): 1230-1233.
- Inoue, S. and E. D. Salmon (1995). "Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements." Mol Biol Cell **6**(12): 1619-1640.
- Ishihara, N., Y. Fujita, et al. (2006). "Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1." EMBO J **25**(13): 2966-2977.
- Iyer, L. M., D. D. Leipe, et al. (2004). "Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases." J Struct Biol **146**(1-2): 11-31.
- Jouet, M., A. Moncla, et al. (1995). "New domains of neural cell-adhesion molecule L1 implicated in X-linked hydrocephalus and MASA syndrome." Am J Hum Genet **56**(6): 1304-1314.
- Karsenti, E. and I. Vernos (2001). "The mitotic spindle: a self-made machine." Science **294**(5542): 543-547.
- Kim, Y. I., R. E. Burton, et al. (2000). "Dynamics of substrate denaturation and translocation by the ClpXP degradation machine." Mol Cell **5**(4): 639-648.
- Klebe, S., H. Azzedine, et al. (2006). "Autosomal recessive spastic paraplegia (SPG30) with mild ataxia and sensory neuropathy maps to chromosome 2q37.3." Brain **129**(Pt 6): 1456-1462.
- Kon, T., T. Oyama, et al. (2012). "The 2.8 Å crystal structure of the dynein motor domain." Nature **484**(7394): 345-350.
- Koonce, M. P. and I. Tikhonenko (2000). "Functional elements within the dynein microtubule-binding domain." Mol Biol Cell **11**(2): 523-529.
- Kustedjo, K., M. H. Bracey, et al. (2000). "Torsin A and its torsion dystonia-associated mutant forms are luminal glycoproteins that exhibit distinct subcellular localizations." J Biol Chem **275**(36): 27933-27939.
- Latterich, M., K. U. Frohlich, et al. (1995). "Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes." Cell **82**(6): 885-893.
- Li, Y. Y., E. Yeh, et al. (1993). "Disruption of mitotic spindle orientation in a yeast dynein mutant." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10096-10100.
- Liu, Z., A. Zolkiewska, et al. (2003). "Characterization of human torsinA and its dystonia-associated mutant form." Biochem J **374**(Pt 1): 117-122.
- Lottridge, J. M., A. R. Flannery, et al. (2006). "Vta1p and Vps46p regulate the membrane association and ATPase activity of Vps4p at the yeast multivesicular body." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(16): 6202-6207.
- Lum, R., J. M. Tkach, et al. (2004). "Evidence for an unfolding/threading mechanism for protein disaggregation by *Saccharomyces cerevisiae* Hsp104." J Biol Chem **279**(28): 29139-29146.
- Maillard, R. A., G. Chistol, et al. (2011). "ClpX(P) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates." Cell **145**(3): 459-469.

- Mancini, E. J., D. E. Kainov, et al. (2004). "Atomic snapshots of an RNA packaging motor reveal conformational changes linking ATP hydrolysis to RNA translocation." *Cell* **118**(6): 743-755.
- Mannan, A. U., P. Krawen, et al. (2006). "ZFYVE27 (SPG33), a novel spastin-binding protein, is mutated in hereditary spastic paraplegia." *Am J Hum Genet* **79**(2): 351-357.
- Martin, A., T. A. Baker, et al. (2005). "Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines." *Nature* **437**(7062): 1115-1120.
- McDermott, C., K. White, et al. (2000). "Hereditary spastic paraparesis: a review of new developments." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **69**(2): 150-160.
- McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). "Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules." *Cell* **75**(3): 419-429.
- Meijer, I. A., P. Cossette, et al. (2004). "A novel locus for pure recessive hereditary spastic paraplegia maps to 10q22.1-10q24.1." *Ann Neurol* **56**(4): 579-582.
- Mitchison, T. and M. Kirschner (1984). "Dynamic instability of microtubule growth." *Nature* **312**(5991): 237-242.
- Moritz, M., M. B. Braunfeld, et al. (2000). "Structure of the gamma-tubulin ring complex: a template for microtubule nucleation." *Nat Cell Biol* **2**(6): 365-370.
- Mukherjee, S., J. D. Valencia, et al. (2012). "Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis." *Cell Cycle* **11**(12): 2359-2366.
- Naismith, T. V., J. E. Heuser, et al. (2004). "TorsinA in the nuclear envelope." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(20): 7612-7617.
- Nickerson, D. P., M. West, et al. (2006). "Did2 coordinates Vps4-mediated dissociation of ESCRT-III from endosomes." *J Cell Biol* **175**(5): 715-720.
- Nogales, E. (2001). "Structural insight into microtubule function." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **30**: 397-420.
- Nogales, E., M. Whittaker, et al. (1999). "High-resolution model of the microtubule." *Cell* **96**(1): 79-88.
- Nogales, E., S. G. Wolf, et al. (1998). "Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography." *Nature* **391**(6663): 199-203.
- Nolden, M., S. Ehses, et al. (2005). "The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria." *Cell* **123**(2): 277-289.
- Ogura, T. and A. J. Wilkinson (2001). "AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function." *Genes Cells* **6**(7): 575-597.
- Oiwa, K. and H. Sakakibara (2005). "Recent progress in dynein structure and mechanism." *Curr Opin Cell Biol* **17**(1): 98-103.
- Olbrich, H., K. Haffner, et al. (2002). "Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry." *Nat Genet* **30**(2): 143-144.
- Orlacchio, A., T. Kawarai, et al. (2005). "New locus for hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 1p31.1-1p21.1." *Ann Neurol* **58**(3): 423-429.
- Ozelius, L. J., J. W. Hewett, et al. (1997). "The early-onset torsion dystonia gene (DYT1) encodes an ATP-binding protein." *Nat Genet* **17**(1): 40-48.
- Patel, H., H. Cross, et al. (2002). "SPG20 is mutated in Troyer syndrome, an hereditary spastic paraplegia." *Nat Genet* **31**(4): 347-348.

- Patel, H., P. E. Hart, et al. (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**(1): 209-215.
- Platta, H. W., S. Grunau, et al. (2005). "Functional role of the AAA peroxins in dislocation of the cycling PTS1 receptor back to the cytosol." *Nat Cell Biol* **7**(8): 817-822.
- Portsteffen, H., A. Beyer, et al. (1997). "Human PEX1 is mutated in complementation group 1 of the peroxisome biogenesis disorders." *Nat Genet* **17**(4): 449-452.
- Rabouille, C., T. P. Levine, et al. (1995). "An NSF-like ATPase, p97, and NSF mediate cisternal regrowth from mitotic Golgi fragments." *Cell* **82**(6): 905-914.
- Rainey, R. N., J. D. Glavin, et al. (2006). "A new function in translocation for the mitochondrial i-AAA protease Yme1: import of polynucleotide phosphorylase into the intermembrane space." *Mol Cell Biol* **26**(22): 8488-8497.
- Rainier, S., J. H. Chai, et al. (2003). "NIPA1 gene mutations cause autosomal dominant hereditary spastic paraplegia (SPG6)." *Am J Hum Genet* **73**(4): 967-971.
- Reid, E. (1999). "The hereditary spastic paraplegias." *J Neurol* **246**(11): 995-1003.
- Reid, E. (2003). "Science in motion: common molecular pathological themes emerge in the hereditary spastic paraplegias." *J Med Genet* **40**(2): 81-86.
- Reid, E., A. M. Dearlove, et al. (2000). "A locus for autosomal dominant "pure" hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 19q13." *Am J Hum Genet* **66**(2): 728-732.
- Reid, E., A. M. Dearlove, et al. (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**(3): 757-763.
- Reuber, B. E., E. Germain-Lee, et al. (1997). "Mutations in PEX1 are the most common cause of peroxisome biogenesis disorders." *Nat Genet* **17**(4): 445-448.
- Rodionov, V. I., F. K. Gyoeva, et al. (1991). "Kinesin is responsible for centrifugal movement of pigment granules in melanophores." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 4956-4960.
- Roll-Mecak, A. and F. J. McNally (2010). "Microtubule-severing enzymes." *Curr Opin Cell Biol* **22**(1): 96-103.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2005). "The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules." *Curr Biol* **15**(7): 650-655.
- Rugarli, E. I. and T. Langer (2006). "Translating m-AAA protease function in mitochondria to hereditary spastic paraplegia." *Trends Mol Med* **12**(6): 262-269.
- Rumpf, S. and S. Jentsch (2006). "Functional division of substrate processing cofactors of the ubiquitin-selective Cdc48 chaperone." *Mol Cell* **21**(2): 261-269.
- Sanderson, C. M., J. W. Connell, et al. (2006). "Spastin and atlastin, two proteins mutated in autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia, are binding partners." *Hum Mol Genet* **15**(2): 307-318.

- Saugier-Weber, P., A. Munnich, et al. (1994). "X-linked spastic paraplegia and Pelizaeus-Merzbacher disease are allelic disorders at the proteolipid protein locus." *Nat Genet* **6**(3): 257-262.
- Schlieker, C., J. Weibezahn, et al. (2004). "Substrate recognition by the AAA+ chaperone ClpB." *Nat Struct Mol Biol* **11**(7): 607-615.
- Scholey, J. M. (2003). "Intraflagellar transport." *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 423-443.
- Schroer, T. A., E. R. Steuer, et al. (1989). "Cytoplasmic dynein is a minus end-directed motor for membranous organelles." *Cell* **56**(6): 937-946.
- Schuyler, S. C. and D. Pellman (2001). "Microtubule "plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning." *Cell* **105**(4): 421-424.
- Settasatian, C., S. A. Whitmore, et al. (1999). "Genomic structure and expression analysis of the spastic paraplegia gene, SPG7." *Hum Genet* **105**(1-2): 139-144.
- Siddiqui, S. M., R. T. Sauer, et al. (2004). "Role of the processing pore of the ClpX AAA+ ATPase in the recognition and engagement of specific protein substrates." *Genes Dev* **18**(4): 369-374.
- Simpson, M. A., H. Cross, et al. (2003). "Maspardin is mutated in mast syndrome, a complicated form of hereditary spastic paraplegia associated with dementia." *Am J Hum Genet* **73**(5): 1147-1156.
- Smith, D. S., M. Niethammer, et al. (2000). "Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1." *Nat Cell Biol* **2**(11): 767-775.
- Smith, G. R., B. Contreras-Moreira, et al. (2004). "A link between sequence conservation and domain motion within the AAA+ family." *J Struct Biol* **146**(1-2): 189-204.
- Tamagaki, A., M. Shima, et al. (2000). "Segregation of a pure form of spastic paraplegia and NOR insertion into Xq11.2." *Am J Med Genet* **94**(1): 5-8.
- Tatsuta, T., S. Augustin, et al. (2007). "m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria." *EMBO J* **26**(2): 325-335.
- Tokuraku, K., K. Matsushima, et al. (2003). "The number of repeat sequences in microtubule-associated protein 4 affects the microtubule surface properties." *J Biol Chem* **278**(32): 29609-29618.
- Tynan, S. H., M. A. Gee, et al. (2000). "Distinct but overlapping sites within the cytoplasmic dynein heavy chain for dimerization and for intermediate chain and light intermediate chain binding." *J Biol Chem* **275**(42): 32769-32774.
- Ungermann, C., B. J. Nichols, et al. (1998). "A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion." *J Cell Biol* **140**(1): 61-69.
- Vale, R. D. (1991). "Severing of stable microtubules by a mitotically activated protein in *Xenopus* egg extracts." *Cell* **64**(4): 827-839.
- Valente, E. M., F. Brancati, et al. (2002). "Novel locus for autosomal dominant pure hereditary spastic paraplegia (SPG19) maps to chromosome 9q33-q34." *Ann Neurol* **51**(6): 681-685.
- Vallee, R. B. (1982). "A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs)." *J Cell Biol* **92**(2): 435-442.
- Vasquez, R. J., D. L. Gard, et al. (1994). "XMAP from *Xenopus* eggs promotes rapid plus end assembly of microtubules and rapid microtubule polymer turnover." *J Cell Biol* **127**(4): 985-993.

- Vazza, G., M. Zortea, et al. (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**(2): 504-509.
- Wallace, M. E. (1950). "Locus of the gene 'fidget' in the house mouse." Nature **166**(4218): 407.
- Wang, J., J. J. Song, et al. (2001). "Crystal structures of the HsIVU peptidase-ATPase complex reveal an ATP-dependent proteolysis mechanism." Structure **9**(2): 177-184.
- Watts, G. D., J. Wymer, et al. (2004). "Inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia is caused by mutant valosin-containing protein." Nat Genet **36**(4): 377-381.
- Weihl, C. C., S. Dalal, et al. (2006). "Inclusion body myopathy-associated mutations in p97/VCP impair endoplasmic reticulum-associated degradation." Hum Mol Genet **15**(2): 189-199.
- Wharton, S. B., C. J. McDermott, et al. (2003). "The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene." J Neuropathol Exp Neurol **62**(11): 1166-1177.
- White, S. R. and B. Lauring (2007). "AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery." Traffic **8**(12): 1657-1667.
- Wiese, C. and Y. Zheng (2000). "A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap." Nat Cell Biol **2**(6): 358-364.
- Wilkinson, P. A., M. A. Simpson, et al. (2005). "A new locus for autosomal recessive complicated hereditary spastic paraplegia (SPG26) maps to chromosome 12p11.1-12q14." J Med Genet **42**(1): 80-82.
- Winter, U., X. Chen, et al. (2009). "A conserved membrane attachment site in alpha-SNAP facilitates N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)-driven SNARE complex disassembly." J Biol Chem **284**(46): 31817-31826.
- Yahraus, T., N. Braverman, et al. (1996). "The peroxisome biogenesis disorder group 4 gene, PXAAA1, encodes a cytoplasmic ATPase required for stability of the PTS1 receptor." EMBO J **15**(12): 2914-2923.
- Yamada-Inagawa, T., T. Okuno, et al. (2003). "Conserved pore residues in the AAA protease FtsH are important for proteolysis and its coupling to ATP hydrolysis." J Biol Chem **278**(50): 50182-50187.
- Yang, Y., C. L. Mahaffey, et al. (2006). "Interaction between fidgetin and protein kinase A-anchoring protein AKAP95 is critical for palatogenesis in the mouse." J Biol Chem **281**(31): 22352-22359.
- Ye, Y. (2006). "Diverse functions with a common regulator: ubiquitin takes command of an AAA ATPase." J Struct Biol **156**(1): 29-40.
- Ye, Y., H. H. Meyer, et al. (2001). "The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol." Nature **414**(6864): 652-656.
- Zhang, D., K. D. Grode, et al. (2011). "Drosophila katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration." Nat Cell Biol **13**(4): 361-370.
- Zhang, D., G. C. Rogers, et al. (2007). "Three microtubule severing enzymes contribute to the "Pacman-flux" machinery that moves chromosomes." J Cell Biol **177**(2): 231-242.
- Zortea, M., A. Vettori, et al. (2002). "Genetic mapping of a susceptibility locus for disc herniation and spastic paraplegia on 6q23.3-q24.1." J Med Genet **39**(6): 387-390.

Zuchner, S., M. E. Kail, et al. (2006). "A new locus for dominant hereditary spastic paraplegia maps to chromosome 2p12." Neurogenetics **7**(2): 127-129.

III Spastin-Projekt

III.1 Einleitung

III.1.1 Struktur von Spastin

Das humane Spastin-Gen codiert ein Protein, das aus insgesamt 616 Aminosäuren aufgebaut ist. Im Folgenden wird der Aufbau von Spastin detailliert beschrieben:

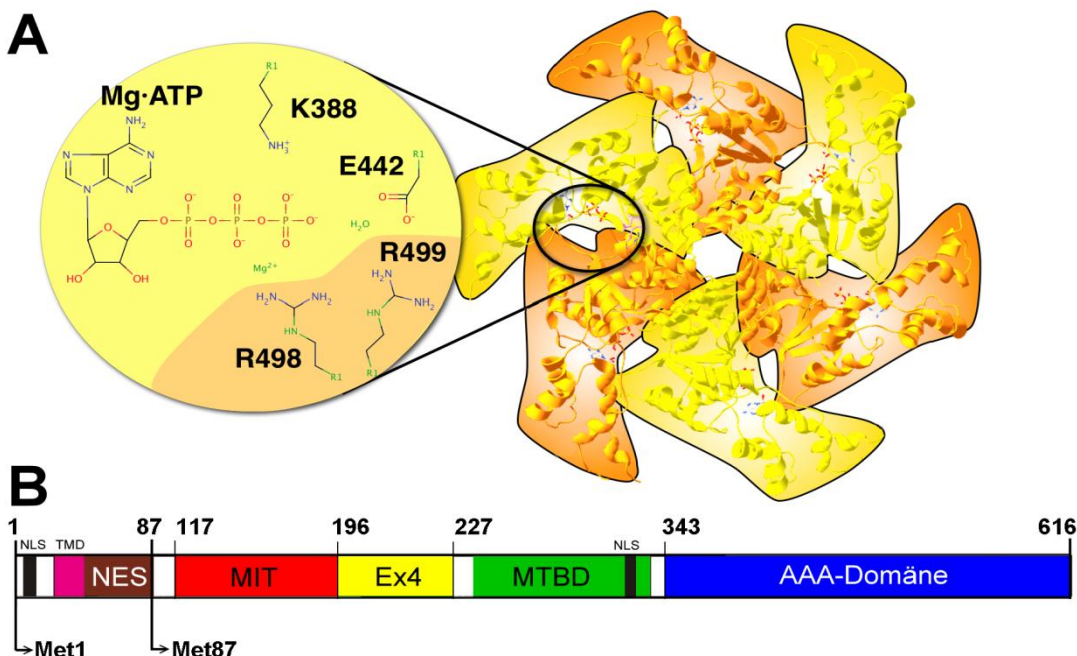


Abbildung III. 1: Struktur von Spastin.

(A) Modell des Spastin-Hexamers und Lokalisation der Nukleotid-Bindungsstelle. Die Abbildung zeigt eine Komposition von sechs Kopien des Spastin-Monomers (PDB-Eintrag 3B9P) mit dem ATP gebundenen SV40-Helikase Modell (1SVM) (Guex, Peitsch et al. 2009). Alternierende Farben (orange und gelb) zeigen die Sequenz der sechs Protomere. Der vergrößerte Ausschnitt illustriert wichtige, die ATP-Binderegion flankierende Aminosäuren.

(B) Schematischer Aufbau von Spastin: Startcodons (Met1, Met87), Kernlokalisierungssignal (NLS), putative Transmembrandomäne (TMD), Kernexportsignal (NES), Mikrotubuli Interaktions- und *Trafficking*-Domäne (MIT), alternativ gespleißtes Exon4 (Ex4), Mikrotubuli-Bindedomäne (MTBD) und AAA-Domäne (AAA).

Die Struktur von Spastin kann in zwei Abschnitte gegliedert werden: der N-terminale Bereich ist für die Interaktion mit Mikrotubuli und Adapter-Molekülen essentiell, der C-Terminus dagegen ermöglicht ATPase-Umsatz. Diese Einteilung in zwei unterschiedliche Regionen ist charakteristisch für Proteine, die der Fa-

milie der AAA-ATPasen angehören. Der N-terminale Bereich, der den AAA-ATPasen grundsätzlich zur Substraterkennung dient, kann in weitere Bereiche untergliedert werden: einer Atlastin-Bindedomäne (Evans, Keller et al. 2006), der MIT-Domäne (*conserved in Microtubule-Interacting and Trafficking Domain*) (Cicarelli, Proukakis et al. 2003) und einer essentiellen Mikrotubuli-bindenden Domäne (MTBD) (White, Evans et al. 2007). Weiterhin konnten in der humanen Spastin-Sequenz zwei Kernlokalisierungssignale (NLS) (Beetz, Brodhun et al. 2004), zwei Kernexportsignale (NES) (Claudiani, Riano et al. 2005) sowie eine Transmembrandomäne (TMD) identifiziert werden. Die membrangebundene Domäne bildet vermutlich jedoch keine durch die Membran reichende Struktur aus, sondern eine „Haarnadelstruktur“ in einer Membranhälfte (Blackstone 2012). Eine weitere Komponente stellt das Exon4-Motiv dar, das einem alternativen Spleißprozess unterzogen werden kann, wodurch unterschiedliche Isoformen des Spastin-Proteins auftreten können (Svenson, Ashley-Koch et al. 2001). Spastin besitzt mit Methionin an Aminosäureposition 87 ein alternatives Startcodon, so dass insgesamt vier Isoformen existent sind (Claudiani, Riano et al. 2005; Mancuso und Rugarli 2008; Solowska, Morfini et al. 2008). Welches der Startcodons für die Protein-Herstellung Verwendung findet, hängt dabei von einer in Vertebraten hochkonservierten Region, der 5'-UTR (5' *Untranslated Region*), ab. Mehrere durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass das zweite im Leserahmen lokalisierte Methionin (ATG) als Startcodon gewebe- und entwicklungsspezifisch verwendet wird (Salinas, Carazo-Salas et al. 2005). Der daraus resultierenden verkürzten Spastin-Isoform fehlen damit die ersten 86 Aminosäuren, welche das Kernexportsignal sowie die Transmembrandomäne beherbergen. Die längere Isoform inklusive Kernexportsignal ist ausschließlich im Zytoplasma zu finden, während die kurze Variante sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern vorliegt. Ein weiteres wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Isoformen liegt in der PEST-Sequenz (Peptid-Abschnitt, der reich an Prolinen, Glutaminen, Serinen und Threoninen ist), die ein Degradationssignal darstellt. Da sich dieses Motiv zwischen Aminosäuren 23 und 45 befindet, ist lediglich die längere Isoform mit dem Signal ausgestattet.

III.1.2 Mutationen im Gen SPG4

Das autosomal-dominant vererbte spastische Paraplegie-Gen 4 (SPG4) konnte 1994 von Hazan et al. identifiziert werden (Hazan, Fontaine et al. 1994). 1999 folgte die Identifikation des codierten Genprodukts, Spastin. Das Gen SPG4 umfasst insgesamt 17 Exons und nimmt dabei einen Abschnitt von 90 kb ein (Hazan, Fonknechten et al. 1999). Inzwischen sind über 150 Mutationen im SPG4-Gen bekannt (Crippa, Panzeri et al. 2006). Dabei handelt es sich um unterschiedliche mutagene Formen, darunter Insertionen, Substitutionen und

Deletionen einzelner Basen. Deletionen können *Frameshift*-Mutationen hervorrufen, Basensubstitutionen resultieren dagegen in *Nonsense*, *Missense* oder *Splice-Site* Mutationen. Während des Translationsprozesses erfolgt bei der *Missense*-Mutation der Austausch einer Aminosäure, wodurch das Protein in seiner Funktionsfähigkeit beeinträchtigt werden kann. Ein derartiges Phänomen tritt bei der Mutation K388R auf (Fonknechten, Mavel et al. 2000). Aufgrund einer Punktmutation von Adenin zu Guanin in Exon 8 des SPG4-Gens kommt es an Position 388 zum Austausch der ursprünglichen Aminosäure Lysin (K) durch Arginin (R). Durch diese Modifikation wird eine inaktive Spastin-Form gebildet, die keine ATP-Moleküle mehr umsetzen kann (Evans, Gomes et al. 2005). Durch eine *Nonsense*-Mutation entsteht ein zusätzliches Stoppcodon, so dass der Translationsvorgang vorzeitig abgebrochen wird. Ist der Austausch der Basen bei der *Splice-Site* Mutation im Intron-Exon Übergangsbereich lokalisiert, so fehlt das Exon, da seine Transkription nicht ordnungsgemäß durchgeführt werden kann.

III.1.3 Die Lokalisation von Spastin in der Zelle

Bezüglich der Lokalisation von endogenem Spastin wurden zahlreiche Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen durchgeführt. White, Evans et al. konnten eine perinukleäre und nukleäre Lokalisation beobachten (White, Evans et al. 2007). Für Wildtyp-Spastin konnte ein punktförmiges, perinukleäres Muster registriert werden. Dabei kommt es zu einer initialen Anreicherung am MT-Organisationszentrum, gefolgt von der Ausbildung zytoplasmatischer Aggregate. Im Fall von mutagenem Spastin K388R wurden lange, dicke perinukleäre Bündel beobachtet (Errico, Ballabio et al. 2002). Während diverse Studien unter Einsatz lymphoblastoider Zelllinien (LCLs) ein rein nukleäres Auftreten von Spastin in neuronalen Zellen postulieren (Charvin, Cifuentes-Diaz et al. 2003), beobachtete eine andere Gruppe das Protein an den Zentrosomen (Svenson, Kloos et al. 2005). Im menschlichen Gewebe erfolgt eine ubiquitäre Expression von endogenem Spastin mit einer besonders starken Anreicherung im Gehirnnareal. Die Analyse von postmortalem Hirngewebe brachte hervor, dass Spastin im Hippocampus, den spinalen Motoneuronen sowie in korticalen, hippocampalen Pyramidenzellen des zerebralen Cortex vorhanden ist (Wharton, McDermott et al. 2003). Eine weitere Studie beschreibt die Anreicherung von Spastin in Axonen und Synapsen bei *D. melanogaster* (Trotta, Orso et al. 2004). Habura et al. beobachteten ein frequentiertes Auftreten des Proteins an Verzweigungspunkten neuronaler Zellen und an distalen Axonen (Habura, Tikhonenko et al. 1999).

III.1.4 Mechanismus des Mikrotubuli-Severing Prozesses

Severing kann ausschließlich unter ATP-Hydrolyse realisiert werden. Dabei sind die hochkonservierten Bereiche, Walker A und Walker B innerhalb der AAA-Domäne für ATP-Bindung respektive Hydrolyse, verantwortlich (Hartman and Vale 1999; Roll-Mecak und Vale 2008). ATP-Bindung induziert Hexamerisierung der AAA-Domäne und die nachfolgende Hydrolyse leitet die Disassemblierung ein (Hartman, Mahr et al. 1998; Hartman und Vale 1999). Einige Studien deuten auf einen *Severing*-Mechanismus hin, bei dem die AAA-Domäne des *Severing*-Enzyms an den C-terminalen Bereich des Tubulin-Endes bindet und durch Hydrolyse von ATP das Tubulin-Polypeptid durch die zentrale Pore des AAA-Hexamerrings zieht. Da das Polypeptid-Substrat durch die Pore gedrängt wird, erfolgt durch lokale Entfaltungsprozesse die Freigabe von Tubulin-Dimeren aus dem Netzwerk. Dieses Modell wird durch folgende Daten gestützt:

(1) Subtilisin-behandelte Mikrotubuli können weder gebunden noch abgebaut werden (McNally und Vale 1993; Roll-Mecak und Vale 2005; White, Evans et al. 2007).

(2) Interessanterweise erfolgen am C-terminalen Tubulin-Bereich viele post-translationale Modifikationen (Verhey und Gaertig 2007). Bestimmte Veränderungen, zum Beispiel Polyglutamylierung, verstärken den *Severing*-Prozess (Lacroix, van Dijk et al. 2010).

(3) Mutationen in der Porenschleifen-Region verhindern *Severing* (White, Evans et al. 2007; Roll-Mecak und Vale 2008). Die gleichen Mutanten sind in der Zelle nicht mehr fähig Mikrotubuli abzubauen, können jedoch weiterhin an Mikrotubuli binden und daraus resultierend Bündelung hervorrufen (White, Evans et al. 2007).

(4) Antikörper, die gegen den C-terminalen Schwanz der Mikrotubuli gerichtet sind, blockieren den *Severing*-Prozess (Roll-Mecak und Vale 2008).

2008 wurde die Kristall-Struktur von Spastin veröffentlicht (Roll-Mecak und Vale 2008). Trotz der großen Ähnlichkeit der AAA-Domäne zu Varianten anderer Mitglieder der Proteinfamilie stellen die Mikrotubuli-interagierende und endosomale-Trafficking (MIT)-Linker Domänen interessante Strukturen dar. Diese sind zur kleineren Seite des AAA-Rings gerichtet, der sogenannten *Face A*. Diese Beobachtung eröffnete den Autoren ein Modell für das Entfernen von Tubulin-Dimeren, bei dem *Face A* von Spastin zur Mikrotubulus-Oberfläche zeigt. Da die „Speichen“ Richtung Filament zeigen und daran anhaften, soll die erforderliche Stabilisierung gewährleistet werden. Ein Vergleich der Positionen spezifischer *Pore-Loops* innerhalb der Spastin-Struktur mit denen anderer AAA-Proteinen unterstützt die Hypothese, dass *Face A* von Spastin dem Mikrotubulus-Filament zugewandt ist. Es gibt noch zahlreiche offene Fragen hinsichtlich des Mikrotubuli-*Severing* Vorgangs. Zum Beispiel ist bisher nicht bekannt, wie *Severing*-Enzyme

ganz exakt an Mikrotubuli binden. Sie könnten flach an die Filament-Oberfläche andocken oder aber aufrecht wie ein Rad stehen. Zudem ist noch unklar, ob *Severing*-Enzyme spezifische Stellen am Mikrotubulus erkennen, an denen letztendlich geschnitten wird. Es gibt Hinweise darauf, dass *Severing* durch posttranslationale Modifikationen von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) und Tubulin reguliert wird (McNally, Buster et al. 2002; Qiang, Yu et al. 2006). Zahlreiche zelluläre Studien deuten darauf hin, dass posttranslationale Modifikationen am C-terminalen Tubulin-Ende der stärkste Indikator für *Severing*-Aktivität ist (Sharma, Bryant et al. 2007; Lacroix, van Dijk et al. 2010; Sudo und Baas 2010). Bisher wurden nur sehr wenige Untersuchungen mit assoziierten Proteinen und posttranslational-modifiziertem Tubulin durchgeführt, da die rekombinante Expression von Tubulin praktisch unmöglich ist. Eine Publikation untersuchte den Effekt von Polyglutamylierungen auf die Spastin-Aktivität sowohl in Zellen als auch mit gereinigten Mikrotubuli in *in vitro* Studien. Dabei konnte gezeigt werden, dass Spastin bevorzugt Mikrotubuli mit langen polyglutamylierten Seitenketten am C-terminalen Schwanz schneidet (Lacroix, van Dijk et al. 2010).

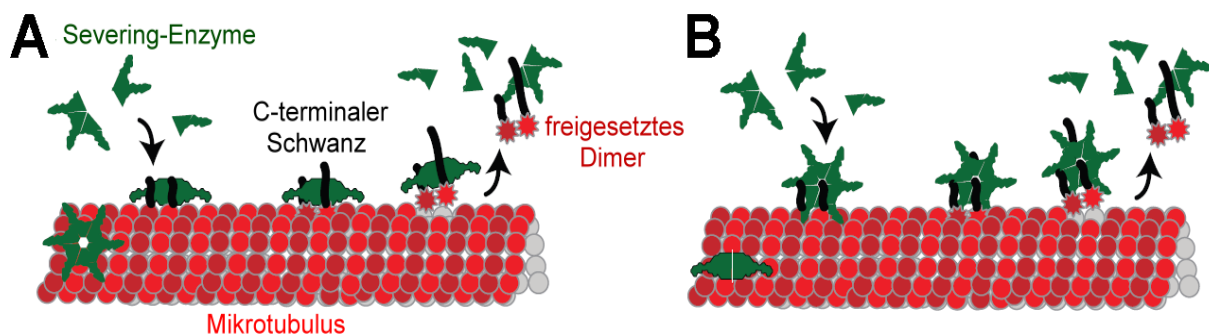


Abbildung III. 2: Postulierter *Severing*-Prozess.

Das Schneiden der Mikrotubuli erfolgt durch einen molekularen Vorgang, in dem sich das AAA-Hexamer (grün) um den C-terminalen Schwanz (schwarze Linie) eines Tubulin-Dimers (rote Kreise) anordnet. Durch die ATP-Hydrolyse in der AAA-Domäne erfolgt die Destabilisierung des Tubulin-Dimers, wodurch es aus dem Filament entfernt werden kann. Die exakte Orientierung des Hexamers auf dem Mikrotubulus ist weiterhin unbekannt. Das Hexamer könnte dabei **(A)** flach auf dem Filament sitzen oder **(B)** über wenige Untereinheiten wie ein Rad an die Oberfläche binden.

(Abbildung modifiziert nach Sharp und Ross 2012)

III.1.5 Zielsetzung

Spastin hat in der Wissenschaft großes Interesse geweckt, da Mutationen im humanen Spastin-Gen (SPG4) die häufigste Ursache für das Auftreten der neurodegenerativen Krankheit HSP darstellen. Da Patienten für die Mutation heterozygot sind, wird sowohl eine intakte, als auch eine defekte Variante des Proteins gebildet. Prognosen, welche exakten Auswirkungen diese simultane Expression von Wildtyp und Mutante haben, sind schwierig, weil die aktiven homohexameren Ringstrukturen auf sehr dynamische Weise miteinander interagieren und wieder zerfallen können. Deshalb ist wahrscheinlich, dass eine große Anzahl an Kombinationen von Wildtyp und Mutanten-Mischungen für den pathologischen Effekt verantwortlich ist. Weiterhin ist unklar, ob und in welchem Umfang Spastin kooperatives Verhalten zeigt. Dieses Wissen ist erforderlich, um die Auswirkungen von SPG4-Mutationen auf den Wildtyp verstehen zu können. Deshalb sollten in dieser Studie mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests Inhibitionsmessungen durchgeführt werden. Für die Experimente sollten dabei unterschiedliche Mischungen aus Wildtyp und einer hydrolysedefizienten Walker B-Mutante (E442Q) (Pantakani, Swapna et al. 2008) eingesetzt werden. Durch dieses Vorgehen sollte analysiert werden, auf welche Weise Spastin durch inaktive Untereinheiten in seiner Aktivität beeinflusst wird. Weiterhin sollte überprüft werden, ob das Enzym Kooperativität und eine damit verbundene Allosterie aufweist. Zu diesem Zweck sollten quantitative Messungen unter Einsatz verschiedener ATP-Analoga (ATP- γ S und AMPPNP) eingesetzt werden. Durch die Methode der Röntgenstrukturanalyse konnte die dreidimensionale Struktur von Spastin aus *D. melanogaster* gelöst werden. Aus den Ergebnissen konnte ein attraktives *Severing*-Modell für Spastin postuliert werden (Roll-Mecak und Vale 2008; Roll-Mecak und McNally 2010). Trotz der Strukturaufklärung gibt es nur sehr wenige Daten, die sich auf die Interaktion des Enzyms mit seinem Substrat und auf die Oligomerisierung von Spastin-Untereinheiten fokussieren. Deshalb sollte in einer weiteren Studie fluoreszenzmarkiertes Spastin analysiert werden. Mit Hilfe von TIRF-Einzelmolekülmessungen sollte der Bindevorgang und das Bewegungsmuster des Enzyms auf dem Filament analysiert werden. Weiterhin sollte überprüft werden, ob spezifische Bereiche am Mikrotubulus bevorzugt geschnitten werden, oder ob das Protein undefinierte Regionen für den *Severing*-Vorgang präferiert. Um Aussagen über den Oligomerisierungsgrad machen zu können, sollten mittels *Photobleaching* und *Cross-Linking* Studien potentielle Zwischenstufen stabilisiert und ein Modell für die Assemblierung von Untereinheiten aufgestellt werden.

III.2 Ergebnisse – Kinetik

III.2.1 Interaktion von Spastin mit Mikrotubuli

Für alle durchgeführten Experimente wurde ein verkürztes Spastin-Konstrukt verwendet, bei dem die ersten 227 Aminosäuren entfernt wurden. Das resultierende Protein, $\Delta 227$ -Spastin, weist eine sehr ähnliche ATPase-Aktivität zum Vollängenkonstrukt auf und ist somit in der Lage mit Mikrotubuli zu interagieren und diese abzubauen (White, Evans et al. 2007). Der Vorteil der kurzen Variante besteht darin, dass sie wesentlich besser löslich ist als das Vollängen-Protein, welches bei Überexpression zur Aggregatbildung neigt.

Die *Severing*-Aktivität von $\Delta 227$ -Spastin wurde mittels TIRF und unter Verwendung von Flusskammern analysiert. Dabei wurden fluoreszierende Mikrotubuli über Anti- β -Tubulin Antikörper an das Deckglas gebunden, so dass der Beginn des Mikrotubuli Abbauprozesses durch Wackeln des Filaments und Entstehung von Brüchen deutlich wurde. Innerhalb weniger Sekunden nach dem Start der Reaktion entstanden Löcher, gefolgt vom vollständigen Abbau des Mikrotubulus. In erstellten Kymographen konnte ausschließlich *Severing* beobachtet werden (siehe Punkt III.3.5). Im Vergleich zu Katanin trat somit keine Depolymerisation auf. Für die Quantifizierung der durchgeführten *Severing*-Messungen wurde die Zeitspanne von der ATP-Zugabe (Start der Reaktion) bis zum Auftreten zweier deutlich voneinander getrennter Mikrotubulus-Filamente, die durch ein *Severing*-Ereignis entstanden sind, herangezogen. Das in diesen TIRF-Studien verwendete $\Delta 227$ -Spastin zeigte *Severing*-Aktivität, während die generierte E442Q-Variante aufgrund einer Mutation im aktiven Zentrum die Fähigkeit zur ATP-Hydrolyse verloren hat und somit kein *Severing* realisieren konnte (White, Evans et al. 2007; Roll-Mecak und Vale 2008). Für die Quantifizierung der Spastin-Aktivität wurde ein gekoppelter enzymatischer ATPase-Test in An- und Abwesenheit von Mikrotubuli durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde in einer MT-Titrationsstudie die Aktivität von Spastin in Gegenwart von 2 mM ATP analysiert (Abbildung III.3).

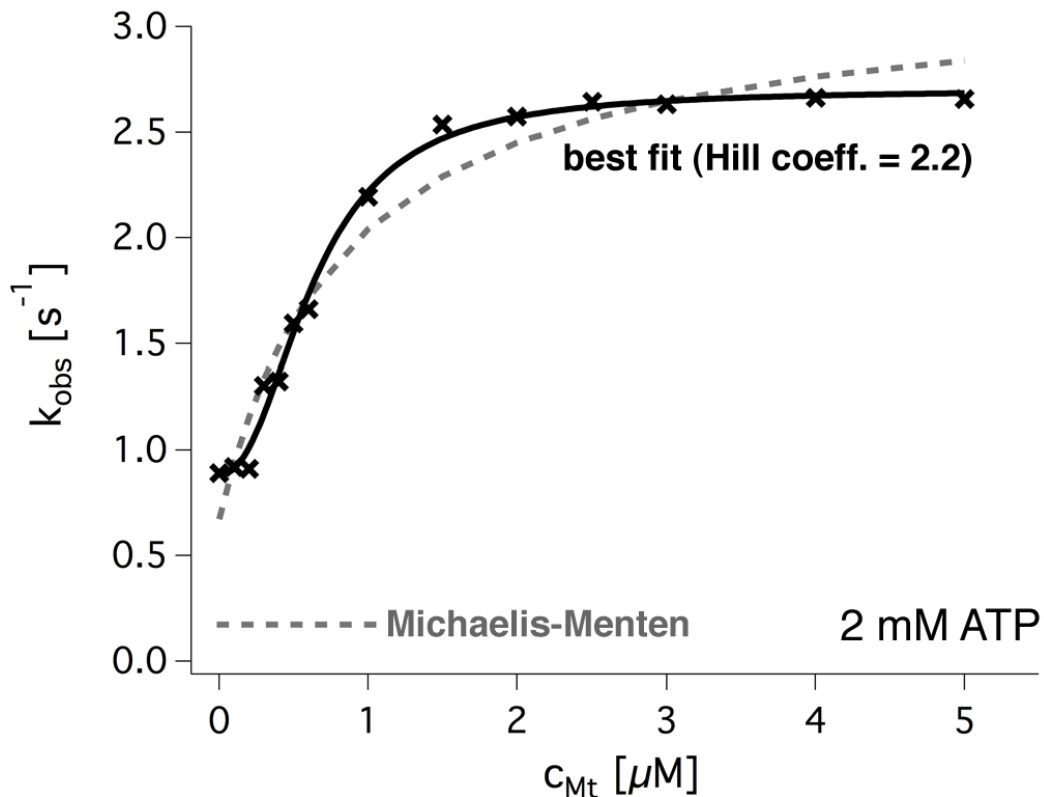


Abbildung III. 3: Abhängigkeit der Spastin ATPase-Rate von der Mikrotubuli-Konzentration.

Die Datenpunkte (schwarze Kreuze) wurden entweder mit dem Hill-Modell (durchgehende Linie) oder der Michaelis-Menten Kinetik (gepunktete, graue Linie) angenähert. Die Näherungsparameter für die exemplarische Kurve sind $k_{cat} = 2,7 \pm 0,1/\text{s}$, mit einem Hintergrund von $k_{basal} = 0,9 \pm 0,0/\text{s}$, $K' = 0,36$ mM Mikrotubuli und $h = 2,2 \pm 0,2$. Drei unabhängige Ergebnisse lieferten einen Mittelwert für $k_{cat} = 3,0 \pm 0,2/\text{s}$, $K' = 0,81$ mM Mikrotubuli und $h = 2,2$.

In Abwesenheit von Mikrotubuli lag die berechnete ATP-Hydrolyserate bei $1,1 \pm 0,1$ ATP/s. Diese Rate erfuhr durch den Einsatz höherer Tubulin-Konzentrationen eine Erhöhung auf $3,0 \pm 0,17$ ATP/s. Die Parameter wurden aus Kurven-Fits erhalten, weshalb die Werte leicht von den Daten aus direkten Messungen abweichen. Die Aktivierung von Spastin durch ATP und Mikrotubuli gehorcht dabei nicht der hyperbolischen Michaelis-Menten Kinetik, sondern zeigt einen Hill-Koeffizienten von $2,2 \pm 0,4$ (siehe Methoden, Gleichung 5). Die halbmaximale Aktivierung wurde dabei bei $0,81 \pm 0,25$ μM Mikrotubuli erreicht. Um vollständige MT-Aktivierung gewährleisten zu können, wurden für weitere Experimente 2 μM Mikrotubuli eingesetzt. Die komplementäre Messreihe – sukzessive Erhöhung der ATP-Konzentration – war in Gegenwart von Mikrotubuli nicht mit dem Michaelis-Menten Modell konsistent. In Abwesenheit der Filamente dominierte ein nicht-kooperatives Verhalten. Diese Aussagen konnten durch folgende Experimente belegt werden: in Abwesenheit von Mikrotubuli betrug die durchschnittliche ATP-Hydrolyserate $0,78 \pm 0,07$ ATP/s (Abbildung III.4) mit

einer Michaelis-Menten Konstante von $0,16 \pm 0,12$ mM ATP (beide Werte stellen Mittelwerte dar \pm Standardabweichung, $n = 4$). Im gesättigten MT-Konzentrationsbereich erreichte die Umsatzrate $3,83 \pm 0,14$ ATP/s ($n = 4$).

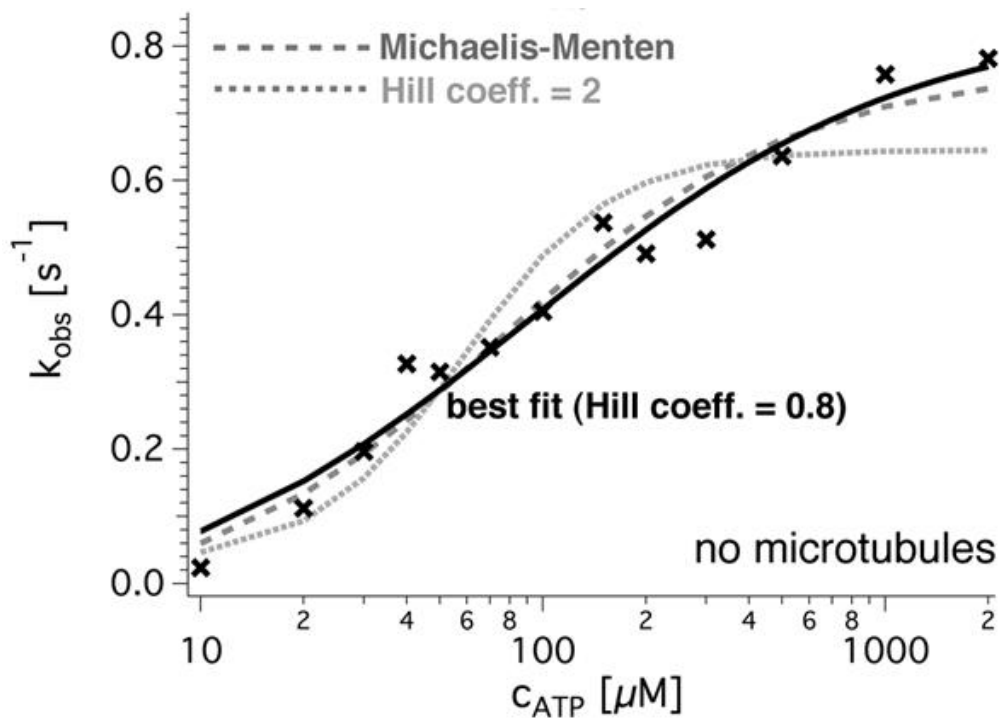


Abbildung III. 4: Sigmoide Abhängigkeit der ATPase-Rate in Abwesenheit von Mikrotubuli.

Der logarithmische *Plot* (X-Achse = ATP-Konzentration, Y-Achse = ATP-Umsatzrate) zeigt die Datenpunkte (schwarze Kreuze) und eine Näherung nach dem Hill-Modell (schwarze, durchgehende Linie). Ein Vergleich der Näherung zwischen Michaelis-Menten (gepunktete, graue Linie) und Hill-Modell mit $h = 2$ (grau, gepunktete Linie) zeigt, dass das nicht kooperative Michaelis-Menten Modell die Abhängigkeit der Umsatzrate von der ATP-Konzentration ähnlich gut beschreibt wie das kooperative Hill-Modell.

In Gegenwart von $2 \mu M$ Mikrotubuli lieferte das Hill-Modell Annäherungen, die mit den Daten gut übereinstimmten (Abbildung III.5). Mit dem komplexeren Adair-Modell (siehe Methoden, Gleichung 6) konnten die Daten noch besser gefittet werden. Da jedoch zusätzliche freie Parameter erforderlich waren, wurden nur für die Bedingung $n = 2$ (interagierende Untereinheiten) zuverlässige Daten erhalten. Deshalb kam für die Analyse der Daten das Hill-Modell zum Einsatz, mit dem Vorteil, dass dieses Modell ein geringeres Limit an interagierenden Untereinheiten akzeptiert. Unter Verwendung des Hill-Modells lag die ATP-Aktivierungskonstante in Anwesenheit von Mikrotubuli bei $(8 \pm 5 \mu M)^h$. Der halbmaximale Umsatz wurde bei $0,08 \pm 0,01$ mM ATP erreicht und der Hill-Koeffizient belief sich auf $h = 2,1 \pm 0,2$ ($n = 4$). Diese Beobachtungen

deuten auf die Existenz eines an Mikrotubuli gebundenen Zwischenprodukts mit allosterischen Eigenschaften hin.

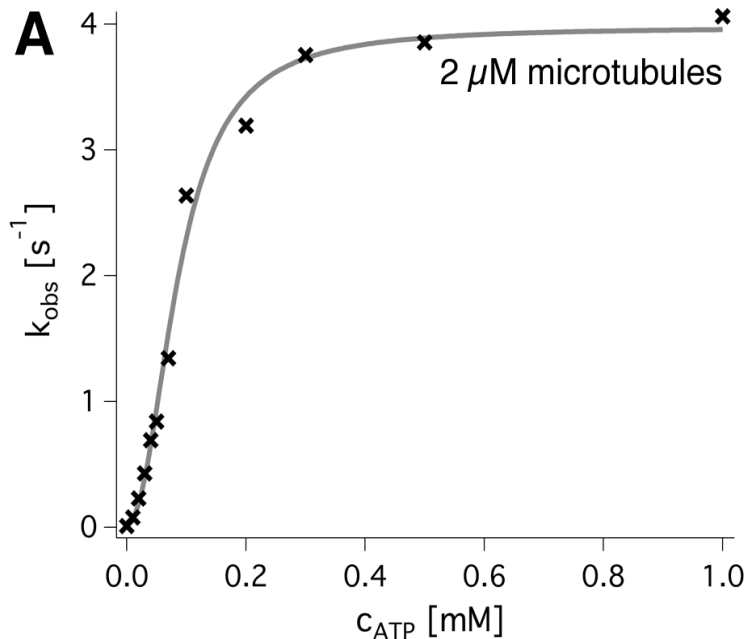


Abbildung III. 5: Abhängigkeit der ATPase-Rate von ATP.

Bild (A) zeigt einen linearen Plot der beobachteten ATP-Umsatzrate (schwarze Kreuze) gegen die ATP-Konzentration. Der Kurven-Fit (graue Linie) wurde mit Hilfe des Hill-Modells erhalten und führt zu folgenden Werten: $k_{\text{cat}} = 3,9/\text{s}$, $K_{1/2} = 0,09 \text{ mM}$ und einem Hill-Koeffizienten von $h = 2,2$ für die Beispielkurve.

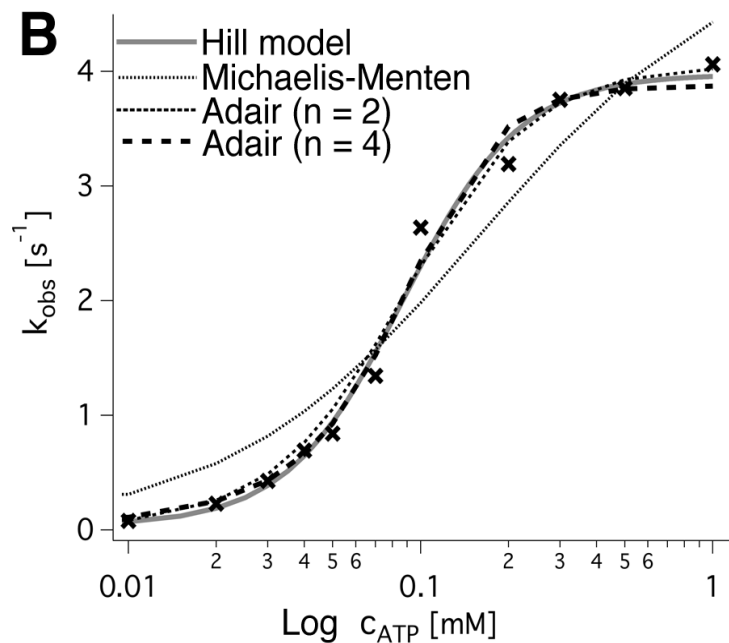


Bild (B) zeigt einen halb-logarithmischen Plot der Daten sowie einen Vergleich der verschiedenen Modelle (siehe experimentelle Methoden).

III.2.2 Einsatz von ATP-Analoga: ATP- γ S und AMPPNP

Um die Interaktion zwischen Spastin und Nukleotiden besser studieren zu können, wurde eine Kombination aus ATP und ATP- γ S eingesetzt. Letzteres Nukleotid fungiert dabei als Inhibitor (Abbildungen III.6/III.7). Der alleinige Einsatz von ATP- γ S führte in gekoppelten enzymatischen Tests zu keinen messbaren Hydrolyseraten. Unter den herangezogenen Bedingungen konnten Raten bis zu 0,05/s detektiert werden, so dass ATP- γ S noch langsamer durch Spastin hydrolysiert wurde. Ohne Kooperativität könnte man sich gut eine kompetitive Inhibition vorstellen. Tatsächlich verschob der Einsatz einer konstanten Konzentration an ATP- γ S die ATP-Menge, die für halbmaximale Geschwindigkeit erforderlich war, signifikant: ohne Inhibitor entsprach $K_{1/2} = 0,09 \pm 0,07$ mM ATP, dagegen $0,67 \pm 0,05$ mM für 0,2 mM ATP- γ S und $0,86 \pm 0,03$ für 0,5 mM ATP- γ S (Abbildung III.6).

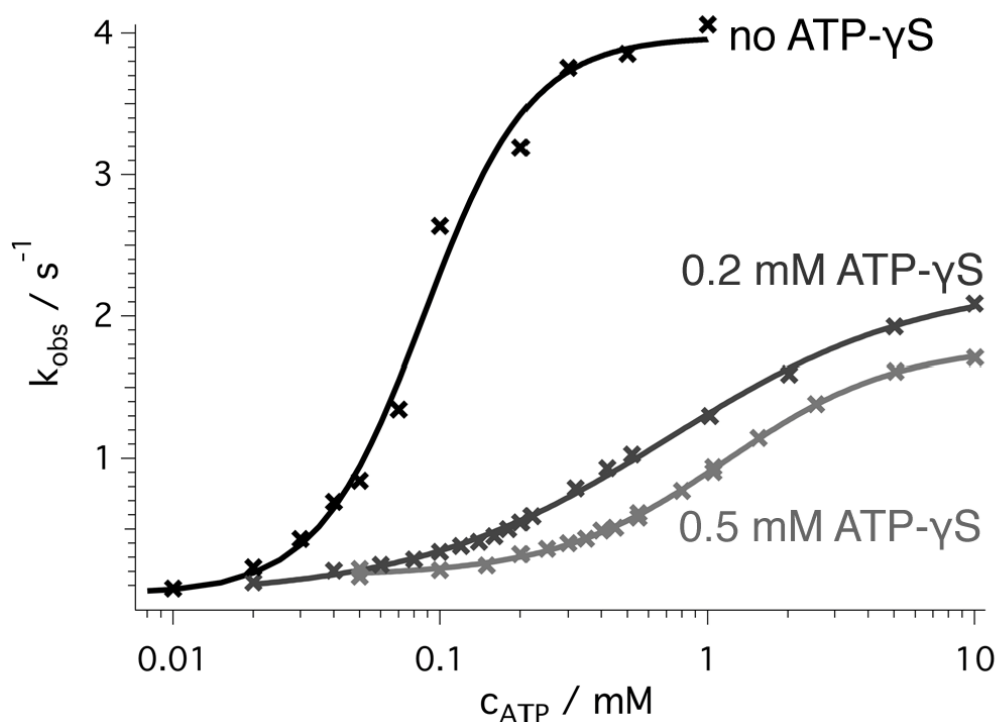


Abbildung III. 6: Effekt von ATP- γ S.

Vergleich des logarithmischen Plots der Wildtyp ATPase-Aktivität (schwarz, Verwendung des Hill-Modells analog zu Abbildung III.5) mit der Hydrolyserate in Gegenwart von 0,2 und 0,5 mM ATP- γ S. Der Graph zeigt einen Anstieg der ATP-Konzentration, die für halbmaximale Aktivierung erforderlich ist. Zugleich sinkt in Anwesenheit von 0,5 mM ATP- γ S k_{max} um den Faktor 2,5. Die Hill-Koeffizienten liegen bei $h = 0,91$ (0,2 mM ATP- γ S) und $1,35$ (0,5 mM ATP- γ S).

Zusätzlich zur beobachteten Abnahme der Hydrolyseraten ($3,9 \pm 0,2 \text{ s}^{-1} / 2,2 \pm 0,1 \text{ s}^{-1} / 1,6 \pm 0,0 \text{ s}^{-1}$) trat eine Tendenz zu geringeren Hill-Koeffizienten auf ($2,2 \pm 0,3 / 0,9 \pm 0,1 / 1,4 \pm 0,0$). Die komplementäre Studie – Messung der ATP-Hydrolyserate bei konstanter ATP-Konzentration und Titration mit ATP- γ S – resultierte in einer starken Abnahme der Umsatzrate, die mit Hilfe eines nicht-kompetitiven Modells bestimmt werden konnte (Abbildung III.7). Der beste Fit lieferte einen Wert für $K_{M,ATP}$ von $0,16 \pm 0,01 \text{ mM ATP}$, der mit den Werten $K_{1/2}$ und $K_{I, ATP\gamma S}$ von $0,11 \pm 0,01 \text{ mM}$ aus den direkten Messungen gut übereinstimmt. Diese Beobachtungen mit ATP- γ S stehen in Kontrast zu Kompetitionsmessungen, die mit dem ATP-Analogen AMPPNP durchgeführt wurden. AMPPNP löste keine Verringerung der maximalen ATP-Umsatzrate aus und fungierte somit als kompetitiver Inhibitor ($k_{max} = 3,9 \pm 0,2 / 3,5 \pm 0,1 / 3,6 \pm 0,1/\text{s}$; $K_{0,5ATP} = 0,08 \pm 0,01 / 0,24 \pm 0,03 / 0,40 \pm 0,05 \text{ mM}$ in Gegenwart von $0 / 0,2 / 0,5 \text{ mM}$ AMPPNP). Diese Resultate deuten darauf hin, dass ATP- γ S Spastin in einem Übergangsstadium festhält, in dem die ATP-gebundenen Untereinheiten nicht vollständig aktiviert sind. Es muss deutlich erwähnt werden, dass das hier benutzte nicht-kompetitive Inhibitionsmodell nur für den Fall gültig ist, dass ein einzelner Inhibitor genau eine katalytische Einheit reguliert (Fersht 1984). Für den Fall, dass das Substrat-Analogen ATP- γ S nennenswerte positive Bindungskoopertivität zeigen würde (zum Beispiel höhere Bindungsaffinitäten für zusätzliche Bindungsereignisse), wäre die Form der erhaltenen Kurve abweichend und würde einen Hill-ähnlichen Abfall zeigen (Abbildung III.7 und Gleichungen 9a/9b im Methodenteil).

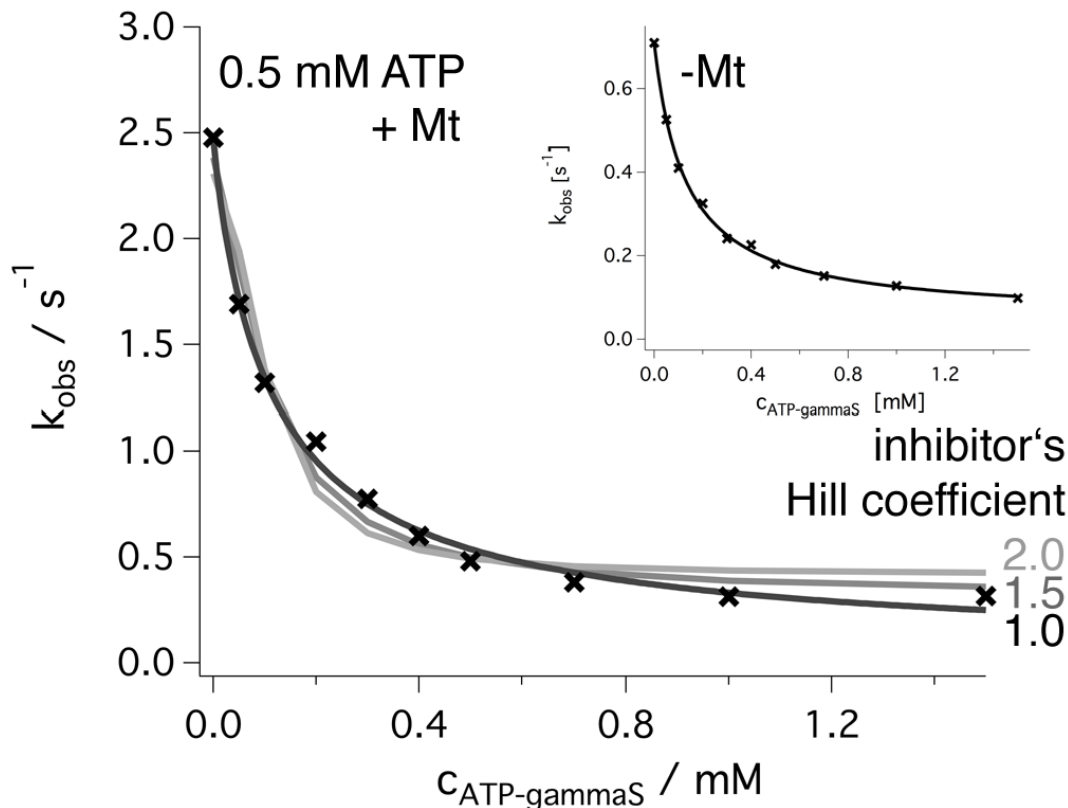


Abbildung III. 7: Inhibition der ATP-Umsatzrate durch ATP- γ S unter Verwendung einer konstanten ATP-Konzentration (0,5 mM).

Die beste Annäherung gelang mit einem nicht-kompetitiven Inhibitionsmodell (Gleichung 8) mit $K_{M,\text{ATP}} \approx 145 \mu\text{M}$ und $K_{I,\text{ATP-}\gamma\text{S}} \approx 180 \mu\text{M}$ (schwarze Linie). Die Annahme, dass der Inhibitor mit den Hill-Koeffizienten von 1,5 (dunkelgrau) und 2 (hellgrau) auf kooperativem Weg bindet (Gleichung 9b), führte zu systematischen Fehlern. Alle durchgeführten Messungen wurden in Gegenwart von $2 \mu\text{M}$ Mikrotubuli durchgeführt (sättigende Bedingungen). Das integrierte Bild zeigt die experimentellen Daten in Abwesenheit von Mikrotubuli. Die genäherten Werte sind: $k_{\text{max}} = 0,77 \pm 0,05/\text{s}$ für 0 mM ATP- γ S, $K_{M,\text{ATP}} = 84 \pm 4 \mu\text{M}$, $K_{I,\text{ATP}} = 131 \pm 12 \mu\text{M}$. Der Kurven-Fit extrapolierte bei unendlicher Menge an ATP- γ S gegen $0,04 \pm 0,01/\text{s}$.

Die Tatsache, dass das konventionelle Modell die Werte sehr gut annähert spricht dafür, dass ATP-gebundene Untereinheiten durch exakt eine andere Einheit im Hexamer beeinflusst werden. Es ist am wahrscheinlichsten, dass es sich dabei um eine benachbarte Untereinheit handelt. Wäre nämlich eine der übrigen Untereinheiten in der Lage, die ATP-gebundenen Untereinheiten zu beeinflussen, würde man eine deutlich geringere Inhibitionskonstante $K_{I,\text{ATP-}\gamma\text{S}}$ erwarten, die wesentlich niedriger als $K_{M,\text{ATP}}$ wäre. Die Auswertung der Daten lieferte dagegen sehr ähnliche Werte (0,16 und 0,18 mM).

III.2.3 Auswirkung mutierter Untereinheiten auf die Aktivität von Wildtyp-Spastin

Um den Einfluss mutierter Untereinheiten im Spastin-Oligomer und den dominanten Phänotyp von mutiertem Protein in HSP-Patienten genauer analysieren zu können, wurden Inhibitionsmessungen durchgeführt. Dabei wurden steigende Mengen an inaktiven E442Q-Untereinheiten zu einer konstanten Konzentration an Wildtyp-Spastin hinzugegeben. Dieses Modell wurde favorisiert, da man bei nicht existenter Interaktion zwischen Wildtyp und Mutante stets die gleiche ATP-Umsatzrate erwarten würde, selbst bei einem Überschuss an Mutante. Die Analyse der Daten lieferte einen Graphen mit einem starken Abfall der *Steady-State* Umsatzrate. Diese Abnahme zeigt eine Abhängigkeit zum Verhältnis mutierter Untereinheiten/Gesamtprotein (Abbildung III.8). Die im enzymatischen Test erhaltenen Datenpunkte zeigen keinerlei Anzeichen für mögliche Aggregationen oder systematische Änderungen der Umsatzraten. Somit kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass mutierte Spastin-Untereinheiten mit dem Wildtyp interagieren können. Aktivitätstests mit gemischten Wildtyp/Mutante-Oligomeren wurden bereits für andere Mitglieder der AAA-ATPase Familie, beispielsweise ClpA, ClpB und ClpX, durchgeführt (Martin, Baker et al. 2008; Werbeck, Schlee et al. 2008; Hoskins, Doyle et al. 2009). Die Interpretation der Ergebnisse ist jedoch sehr schwierig und kann für andere AAA-Enzyme abweichen. Deshalb wurden die erhaltenen Daten unter Verwendung alternativer Modelle analysiert (Abbildung III.8).

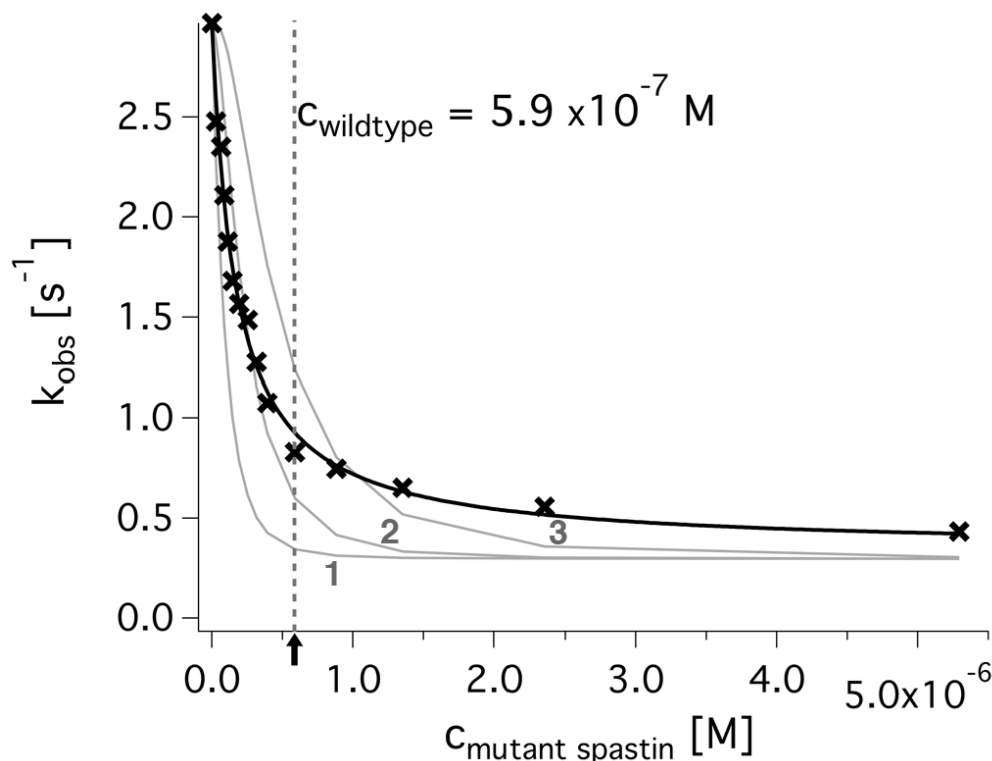


Abbildung III. 8: Inhibition von Wildtyp-Spastin durch die inaktive E442Q-Mutante.

Die enzymatische Aktivität von $5,9 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ Spastin (vertikale, gestrichelte Linie) wurde mit steigenden Konzentrationen an inaktivem Enzym gemessen. Die Datenpunkte (Kreuze) wurden mit dem Modell gefittet, das für Schema 2 aufgestellt wurde (Nachbar-Inhibition; schwarze Linie). Für Vergleiche wurden hypothetische Modelle (graue Linien) erstellt, die annehmen, dass eine, zwei oder drei inaktive Mutanten-Untereinheiten die Aktivität des Hexamers auf ein basales Niveau reduzieren (Extrapolation der Daten in den unendlichen Bereich).

Frühere Publikationen über Spastin schlagen eine Hexamer-Struktur für das aktive Enzym vor. Obwohl es umfangreiche strukturelle Daten und eine ausgeprägte Homologie zu anderen AAA-ATPasen gibt, welche die Hexamer-These stützen, fehlen aussagekräftige experimentelle Daten (White, Evans et al. 2007; Roll-Mecak und Vale 2008). Mit Hilfe der erhaltenen Daten kann noch keine genaue Aussage darüber getroffen werden, auf welcher Oligomerisationsstufe ATP-Hydrolyse stattfindet. Trotzdem liefert diese Arbeit ein Gerüst für die Aufklärung des Mechanismus. Einige Publikationen beziehen ihre Modelle auf eine zufallsbedingte Assemblierung von Monomeren zu Hexameren (Martin, Baker et al. 2008; Hoskins, Doyle et al. 2009). In diesem Fall beschreibt die Binomialverteilung die Wahrscheinlichkeit für den Einbau einer entsprechenden Anzahl an mutierten Untereinheiten in das Hexamer (siehe Methoden, Gleichung 15). In einem Modell, das starke Kooperativität über den gesamten oligomeren Ring zeigt, würde eine bestimmte Anzahl an mutierten Untereinheiten den Hydrolysegrad von Wildtyp-Einheiten im Hexamer auf einen basalen Wert

reduzieren. Die erhaltenen Daten zeigen eindeutig, dass dies für Spastin nicht zutrifft (Abbildung III.8, graue Linien zeigen Inhibitionsvorgänge durch 1, 2 und 3 inaktive Untereinheiten pro Hexamer). Alternativ könnte eine lineare Aktivitätskombination von Wildtyp-Untereinheiten in Ringstrukturen mit 0, 1, 2,...5 mutierten Untereinheiten auftreten, die mit den erhaltenen Daten konsistent sind. Tatsächlich können die Daten unter der Prämisse gut angenähert werden, dass Hexamere, bestehend aus 6 Wildtyp-Untereinheiten 100%, Ringe aus 5 Wildtyp-Untereinheiten und einer Mutante 35%, solche aus 4 Wildtyp- und 2 E442Q-Untereinheiten ebenfalls 35% Aktivität etc. aufweisen (30% bei einem Verhältnis von 3:3, 30% bei 2:4, 28% bei 1:5). Hinter dieser Kombination steckt jedoch keine Systematik und somit ist eine derartige Analyse wenig aussagekräftig. Deshalb lag der Fokus im Aufstellen eines Modells, welches das beobachtete Phänomen verständlich erklärt. Die Problematik konnte schließlich durch folgende Gedankengänge geklärt werden: das Modell ist unter der Annahme gültig, dass Interaktionen zwischen benachbarten Untereinheiten (kooperatives Verhalten) dominieren (siehe Gleichung 12–14 im Methodenteil). Dieses Modell akzeptiert zufällige Arten von Nachbarschaften (Wildtyp oder Mutante), geht jedoch von unterschiedlichen Dissoziationskonstanten aus ($Wt > Wt \rightarrow 2 Wt$, $Wt > Mut \rightarrow Wt + Mut, \dots$). Weiterhin wird angenommen, dass eine Wildtyp-Einheit als Nachbar eines weiteren Wildtyps vollständige, als Nachbar einer mutierten Untereinheit allerdings reduzierte Aktivität aufweist. Wie in den experimentellen Methoden beschrieben, umfasst das vorgestellte Modell eine Näherung, die erfüllt ist, solange die absolute Spastin-Konzentration hoch genug ist, dass das Monomer/Oligomer Gleichgewicht auf die Seite der Oligomere gezogen wird. Tatsächlich deutet die Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Enzymkonzentration (Abbildung III.9) darauf hin, dass die Experimente unter gesättigten Spastin-Konzentrationen durchgeführt worden sind. Somit sollte sich der Hauptteil von Spastin im aktiven, oligomeren Zustand befunden haben.

Die quantitative Analyse der durchgeführten Experimente führte zu folgenden Ergebnissen: in Gegenwart von 2 μM Mikrotubuli lag in Wildtyp (0,59 μM)/E442Q-Mischansätzen die durchschnittliche Umsatzrate für Wildtyp-Untereinheiten, die durch weitere Wildtyp-Einheiten flankiert wurden bei $k_{\text{cat}, Wt > Wt} = 3,45 \pm 0,06/\text{s}$. Die Hydrolyserate von Spastin-Wildtyp mit E442Q-Nachbarn wurde stark reduziert und betrug lediglich $0,30 \pm 0,02/\text{s}$. Der apparente K_d Wert bei flankierten Wildtyp-Spezies lag bei $K_{d, Wt > Wt} = 1,12 \cdot 10^{-7} \pm 8,3 \cdot 10^{-9} \text{ M}$, bei benachbarten Wildtyp/E442Q-Einheiten dagegen bei $K_{d, Wt > Mut} = 2,54 \cdot 10^{-7} \pm 2,6 \cdot 10^{-9} \text{ M}$. In Abwesenheit von Mikrotubuli sahen die erhaltenen Graphen sehr ähnlich aus und konnten deshalb mit demselben Modell angenähert werden. Bei einer Wildtyp-Konzentration von 1,2 μM lag die beste Annäherung bei $k_{\text{cat}, Wt > Wt} = 1,92 \pm 0,01/\text{s}$, $k_{\text{cat}, Wt > Mut} = 0,08 \pm 0,02/\text{s}$, $K_{d, Wt > Wt} = 1,49 \cdot 10^{-7} \pm 1,26 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ und $K_{d, Wt > Mut} = 9,9 \cdot 10^{-9} \pm 8,4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$. Die mit Hilfe des verwendeten Modells erhaltenen Daten $k_{\text{cat}, Wt > Wt}$ für Spastin in An- und Abwesenheit von Mikrotubuli

zeigten im Bereich der Standardabweichung relativ hohe Werte. Die wichtigste Aussage liegt jedoch darin, dass die erhaltenen Werte denen aus direkten Messungen gleichen (3,45/s vs. 3,83/s mit Mikrotubuli und 1,92/s vs. 0,78/s ohne Mikrotubuli). Der $K_{d,Wt>Wt}$ -Wert von ≈ 149 nM stimmt mit der halbmaximalen Aktivierungskonstante aus den ATPase-Tests bei Einsatz unterschiedlicher Spastin-Konzentrationen überein (Abbildung III.9). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die aus dem eingesetzten Modell erhaltenen Werte aussagekräftig sind.

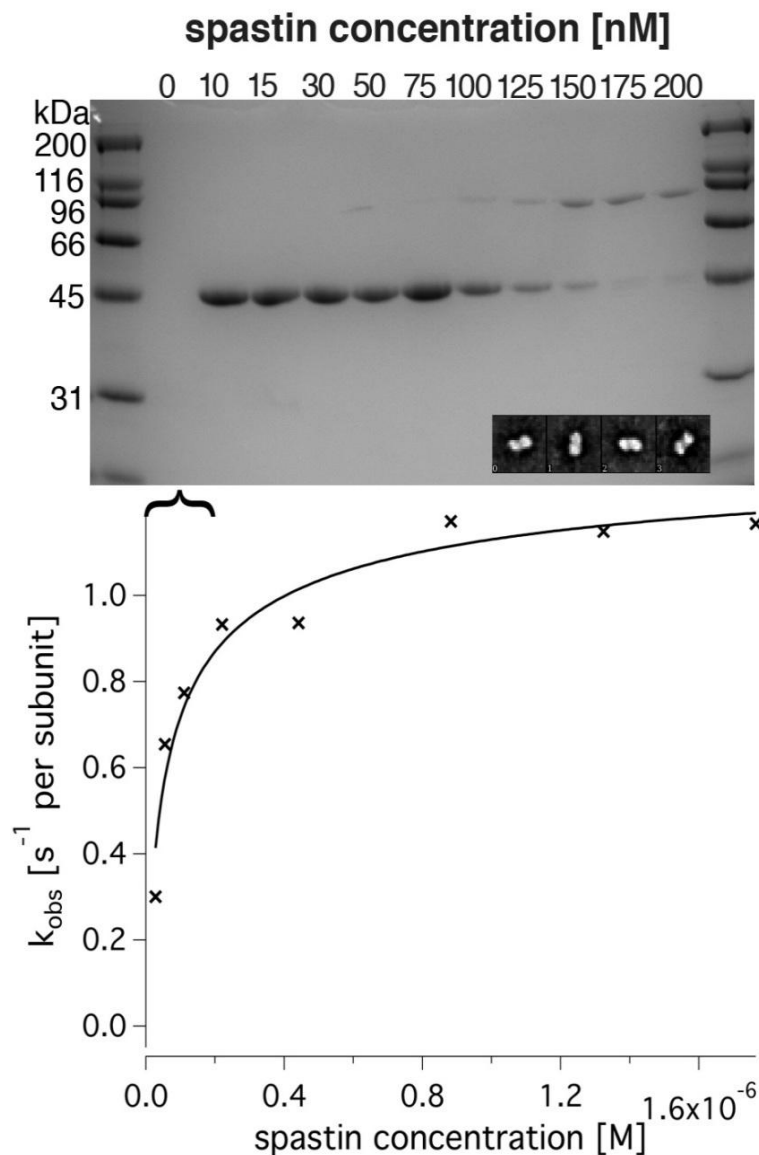


Abbildung III. 9: Abhängigkeit der Spastin-Aktivität von der Enzymkonzentration.

Der untere Abschnitt zeigt die *Steady-State* ATPase-Aktivität von Spastin in Gegenwart von 2 mM ATP und Abwesenheit von Mikrotubuli (Kreuze). Der Kurven-Fit wurde mit Hilfe der Gleichung für die Dimer-Bildung erstellt (Gleichung 1). Die ATP-Umsatzrate pro Untereinheit steigt auf maximal 1,2/s und erreicht eine halbmaximale Geschwindigkeit in einem Bereich zwischen 50 und 100 nM Spastin.

Der obere Abschnitt zeigt ein SDS-Gel mit Spastin, das mit dem *Cross-Linker* EDAC behandelt wurde. Der überlappende Anteil wird durch die geschweifte Klammer oberhalb der ATPase-Kurve angedeutet. Mit steigenden Spastin-Konzentrationen sinkt der Anteil an Monomeren, während eine Dimer-Fraktion im Bereich zwischen 125 und 200 nM maximal zunimmt. Die Proteinmenge nimmt möglicherweise aufgrund auftretender Aggregate, welche nicht in das Gel hineinwandern konnten, sukzessive ab.

Das integrierte Bild zeigt 4 Klassen von Spastin-Molekülen, die unter der angegebenen Bedingung dominierten (200 nM Spastin, 20 μ M EDAC).

III.2.4 Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und *Severing*-Aktivität

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die beobachteten Inhibitionserscheinungen in Wildtyp/Mutante-Mischpopulationen auch auf die mechanische *Severing*-Aktivität von Spastin zutreffen. Zu diesem Zweck wurde eine mikroskopisch basierte *Severing*-Studie durchgeführt.

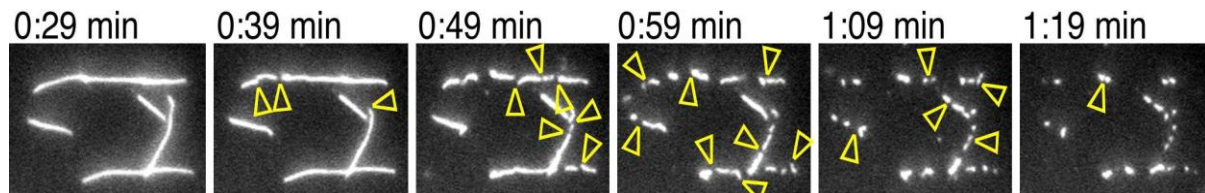


Abbildung III. 10: *Severing*-Aktivität von Spastin.

ALEXA555-markierte Mikrotubuli wurden an die Oberfläche eines Deckglases gebunden und mit 300 nM Spastin und 1 mM ATP inkubiert. Es ist zu beachten, dass die entstandenen Lücken im Filament nicht durch End-Depolymerisation sondern ausschließlich durch Brüche entstanden sind.

Um die Daten analysieren zu können, wurden für unterschiedliche Mischpopulationen (Wildtyp/Mutante) die Zeiten vom Start der Reaktion (Zugabe von Spastin und ATP in die Flusskammer) bis zum Auftreten von *Severing*-Ereignissen gemessen. Diese sogenannte *Pre-Severing Lag*-Phase muss von der Phase unterschieden werden, in der Mikrotubuli durch eine Vielzahl von Brüchen abgebaut werden (*Burst*-Phase). *Severing* trat erst nach einer bestimmten Zeitspanne ein und setzte sich danach sehr rasch über den gesamten Mikrotubulus fort. Deshalb wurde bei der Analyse der Fokus auf die *Pre-Severing* Phase gelegt. Für die Analyse wurde die Anzahl an Brüchen pro Zeit auf die initiale Länge an registrierten MT normiert. Es ist zu beachten, dass durch die *Severing*-Aktivität die Länge der Mikrotubuli reduziert wird, bis nur noch kleine Fragmente vorhanden sind. Da zahlreiche geschnittene Fragmente den Halt an die Oberfläche verlieren und wegdiffundieren, können im Hintergrund weiterhin *Severing*-Ereignisse auftreten. Zur Analyse wurden die *Pre-Severing* Zeiten bei unterschiedlichen Mischverhältnissen von Wildtyp zu Mutante bewertet. Das Histogramm in Abbildung III.11 zeigt die Zeiten, bei denen *Severing*-Ereignisse registriert wurden. Die Verteilung ist dabei Gauß-förmig. Die Mitte der Gauß-Verteilung lieferte eine *Pre-Severing* Zeit, deren reziproker Wert die *Pre-Severing* Rate ergab.

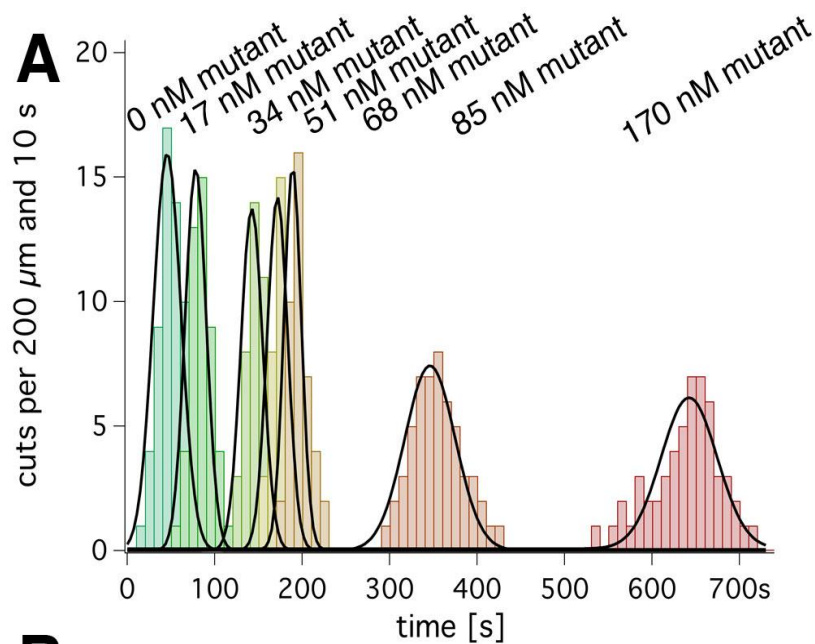


Abbildung III. 11: Einfluss der inaktiven E442Q-Mutante auf die Severing-Aktivität.

Bild (A) zeigt ein Histogramm mit den registrierten Severing-Ereignissen. Unterschiedliche Konzentrationen an inaktiver Mutante sind durch wechselnde Farben angegeben. Die Konzentration von Wildtyp blieb konstant (470 nM), dunkle Linien repräsentieren Gauß-Fits für jede verwendete Bedingung.

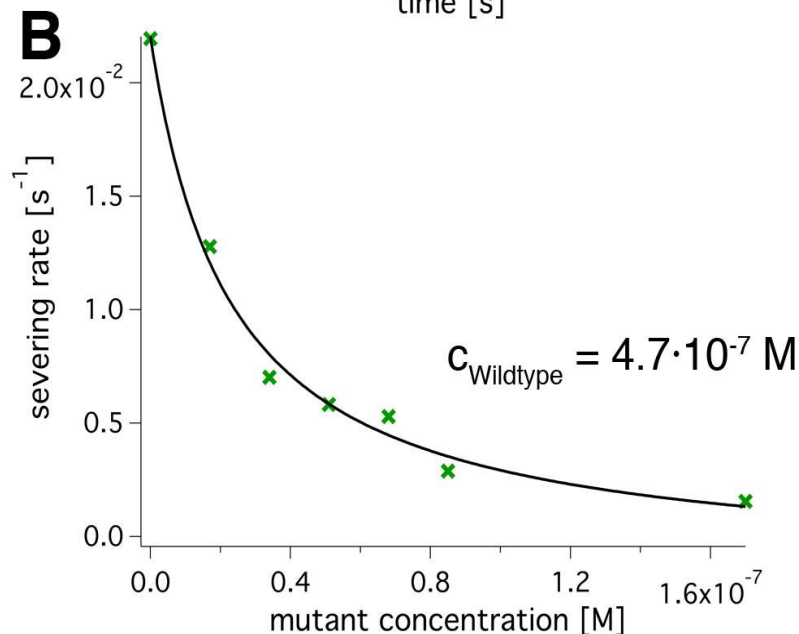


Bild (B) zeigt einen Plot der reziproken Zeit aus Bild A und gibt den Wert als Pre-Severing Rate gegen die Konzentration an Mutante an. Die Daten wurden mit Hilfe des erstellten Nachbar-Interaktionsmodells genähert (Gleichung 15, schwarze Linie).

Sehr auffällig war die Beobachtung, dass der Wildtyp ($0,47 \mu\text{M}$) für das Auftreten erster Severing-Ereignisse $46 \pm 22 \text{ s}$ benötigte. Dieses Phänomen deutet darauf hin, dass die Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und Severing sehr ineffizient ist. Das Beobachtungsvolumen betrug etwa $160 \mu\text{m} \cdot 160 \mu\text{m} \cdot 0,2 \mu\text{m}$, was $\approx 5 \cdot 10^{-15} \text{ m}^3$ entspricht. Somit lag die maximale Anzahl an Spastin-Monomeren in einem Beobachtungsfeld bei etwa 10^6 . Nimmt man für die katalytische Aktivität einen Wert von $k_{\text{cat}} = 4/\text{s}$, so läge die Anzahl an hydrolysierten ATP-Molekülen im Beobachtungsvolumen innerhalb von 46 Sekunden in einem Bereich zwischen 10^7 und 10^8 . Tatsächlich konnten in diesem Beobachtungsvolumen zwischen 1 und 100 Severing-Ereignisse registriert werden. Es ist somit nicht auszuschlies-

sen, dass die verwendete Studie systematische Fehler erzeugte (zum Beispiel durch den Einsatz von Paclitaxel). Zudem könnte trotz der Verwendung von Pluronic®-F127 als Passivierungs-Co-Polymer ein entsprechender Anteil an Spastin an der Oberfläche des Deckglases kleben bleiben. Andererseits zeigen publizierte Daten, dass *Severing* erst nach Verstreichen mehrerer Sekunden eintritt (Hartman und Vale 1999; Roll-Mecak und Vale 2005; White, Evans et al. 2007). Um die Kooperativität von Spastin in *Severing*-Messungen bestimmen zu können, wurden steigende Konzentrationen von E442Q zu einer konstanten Menge an Wildtyp hinzugefügt. Interessanterweise wurde durch die inaktive Mutante lediglich die *Pre-Severing* Phase beeinflusst, während der nachfolgende *Severing*-Vorgang nicht beeinträchtigt wurde. Um den Einfluss der E442Q-Mutante auf die *Severing*-Aktivität von Wildtyp-Spastin näher zu analysieren, lag der Fokus deshalb auf der *Pre-Severing Lag*-Zeit. Die Messungen zeigten, dass mutierte Untereinheiten die *Severing*-Aktivität von Spastin noch drastischer reduzieren, als in den durchgeführten enzymatischen Tests bereits registriert werden konnte. Die *Pre-Severing* Rate einer konstanten Menge an Wildtyp-Protein, welche gegen die Konzentration an eingesetzter Mutante geplottet wurde, konnte mit dem Modell, das bereits für die Bestimmung der enzymatischen Raten herangezogen wurde, angenähert werden (Abbildung III.11B). In der *Severing*-Studie war die Inhibition der Wildtyp-Aktivität deutlich stärker ausgeprägt, so dass die ATP-Umsatzrate im Überschuss an mutierter Untereinheit gegen 0 (Aktivität) extrapoliert. Weniger als 5% E442Q reduzierten die *Severing*-Aktivität um 50%. Diese Beobachtungen sind konsistent mit der Aussage, dass die Kopplung zwischen ATP-Hydrolyse und *Severing*-Aktivität sehr schwach ausgeprägt ist.

III.2.5 Oligomerisierung von Spastin

Kenntnisse über die Oligomerisierung von Spastin könnten Hinweise dafür liefern, ob das erstellte Modell tatsächlich legitim ist. Deshalb wurde überprüft, unter welchen Umständen Spastin höhere Formen ausbilden kann. Um aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten wurden *Cross-Linking* Experimente, Ultrazentrifugationsläufe und elektronenmikroskopische Strukturanalysen durchgeführt. Dieses breite Methodenspektrum brachte hervor, dass es sich bei Spastin um ein sehr komplexes Oligomerisierungsmuster handelt. Die Daten, die mit Hilfe der unterschiedlichen Methoden erhalten wurden, werden im Folgenden komprimiert zusammengefasst: unter zahlreichen Bedingungen lag das Spastin-Protein als Monomer vor. *Cross-Linking* Untersuchungen zeigten, dass mit erhöhter Proteinkonzentration eine Dimer-Fraktion dominant ist. Höhere Oligomerformen traten nur bei der E442Q-Mutante in Gegenwart von ATP auf. Die Auswertung der Ultrazentrifugationsläufe deutet darauf hin, dass Spastin in Form von

Trimeren oder Tetrameren vorliegt. Die Analyse mikroskopischer Bilder zeigte eine deutliche Dominanz von Ringstrukturen. In *Cross-Linking* Experimenten wurde Spastin mit der gewünschten Konzentration in Gegenwart von 1 mM ATP inkubiert. *Cross-Linking* wurde durch Zugabe von 20 μ M EDAC/NHS induziert, nach 15-minütiger Inkubation abgestoppt und anschließend auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung III.9). Das Gel zeigt mit zunehmender Proteinkonzentration eine Zunahme an gekoppeltem Enzym. Dabei reduzierte sich bei einer Protein-Konzentration von 200 nM der Anteil an Monomer drastisch. Parallel zu dieser Abnahme konnte eine zunehmende Dimer-Fraktion mit einem Molekulargewicht von \approx 85-kDa detektiert werden. Massenspektroskopische Untersuchungen bestätigten, dass es sich bei dieser Fraktion um eine Kombination aus zwei Spastin-Monomeren handelt. Im analysierten Konzentrationsbereich konnten keine höheren Oligomer-Formen registriert werden, möglicherweise aufgrund von Löslichkeitsproblemen nach durchgeführter TCA-Fällung. Bei Einsatz höherer Proteinkonzentrationen im μ M-Bereich konnte eine zusätzliche Spezies erkannt werden, die sich in einem Bereich $>$ 200-kDa bewegte (siehe Punkt III.3.12). Analyseprogramme konnten allerdings nicht eindeutig bestätigen, dass es sich dabei um Hexamere handelt. Aus den elektronenmikroskopischen Bildern konnte jedoch eindeutig abgeleitet werden, dass es sich bei den ringförmigen Strukturen um Hexamere handelt. Die Bildung von Dimeren im Zug der durchgeführten *Cross-Linking* Experimente deutet auf die Wichtigkeit von Dimer-Interaktionen für die Ausbildung des aktiven Hexamers hin. Aus den Datenpunkten konnte ein $K_D = 100\text{--}175$ nM abgeleitet werden. Die Konzentrationsabhängigkeit der Kopplung von Spastin-Untereinheiten deckt sich dabei mit der Konzentrationsabhängigkeit der ATPase-Rate (Abbildung III.9). Analysen mit der Ultrazentrifuge ergaben, dass neben einer Monomer-Spezies auch diverse höhere Formen existent sind (Abbildung III.13A). In Gegenwart sowie in Abwesenheit von 1 mM ATP sedimentierte ATTO488-markiertes Protein mit einer Svedberg-Konstante von 3,1. Befand sich dagegen 1 mM ATP- γ S im Ansatz, so resultierte dies in einem breiten Peak mit einem Maximum bei 4,3 S. Es ist gut vorstellbar, dass es sich bei dem breiten Signal um die Summe zweier Spezies handelt. Die Läufe wurden mit Spastin-Konzentrationen von 0,1 und 1 μ M durchgeführt. Die E442Q-Mutante lieferte in Gegenwart von ATP Svedberg-Werte von 3,1 S und 6,4 S. Die Analyse der Sedimentationsgeschwindigkeiten mit dem Software-Paket UltraScan (Demeler 2005) lieferte molare Massen von 44–48 kDa (3,1 S-Spezies), 65–70 kDa (4,3 S-Spezies) und 123–125 kDa (6,4 S-Spezies). Die auftretende Spezies bei 6,4 S konnte auch in 50/50-Mischpopulationen von ATTO488-Wildtyp und unmarkierter Mutante registriert werden. Der Anteil an höheren Oligomeren belief sich dabei auf ungefähr 5% des maximalen Fluoreszenzsignals. Da der Wildtyp alleine in keinem der durchgeführten Läufe höhere Oligomere bildete, ist die Beobachtung ein Indiz dafür, dass Mutante und Wildtyp miteinander assemblieren können. Die aus den Svedberg-Einheiten (4,3

und 6,4 S) berechneten molekularen Massen könnten wesentlich höher liegen, da das beschriebene Modell von einer starken Dynamik während des AUZ-Laufs ausgeht. Da es keine quantitativen Informationen hinsichtlich der Dimerisierung und Hexamerisierung von E442Q gibt, würde die Anwendung eines dynamischen Analysemodells wenig aussagekräftige Resultate liefern. Die analysierten Daten zeigen zwei essentielle Punkte: zum einen ist die inaktive E442Q-Mutante in der Lage Multimere zu bilden, die aus mindestens drei Untereinheiten bestehen. Zweitens können Wildtyp und mutierte-Untereinheiten co-assemblieren. Interessant ist die Erkenntnis, dass der Wildtyp in Ultrazentrifugationsläufen keine höheren Strukturen lieferte, während im *Cross-Linking* Experiment stabile Dimere registriert werden konnten. Dies deutet darauf hin, dass das Dimer sehr instabil ist und schnell in Monomere zerfällt. In einem letzten Schritt wurde die Oligomerisierung auf der Ebene der Elektronenmikroskopie untersucht. Die Proben wurden dabei auf Karbon-Gitter pipettiert und durch Uranylformiat fixiert. Längere Inkubationszeiten führten dabei zu einer drastisch erhöhten Dissoziation höherer Formen zu Monomeren (Abbildung III.12).

E442Q Spastin + 1 mM ATP

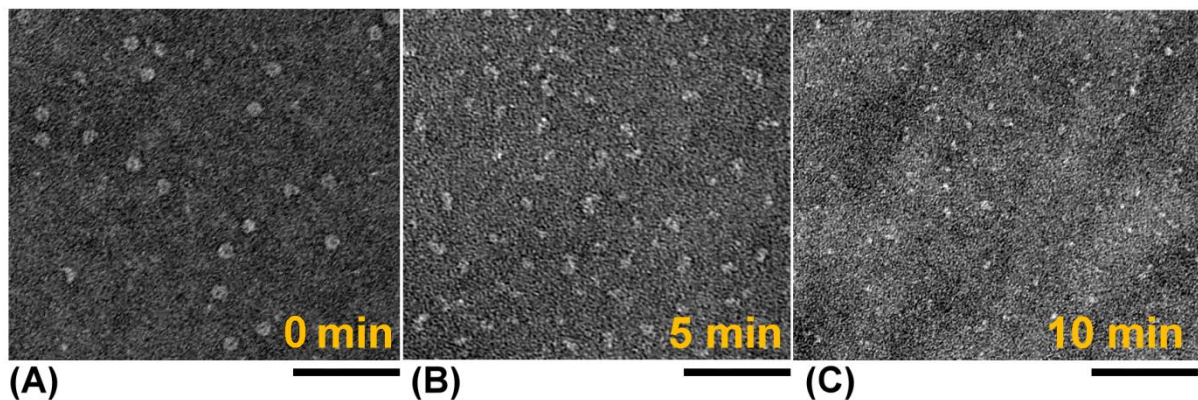
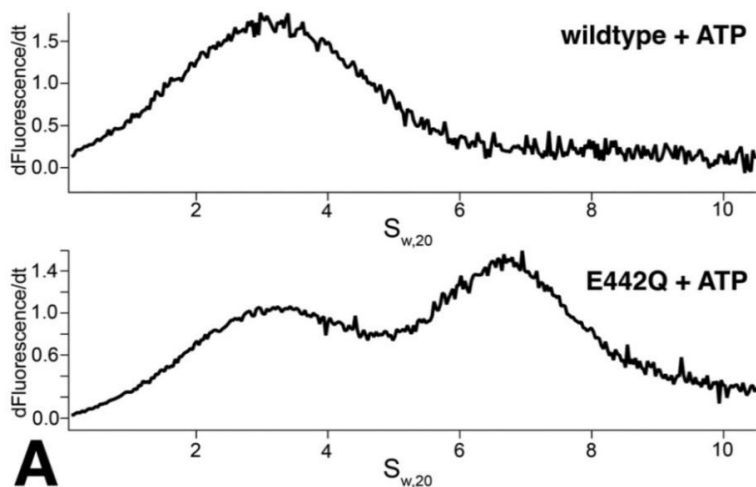


Abbildung III. 12: Instabilität der Hexamer-Ringstrukturen.

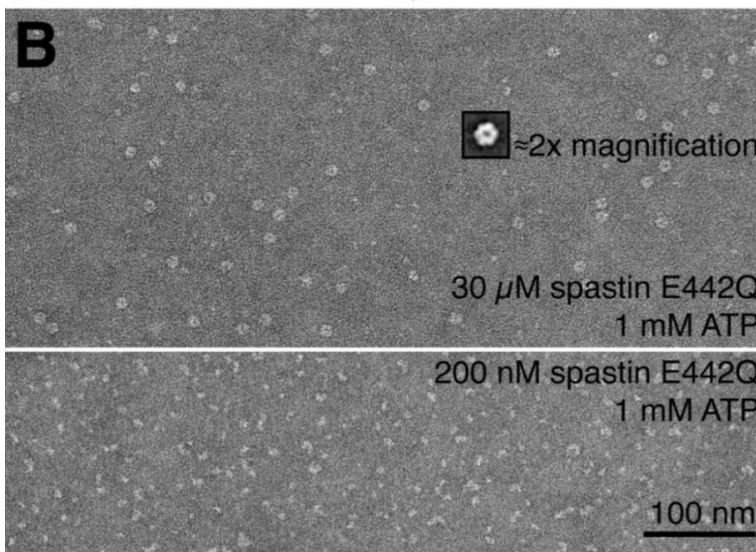
Nach Verdünnung der Spastin-Probe in den submikromolaren Bereich wurden Hexamerstrukturen instabil und zeigten Zerfallserscheinungen. **(A)** Kurze Zeit nach der Verdünnung der Proteinkonzentration konnten noch hauptsächlich homogene ringförmige Strukturen detektiert werden, während **(B)** nach 5 Minuten geöffnete Ringe und Zwischenstufen dominierten. **(C)** Zu späteren Zeitpunkten konnten nur noch einzelne Spastin-Untereinheiten beobachtet werden. Horizontaler Maßstab = 100 nm.

Somit kann abgeleitet werden, dass die Dissoziationsrate im Bereich von Sekunden bis wenigen Minuten liegt. Analog zu den AUZ-Läufen konnten im Fall von Wildtyp-Spastin ausschließlich Monomere und somit keine stabilen Oligomere registriert werden. Nur die mutierte E442Q-Version lieferte in Gegenwart von 1 mM ATP zahlreiche homogene Ringstrukturen (Abbildung II.13B, oberer Abschnitt). Der Grad der Oligomerisierung war erneut von der Proteinkonzentration abhängig. Die Hexamerisierung war ausgeprägt, wenn

hochkonzentriertes Protein (30 μM) eingesetzt wurde. Bei Proteinkonzentrationen im submikromolaren Bereich dominierten dagegen inhomogene oder geöfnete Ringstrukturen, die entweder Abbaufragmente von Hexameren oder Zwischenstufen darstellten (Abbildung III.13B, unterer Abschnitt). Diese Beobachtungen bestätigen, dass oligomere Formen sehr instabil sind und rasch in Monomere zerfallen können. Die Struktur-Mittelung (Partikel-Averaging) zahlreicher Ringstrukturen verdeutlicht, dass die erstellten Spastin-Klassen aus jeweils 6 Untereinheiten bestehen.



A



B

Abbildung III. 13: Oligomerisierungsstudien.

(A) Analytische Ultrazentrifuge. Im Sedimentationslauf wurde die Sedimentationsgeschwindigkeit von 1 μM ATTO488-gelabeltem Spastin verfolgt. Der Graph zeigt die Fluoreszenzintensität ($C(s)$) gegen den Sedimentationskoeffizienten. Die Berechnung der Sedimentationsgeschwindigkeit erfolgte dabei durch das Software-Paket UltraScan. Wildtyp-Spastin sedimentiert in Gegenwart von ATP bei einem S-Wert von 3.1, was einem Molekulargewicht von 44-46 kDa entspricht. Demgegenüber sedimentiert die E442Q-Mutante zusätzlich bei 6,4 S und zeigt demnach eine molekulare Masse von ≈ 125 -kDa.

(B) Elektronenmikroskopisches Bild von Spastin (*Negative-Stain*). Die Bildhälften zeigen Proben mit geringer und hoher Konzentration von E442Q in Gegenwart von ATP. Nur bei höheren Protein-Konzentrationen ($> 1 \mu\text{M}$) sind homogene Ringstrukturen zu erkennen, welche nach dem Partikel-Averaging eindeutige Hexamere liefern (integriertes Bild).

III.3 Ergebnisse – Strukturelle Analyse

III.3.1 Herstellung der Spastin-Konstrukte und Proteinexpression

Das für Spastin codierende Gen wurde aus dem pet28a-Vektor in einen pGEX6P2-Vektor transferiert. Anschließend erfolgte die Amplifikation der GFP-DNA aus dem eGFP-Plasmid. Die Basensequenz von GFP wurde an den N-Terminus von Spastin gekoppelt, so dass ein Fusionsprotein konstruiert wurde, bestehend aus dem grün-fluoreszierenden Protein GFP und $\Delta 227$ -Spastin.

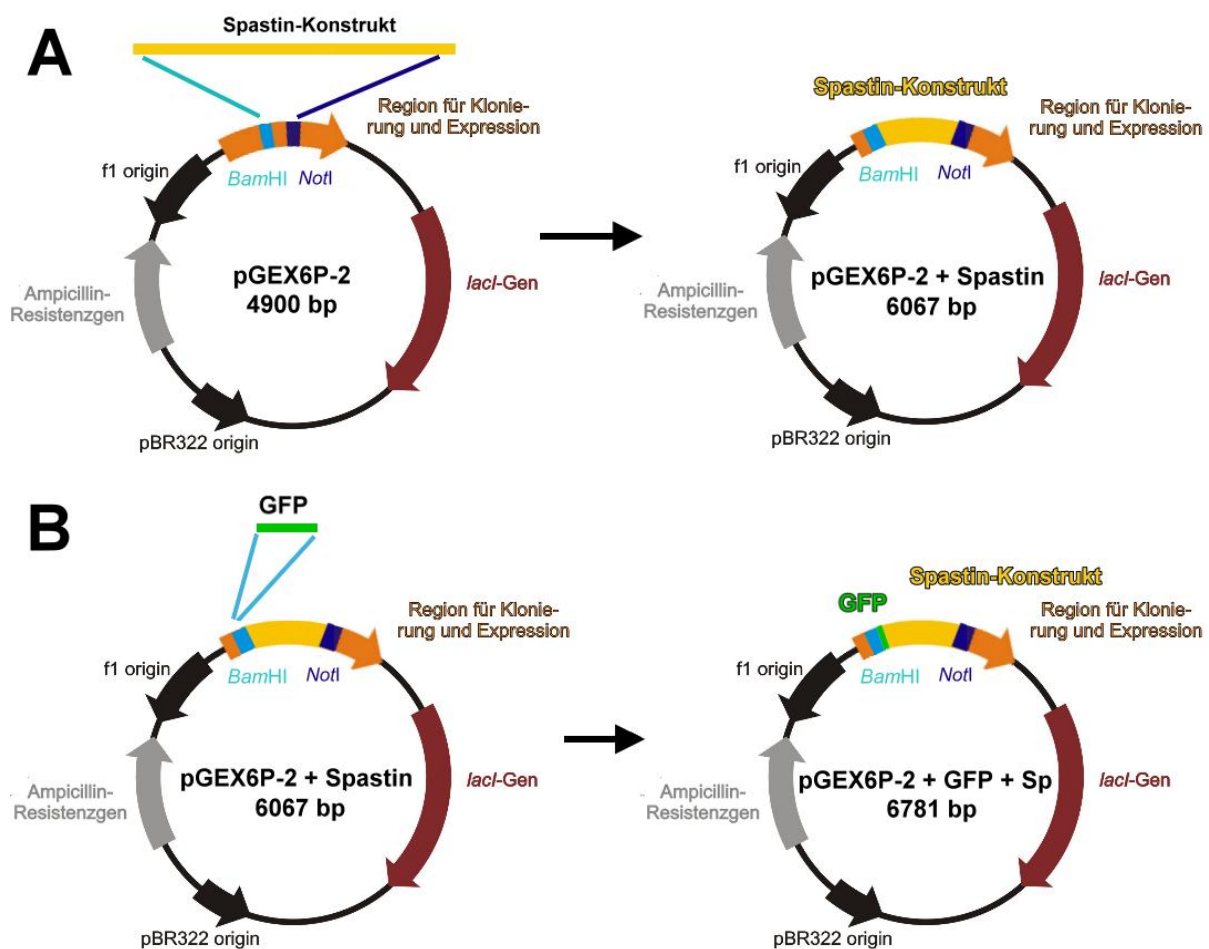


Abbildung III. 14: Konstruktion der pGEX6P2-Plasmide.

(A) Im ersten Schritt wurde das Spastin-Gen in den pGEX6P2-Vektor kloniert. Vektor-DNA und Spastin-PCR Produkt wurden mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten.
(B) Im zweiten Schritt erfolgte der Transfer des Fluoreszenzmarkers GFP an den N-Terminus von Spastin. Geschnitten wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI.

(Abbildungen modifiziert nach Gieseke 2008)

III.3.2 Insertion von Spastin und GFP in den pGEX6P2-Vektor

Die PCR-Amplifikation des Spastin- und GFP-Gens resultierte in DNA-Produkten, die eine Größe von 1167 bp respektive 714 bp zeigten. Die Sequenz für Spastin wurde in den pGEX6P2-Vektor kloniert und erfolgreiche Insertion durch Restriktionsverdau überprüft. Die DNA von gepickten Klonen wurde sequenziert um sicher zu gehen, dass das Plasmid das Spastin-Insert mit der entsprechenden Basensequenz ohne mutative Bereiche trägt. Das GFP-Gen wurde durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI in den pGEX6P2-Spastin-Vektor kloniert und ebenfalls durch Sequenzanalyse auf Korrektheit überprüft.

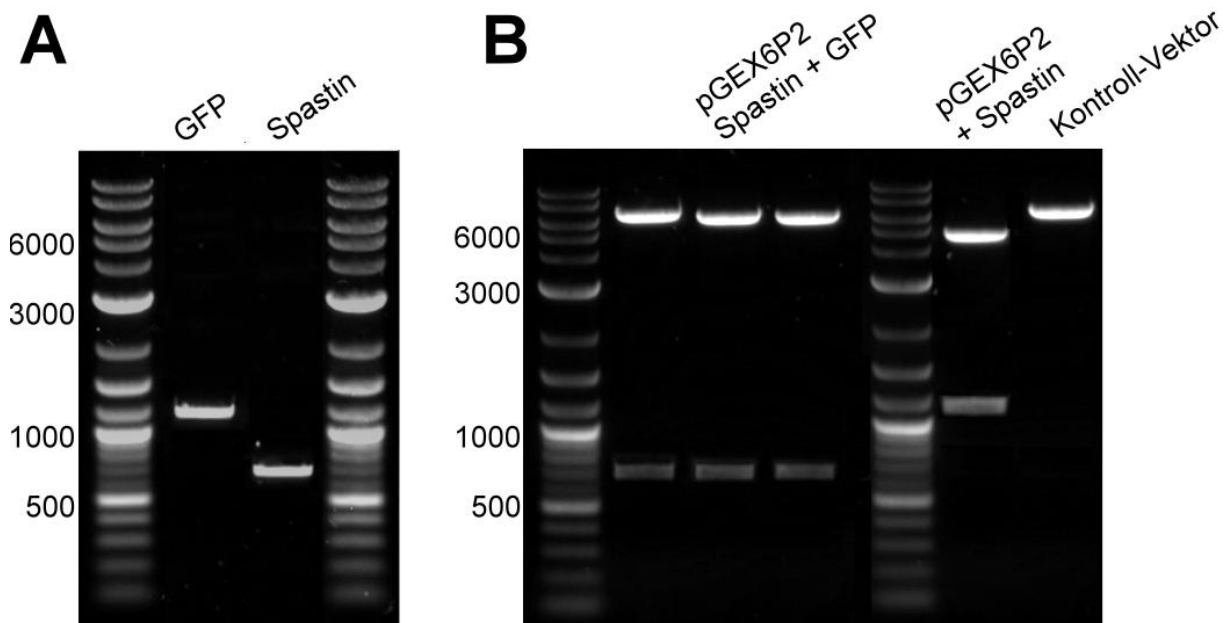


Abbildung III. 15: Überprüfung der PCR-Produkte.

(A) PCR-Amplifikation der Spastin-DNA sowie des GFP-Gens aus dem eGFP-Plasmid. Die Spastin-Sequenz umfasst 1167 bp, während GFP eine Größe von 714 bp aufweist.

(B) Linke Seite: Testverdau des pGEX6P2 Spastin-Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I. Rechte Seite: Restriktionsverdau der pGEX6P2 GFP-Spastin DNA unter Einsatz des Enzyms *Bam*HI. Nach komplettiertem Verdau zeigen die Proben jeweils zwei Banden, die dem geschnittenen Vektor und dem daraus entfernten *Insert* entsprechen. Der pGEX6P2-Vektor hat eine Größe von 4900 bp, GFP umfasst 714 bp und Spastin weist 1167 bp auf. Zudem wurde ein Kontroll-Vektor (pGEX6P2 GFP-Spastin) mit einer Größe von 6781 bp visualisiert.

III.3.3 Aufreinigung der Spastin-Fusionskonstrukte

Alle Spastin-Konstrukte enthielten einen N-terminalen *GST-Tag*, so dass für die Proteinaufreinigung eine Affinitätschromatographie unter Einsatz von Glutathion-Sepharose Säulenmaterial eingesetzt wurde. Die Elutionsfraktionen zeigen auf dem SDS-Gel (Abbildung III.16) jeweils eine deutliche Bande im Größenbereich von 70-kDa, die dem Fusionsprotein GST-Spastin (27,5 + 42,5-kDa) entspricht. Um den Reinheitsgrad von Spastin weiter zu erhöhen, wurde ein Kationenaustauscher eingesetzt. Spastin hat einen sehr hohen isoelektrischen Punkt, der bei 9,6 liegt. In diesem Fall stellt der starke Ionenaustauscher Sulfopropyl(SP)-Sepharose ein sehr effizientes Mittel zur Abtrennung von Fremdproteinen dar. Da der *GST-Tag* zur Dimerisierung neigt und somit Messungen beeinträchtigen könnte, wurde der *Affinitäts-Tag* durch Einsatz der *PreScission*-Protease entfernt. Nach dem Verdau wurde das Protein erneut mit Glutathion-Sepharose inkubiert. Während der abgetrennte *GST-Tag* an das Säulenmaterial binden konnte, befand sich das unfusionierte Spastin nach Zentrifugation im Überstand. $\Delta 227$ -Spastin hat eine Größe von 42,5-kDa und konnte auf dem SDS-Gel als reines Protein identifiziert werden. $\Delta 227$ -Spastin wurde in dieser Form in Messungen eingesetzt.

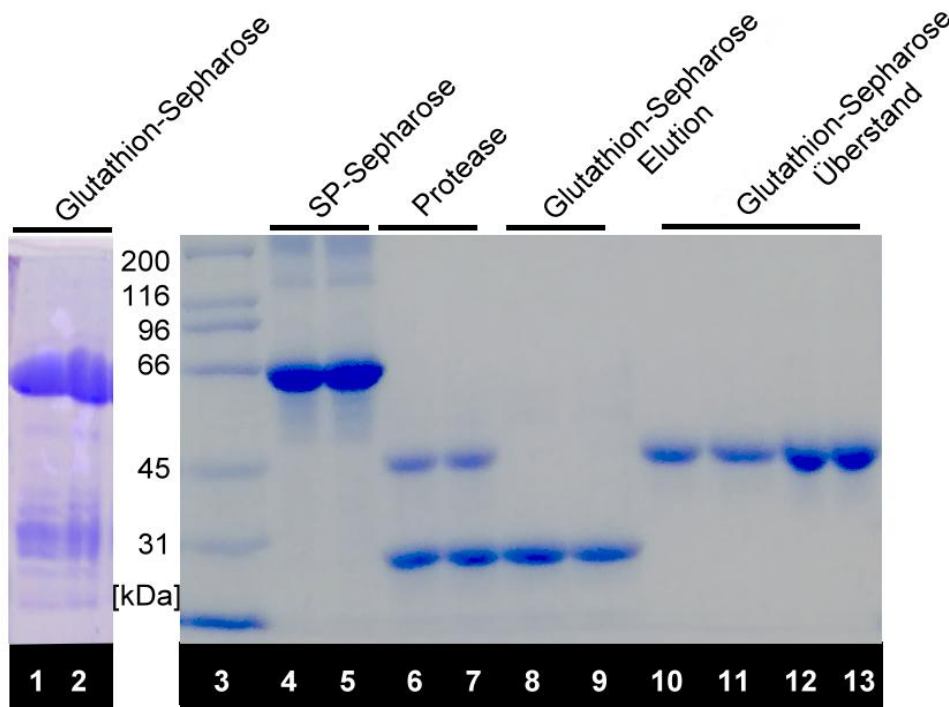


Abbildung III. 16: Aufreinigung von $\Delta 227$ -Spastin.

Spuren 1/2: Glutathion-Sepharose, Spur 3: Marker, Spuren 4/5: SP-Sepharose, Spuren 6/7: Schneiden des Fusionsproteins mit *PreScission*-Protease, Spuren 8/9: Elutionsfraktionen mit abgekoppeltem GST (27-kDa), Spuren 10–13: Überstand zeigt das unfusionierte Spastin-Protein bei 42,5-kDa (12% SDS-Polyacrylamid-Gel).

Bis zu diesem Abschnitt wurden Interaktion der Spastin-Untereinheiten im Hexamer und Einfluss der Walker B-Mutante auf die ATPase-Aktivität von Wildtyp-Untereinheiten mit Hilfe kinetischer Modelle beleuchtet. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Funktionsweise von Spastin auf der Ebene von Einzelmolekülen zu studieren. Zu diesem Zweck wurde GFP-Spastin eingesetzt, um die Arbeitsweise des Proteins mittels Fluoreszenzmikroskopie analysieren zu können.

III.3.4 Bewegung von GFP-Spastin am Mikrotubulus

Bisher wurde das Verhalten von Spastin beim Abbauprozess der Mikrotubuli nicht visualisiert, so dass in diesem Bereich noch keine Daten zur Verfügung standen. Deshalb wurden TIRF-Experimente unter Einsatz spezifischer Flusskammern durchgeführt, deren Aufbau in Abbildung III.17 schematisch dargestellt ist.

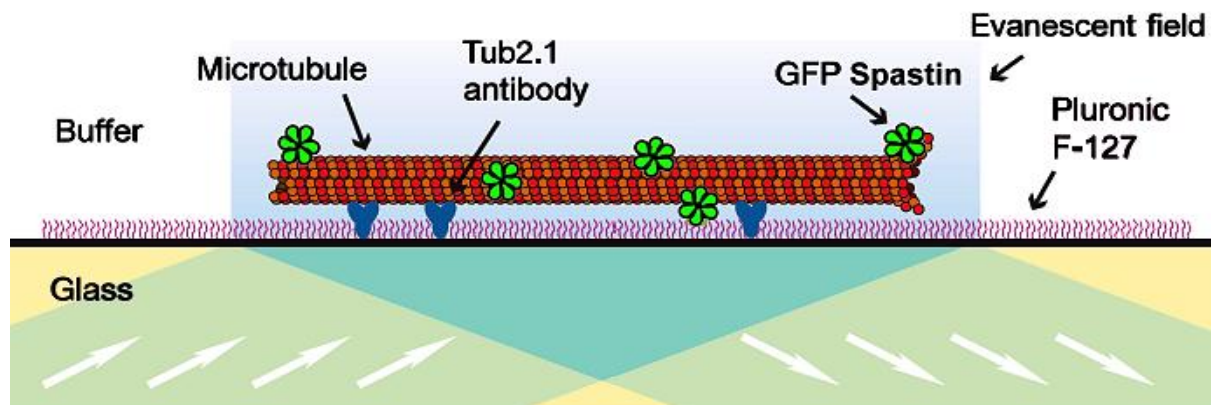


Abbildung III. 17: Flusskammer-Studien.

Dargestellt ist ein mit ALEXA555-markierter Mikrotubulus (rot), der über Anti- β -Tubulin Antikörper (blau) an die Oberfläche immobilisiert ist. Die Anregung durch totale interne Reflexion ermöglicht die Beobachtung von GFP-gekoppelten Einzelmolekülen (grün).

Unter Einsatz geringer Proteinkonzentrationen konnten Spastin-Einzelmoleküle detektiert werden, die nach Bindung an den Mikrotubulus eine Bewegung am Filament zeigten (Abbildung III.18A). Zur Überprüfung der Fortbewegungsart wurden sehr geringe GFP-Spastin Konzentrationen im Bereich zwischen 5 und 10 nM eingesetzt, da unter diesen Bedingungen kein Schneiden der Mikrotubuli-Filamente beobachtet werden konnte. Somit konnte die Bewegung fluoreszenzmarkierter Spastin-Moleküle über einen langen Zeitraum studiert werden. Die Bewegung fluoreszierender Spastin-Moleküle wurde mittels selbst geschriebener Software ermittelt (OpenBox, MatLab). Die MSD-Werte zeigten eine lineare Abhängigkeit von der Zeit, was für diffusive Prozesse charakteristisch ist. Eine interessante Frage bestand darin, ob Spastin eine Präferenz für eines der beiden Mikrotubulus-Enden aufweist. Durch Partikel-Tracking Analysen konnte abgeleitet werden, dass keine derartige Präferenz besteht, so dass Spastin einen ungerichteten Bewegungsvorgang am Mikrotubulus bevorzugt

(Abbildung III.18C). Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurden Einzelmoleküle im GFP-Kanal mit einem Zeitintervall von 229 ms gemessen. Nur sehr wenige Moleküle zeigten längere Diffusionszeiten, die sich über mehrere Sekunden erstreckten. Die meisten Partikel verließen das Filament sehr zügig. Das Histogramm (Abbildung III.18B) zeigt die berechneten Diffusionskoeffizienten der analysierten Einzelmoleküle. Ein exponentieller Fit der Datenpunkte führte zu einem gemittelten Diffusionskoeffizienten für Spastin von $0,0126 \pm 0,0013 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (Datenanalyse, siehe Punkt I.4.2.2).

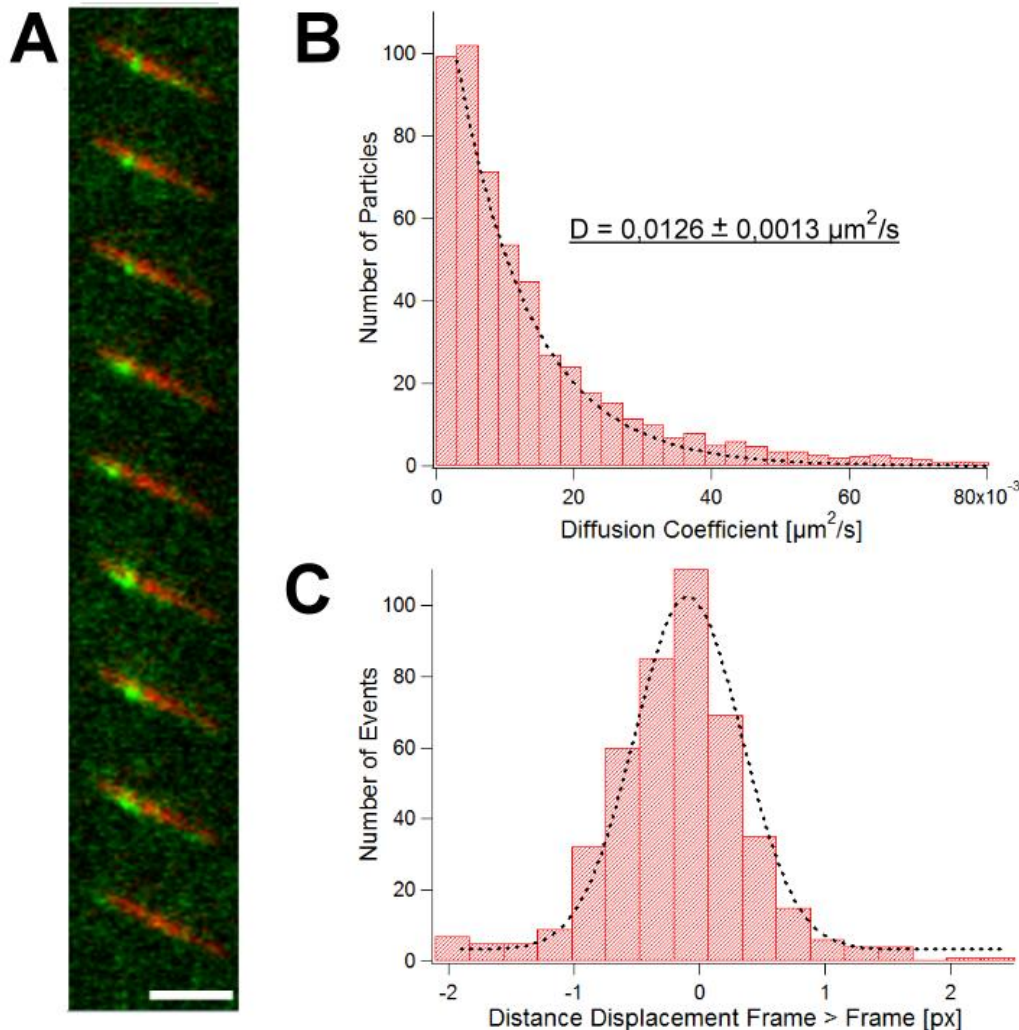


Abbildung III. 18: GFP-Spastin diffundiert am Mikrotubulus entlang.

(A) Bilderfolge eines Videos mit GFP-Spastin (grün). Neun Bilder eines TIRF-Videos mit detektiertem GFP-Spastin wurden über einen Mikrotubulus (rot) gelegt. Das Zeitintervall zwischen zwei Bildern beträgt 1 s. Das Molekül bindet an den Mikrotubulus (Bild 1), diffundiert eindimensional am Filament entlang (Bilder 2–8) und dissoziiert (Bild 9). Maßstab = 5 μm .

(B) Die ermittelten Diffusionskoeffizienten wurden in ein Histogramm importiert. Aus dem exponentiellen Kurven-Fit erhält man einen gemittelten Diffusionskoeffizienten, D , von $0,0126 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $\langle x^2 \rangle = 2 \cdot D \cdot t$.

(C) GFP-Spastin zeigt eine ungerichtete Bewegung entlang des Mikrotubulus, ohne Präferenz für das Plus- oder Minus-Ende.

III.3.5 Konzentrationsabhängigkeit der GFP-Spastin *Severing*-Aktivität

In diesem Abschnitt wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an GFP-Spastin in die Flusskammern pipettiert und die Reaktionen durch 1 mM ATP gestartet. Die Aufnahmen erfolgten mit Hilfe eines TIRF-Mikroskops mit einem Zeitintervall von 10 s. Durch ein integriertes O-Radikalfänger-System und der kurzen Belichtungszeit wurden Ausbleichprozesse reduziert. Unter Einsatz reduzierter Konzentrationen erschienen die GFP-Spastin Moleküle als deutlich sichtbare fluoreszierende Partikel, die spezifisch auf dem Mikrotubulus verteilt waren (Abbildung III.19). Dabei gab es Unterschiede in der Fluoreszenzintensität, was auf diverse Oligomer-Formen hinwies, welche später mittels *Photobleaching*-Experimenten untersucht wurden (Punkt III.3.11). Damit unter Detektion von Einzelmolekülen Brüche registriert werden konnten, wurden für die Einzelmolekülmessungen Mischungen aus GFP-Spastin und unmarkiertem Spastin eingesetzt. Bei Variation der Konzentrationen wurde stets ein molares Verhältnis GFP-Spastin zu unmarkiertem Spastin von 1:2 eingestellt. Bei der Inkubation von Mikrotubuli mit einer finalen Spastin-Konzentration von 150 nM wurde das komplette Mikrotubuli-Netzwerk vor Beendigung des 10-minütigen Films abgebaut. Innerhalb einer Minute nach Start der Reaktion wurden Brüche und Lücken sichtbar (Abbildung III.19B). Dabei war signifikant, dass mehrere Einzelmoleküle an spezifische Stellen gebunden haben, welche im späteren Verlauf Lücken aufwiesen (Abbildung III.19A/B).

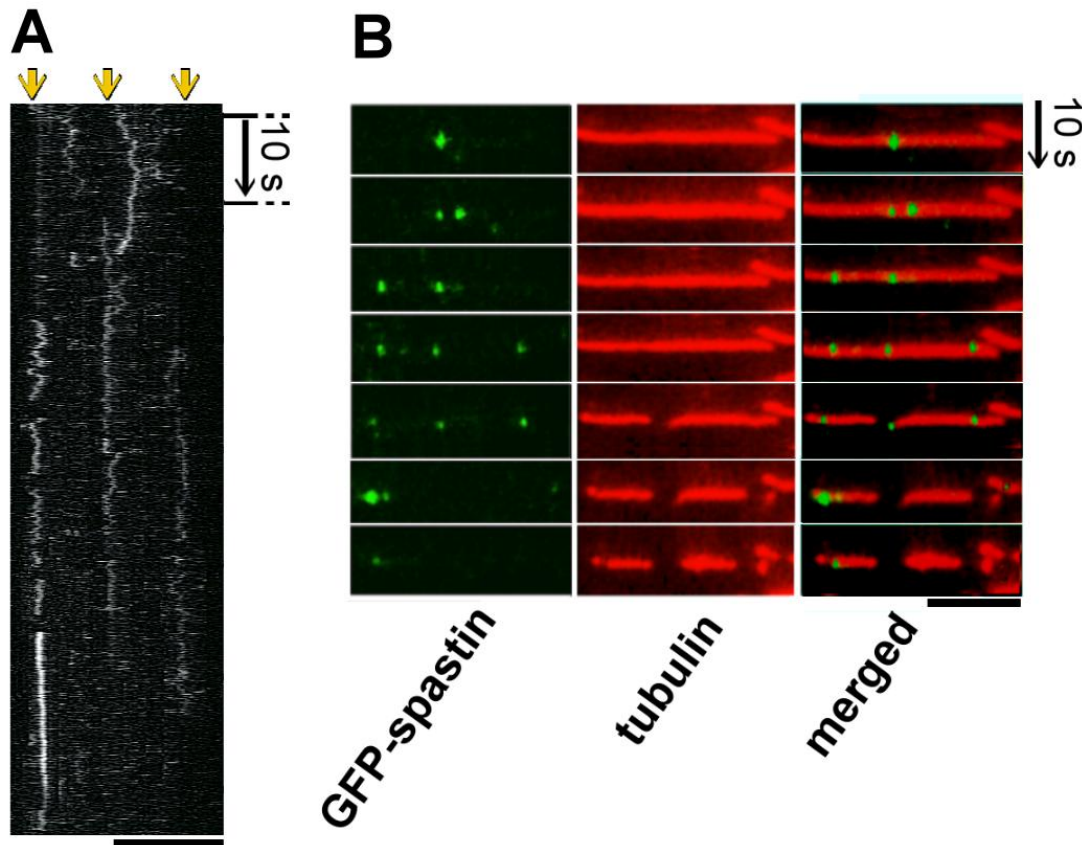


Abbildung III. 19: Lokalisation von GFP-Spastin am Mikrotubulus während des Schneideprozesses.

(A) Der Kymograph zeigt auf dem Mikrotubulus diffundierende GFP-Einzelmoleküle. Es ist zu erkennen, dass Spastin frequenter an spezifische Stellen bindet (gelbe Pfeile). Maßstab = 5 μm .

(B) Der grüne Kanal (linker Abschnitt) zeigt GFP-Spastin, der rote (zentraler Abschnitt) ALEXA555-gekoppelte Mikrotubuli. Der rechte Abschnitt zeigt eine Kombination beider Kanäle. GFP-Spastin bindet mit hoher Frequenz an Stellen, die im späteren Verlauf durch Schnitte oder Knicke gekennzeichnet sind. Maßstab = 5 μm .

Um die Auswirkung der Spastin-Konzentration auf die Schnittrate zu untersuchen, wurden Flusskammer-Messungen mit erhöhten Konzentrationen (0 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 400 nM, 600 nM und 1000 nM) durchgeführt (Abbildung III.20). Die *Severing* Frequenz wurde bestimmt, indem die Schnitte manuell gezählt und die Anzahl an registrierten Schnitten durch die Gesamtdauer des *Severing*-Vorgangs sowie die initiale Länge der analysierten Mikrotubuli dividiert wurde. In Abwesenheit von GFP-Spastin (0 nM) konnte kein *Severing* beobachtet werden. Die berechnete *Severing* Frequenz betrug bei 150 nM Protein $2,2 \cdot 10^{-3}$ Schnitte/ $(\mu\text{m} \cdot \text{s})$ und erreichte im studierten Konzentrationsbereich einen maximalen Wert von $78,9 \cdot 10^{-3}$ Ereignissen/ $(\mu\text{m} \cdot \text{s})$ bei Einsatz von 1000 nM Protein. Mit erhöhter Proteinkonzentration konnte ein sukzessiver Anstieg der *Severing* Frequenz beobachtet werden. Zahlreiche Kontrollexperimente wurden durchgeführt um sicher zu stellen, dass *Severing* ausschließlich durch Spastin hervorgerufen wurde. Unspezifische Abbauprozesse, ausgelöst durch Photoschäden konnten somit ausgeschlossen werden. Im Zuge der Kontrollen konnten sowohl in Abwesenheit von GFP-Spastin als auch in Anwesenheit der hydrolysedefizienten Mutante E442Q keine *Severing*-Ereignisse registriert

werden. Diese Resultate demonstrieren, dass *Severing* spezifisch durch Spastin und nicht durch mögliche Protein-Kontaminationen oder Photoschäden induziert wurde. In Abwesenheit von ATP und Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren Analogons AMPPNP konnten in der *Severing*-Studie keine Schnitte mehr beobachtet werden (Abbildung III.20B). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass aufgereinigtes GFP-Spastin aktiv ist und unter ATP-Hydrolyse Mikrotubuli schneidet. Somit konnten wertvolle Daten auf der Ebene von Einzelmolekülen gesammelt werden.

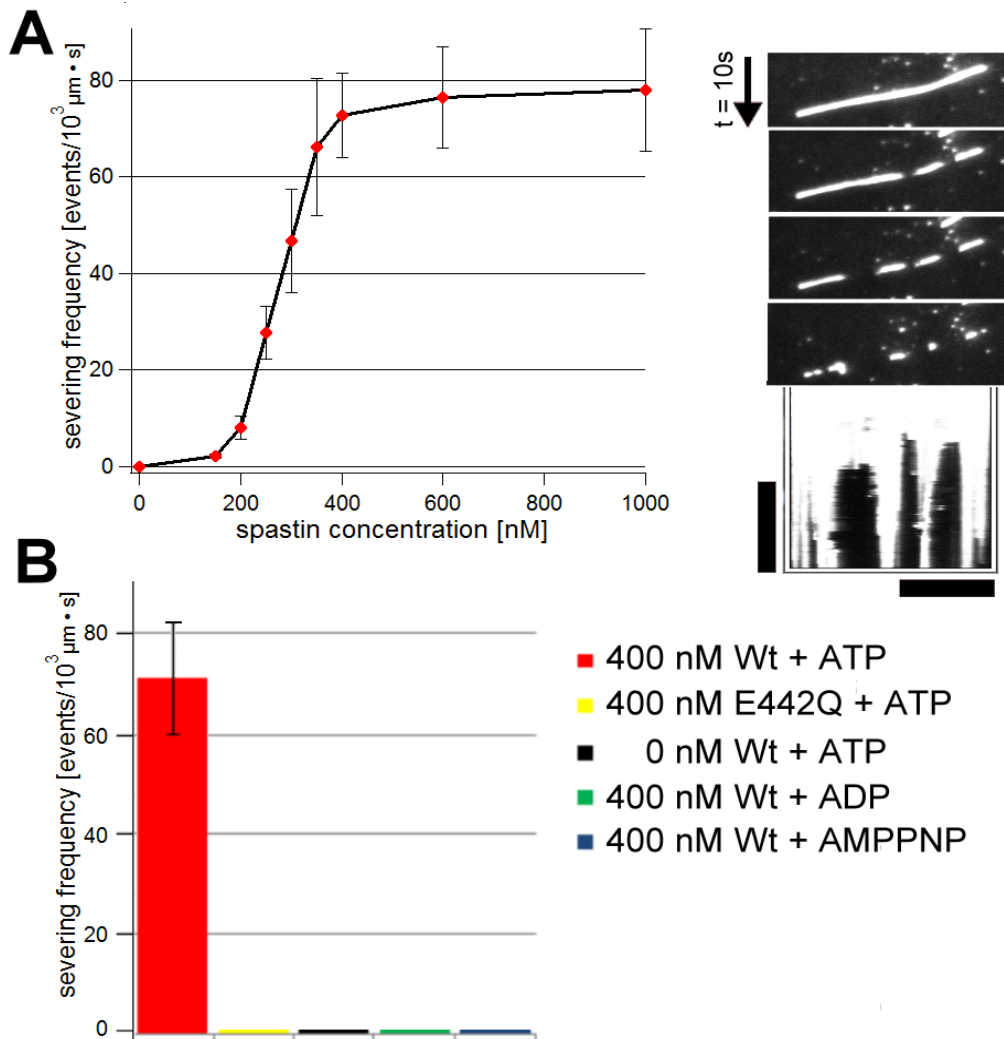


Abbildung III. 20: Quantitative Analyse des Mikrotubuli-Severing Prozesses.

(A) Linke Seite: Berechnung der *Severing* Frequenz von Spastin in Gegenwart von 1 mM ATP. Die Konzentration von Spastin variierte dabei von 0 bis 1000 nM mit den Zwischenschritten 150, 200, 250, 300, 350, 400 und 600 nM. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die vertikalen Balken die Standardabweichung. Rechte Seite: Zeitreihe von ALEXA555-markierten Mikrotubuli mit einer finalen Spastinkonzentration von 400 nM. Die Zeit zwischen zwei Bildern beträgt 10 s. Der dargestellte Mikrotubulus-Kymograph zeigt zahlreiche *Severing*-Ereignisse. Vertikaler Maßstab = 40 s, horizontale Maßstab = 2 μm.

(B) Kontrolleexperimente zeigen, dass *Severing* Spastin-spezifisch und unter Hydrolyse von ATP erfolgt. Analysiert wurde das Verhalten des Wildtyps in Gegenwart von 1 mM ADP (grün) und 1 mM AMPPNP (blau) sowie der Mutante E442Q in Anwesenheit von 1 mM ATP (gelb). Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die vertikalen Balken die Standardabweichungen.

In den durchgeführten Messungen konnte bei keiner getesteten Konzentrationsstufe Depolymerisation von einem der beiden Mikrotubulus-Enden registriert werden. Im Unterschied zu Katanin wurden bei Spastin somit ausschließlich *Severing*-Ereignisse beobachtet. Nachdem gezeigt werden konnte, dass Spastin diffusive Bewegung am Mikrotubulus ausübt, wurde der Fokus auf die Interaktion zwischen Spastin und seinem Substrat gelegt. Dabei sollte die Frage geklärt werden, auf welche Art und Weise die Interaktion zwischen beiden Partnern realisiert wird. Zahlreiche Mikrotubuli-bindende Proteine interagieren über elektrostatische Wechselwirkung mit Filamenten, indem eine positiv geladene Protein-Domäne an eine negativ geladene Tubulin-Region bindet (Lakamper und Meyhofer 2005; Helenius, Brouhard et al. 2006; Zanic, Stear et al. 2009; Ramey, Wang et al. 2011). Bei diesem Segment handelt es sich um eine Abfolge zahlreicher negativ geladener Glutaminsäurereste, auch bekannt als *E-Hook* (Paschal, Obar et al. 1989).

III.3.6 Elektrostatische-Interaktionsstudien

Um den Effekt des negativ geladenen *E-Hooks* von Tubulin auf die Interaktion mit Spastin zu studieren wurden Bindungs- sowie Bündelungsmessungen durchgeführt. Dabei kam die mutierte Spastinversion E442Q zum Einsatz, von der bekannt ist, dass sie zur Bündelung von Mikrotubuli befähigt ist (Salinas, Carazo-Salas et al. 2005). Als Substrat für Spastin wurde unbehandeltes, natives Tubulin mit Subtilisin verdautem Tubulin (bei dem der *E-Hook* fehlt) verglichen. Nach erfolgreichem Verdau konnte auf dem SDS-Gel eine Größenverschiebung der mit Subtilisin verdauten Tubulineinheiten gegenüber unbehandeltem Tubulin erkannt werden (Abbildung III.21B). In TIRF-Experimenten war im Fall von nativem Tubulin eine starke Bündelung der Mikrotubuli-Filamente zu erkennen, die spezifisch auf GFP-Spastin zurückgeführt werden konnte. Wurden dagegen verdaute Mikrotubuli mit GFP-Spastin inkubiert, so hat das Protein die Fähigkeit zur Bindung an sein Substrat verloren (Abbildung III.21C). Um die Vorgänge genauer analysieren zu können, wurden die für TIRF-Messungen hergestellten Proben mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. In Gegenwart unbehandelter Mikrotubuli war eine starke Dekoration der Filamente mit Spastin-Ringstrukturen zu erkennen. Interessanterweise scheinen die Strukturen als *Cross-Linker* zu fungieren, indem sie mehrere Mikrotubuli miteinander verknüpfen können (Abbildung V.4). Daraus resultierte der beobachtete Bündelungseffekt. Wurden dagegen *E-Hook* lose Mikrotubuli nach Subtilisin-Verdau eingesetzt, so lagen die Ringstrukturen neben den Mikrotubuli und die Bündelung der Filamente blieb aus (Abbildung III.21C). Spastin bevorzugt somit die Bindung an Bereiche, die von nativem Tubulin dominiert werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass der negativ geladene *E-Hook* für die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli essentiell ist.

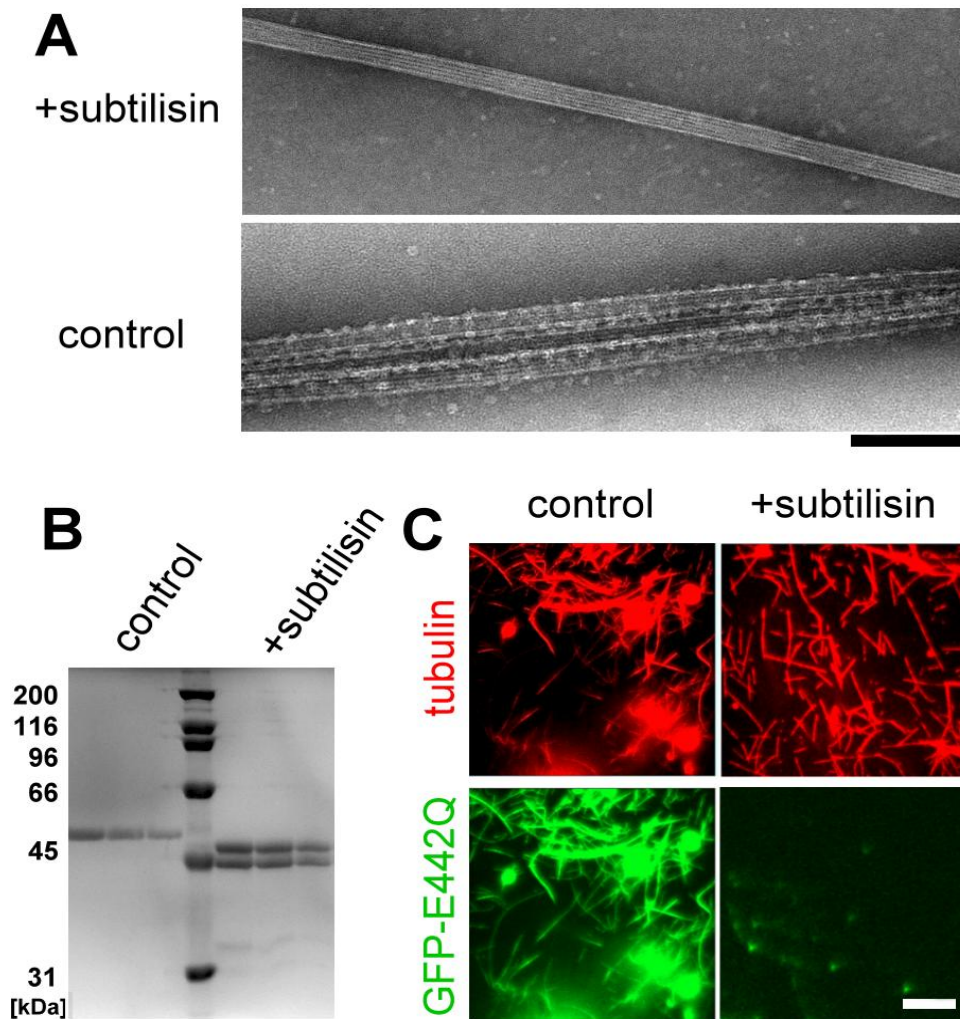


Abbildung III. 21: Effekt des E-Hooks auf die Bindung von Spastin an Mikrotubuli.

(A) Elektronenmikroskopische Bilder zeigen die Dekoration unbehandelter Mikrotubuli (Kontrolle) mit Spastin-Ringstrukturen. Nach dem Einsatz von Subtilisin kann aufgrund einer starken Abnahme der Spastin-Bindfähigkeit keine Dekoration mehr beobachtet werden. Maßstab = 100 nm.

(B) Native- (Kontrolle) und mit Subtilisin-behandelte MT wurden auf einem SDS-Gel analysiert. Aufgrund der Abkopplung des C-terminalen Abschnitts tritt im Fall von verdauten Mikrotubuli eine Verschiebung zu einem geringeren Molekulargewicht auf. Dies ist ein Indiz für erfolgreichen Verdau. Natives Tubulin hat ein Molekulargewicht von 55-kDa.

(C) TIRF-Bilder von GFP-Spastin Molekülen, die an unbehandelte/verdaute Mikrotubuli gebunden sind. Im Kontrollansatz mit nativem Tubulin bindet GFP-Spastin mit hoher Effizienz an ALEXA555-markierte Mikrotubuli. Wird der E-Hook entfernt, so binden nur noch vereinzelte Spastin-Moleküle an Filamente. Maßstab = 5 μ m.

III.3.7 Einfluss von Ionen auf den Bindevorgang

Um den Interaktionsprozess weiter analysieren zu können, wurden Bindeanalysen mit Spastin in Puffern durchgeführt, die unterschiedlich hohe Salzkonzentrationen aufwiesen. Mit Hilfe von TIRF-Messungen und der anschließenden Analyse erstellter Kymographen konnte gezeigt werden, dass Spastin/MT-Bindung durch hohe Salzkonzentrationen beeinträchtigt wird (Abbildung III.22). Bei einer Salzkonzentration von 80 mM NaCl war die ermittelte Bindefrequenz maximal und lag bei $24,21 \pm 3,02$ Ereignissen/(10 μ m ·

60 s), während in Gegenwart von 300 mM NaCl nur noch marginale Bindung stattfand ($1,61 \pm 0,82$ Ereignisse/($10 \mu\text{m} \cdot 60 \text{s}$)). Neben der Bindefrequenz wurde auch die Bindedauer der Partikel am Mikrotubulus studiert. Hinsichtlich dieses Parameters hatte eine erhöhte Salzkonzentration keinen derartig drastischen Einfluss, jedoch war auch hier eine Tendenz zu geringeren Interaktionsdauern bei höheren NaCl-Konzentrationen zu erkennen. Die maximale Interaktionsdauer konnte bei 80 mM NaCl registriert werden, der minimale Wert lag bei $4,19 \pm 0,12 \text{s}$ unter Einfluss von 300 mM NaCl (siehe Abbildung III.22B).

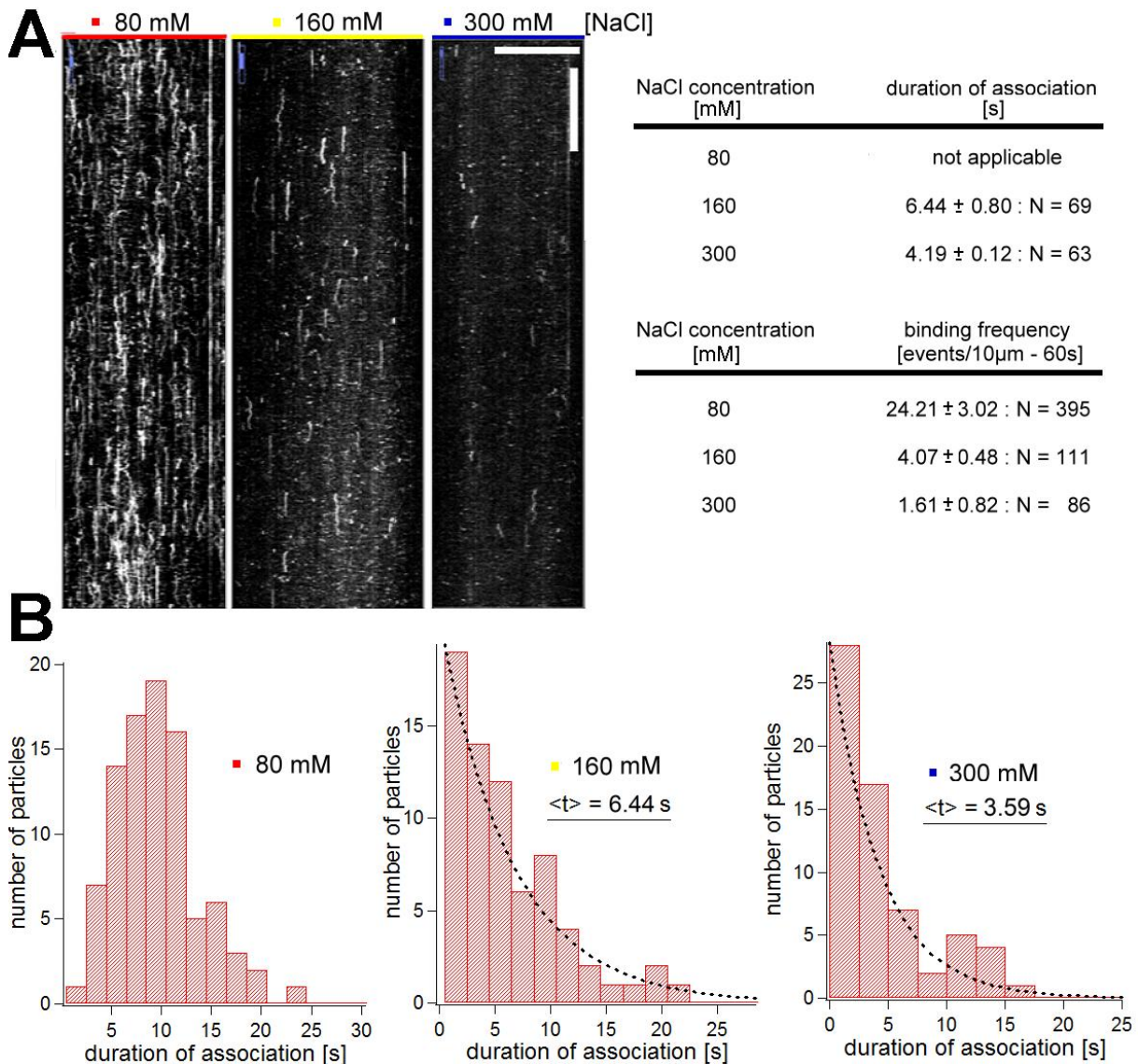


Abbildung III. 22: Bindefrequenz und Interaktionsdauer hängen von der Ionenstärke ab.

(A) Linke Seite: Kymographen zeigen den Einfluss erhöhter NaCl-Konzentrationen auf die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli. Die Konzentration von GFP-Spastin betrug 50 nM. Die horizontale Achse entspricht der Distanz, die vertikale Achse der Zeit. Horizontaler Maßstab = $5 \mu\text{m}$, vertikaler Maßstab = 30 s. Rechte Seite: Tabelle mit den errechneten Werten für Bindefrequenz und Interaktionsdauer unter den angegebenen Salzbedingungen.

(B) Histogramme zeigen die Verteilung der analysierten Partikel nach ihrer Bindedauer. Aus dem exponentiellen Fit konnte die durchschnittliche Dauer, $\langle t \rangle$, der Partikelinteraktion ermittelt werden.

III.3.8 Einfluss geladener Aminosäuren auf die Mikrotubuli-Bindung

Durch die bisherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass Spastin über elektrostatische Interaktionen an Mikrotubuli bindet. *Domain-Mapping* Experimente brachten hervor, dass die MTBD-Domäne für den Bindeprozess essentiell ist (White, Evans et al. 2007). Mit der Erkenntnis, dass Ladungen beim Bindevorgang eine wichtige Rolle spielen, wurde die Sequenz der MTBD-Domäne genauer studiert und auf eine mögliche Anhäufung positiv geladener Aminosäuren hin analysiert (Abbildung III.23A). Dabei ist eine Kombination aus drei Lysinen sehr auffällig. Um die Bedeutung dieser basischen Triade für den MT-Interaktionsprozess zu beleuchten, wurden TIRF- und Cosedimentationsmessungen mit der MTBD-Domäne durchgeführt. Neben Wildtyp-MTBD (MTBD-K³¹⁰KK) kam auch eine Version zum Einsatz, in der die Lysinreste durch Glutaminreste (MTBD-Q³¹⁰QQ) ersetzt wurden, wodurch der basische Charakter eliminiert wurde. Um eine Visualisierung der beiden Konstrukte zu ermöglichen, wurden diese an das Fluoreszenzprotein GFP gekoppelt. Somit konnte mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops die Auswirkung der Mutationen auf den Bindecharakter studiert werden. In Gegenwart von 100 nM Wildtyp-MTBD ist eine effiziente Bindung an Mikrotubuli zu erkennen, welche im Fall der mutierten Version (MTBD-Q³¹⁰QQ) komplett verloren gegangen ist (Abbildung III.23A). Cosedimentationsstudien bestätigten dieses Resultat (Abbildung III.23B). Während MTBD-K³¹⁰KK (2 μ M) mit Mikrotubuli (2 μ M) cosedimentieren kann, ist dies bei der mutierten Version nicht möglich. Das eingesetzte Protein kann nur im Überstand detektiert werden, so dass keine Bindung an Mikrotubuli stattgefunden hat. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass für die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli eine Lysin-Triade in der MTBD-Domäne essentiell ist. Durch die positiven Ladungen der Lysinreste kann wahrscheinlich eine sehr effiziente Wechselwirkung mit dem negativ geladenen Tubulin C-Terminus (*E-Hook*) stattfinden.

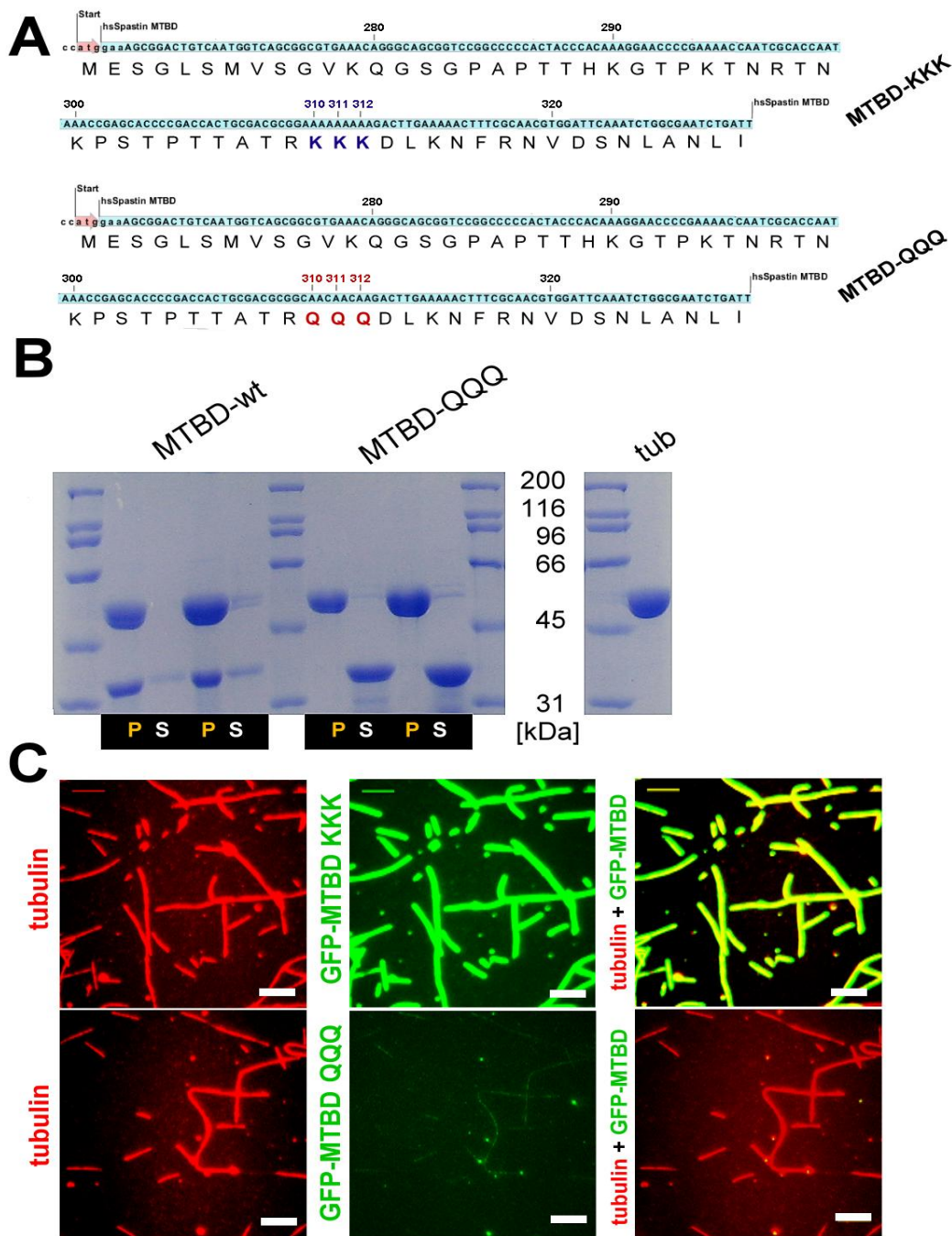


Abbildung III. 23: Eine Lysin-Triade ist für die Interaktion mit Mikrotubuli entscheidend.

(A) Sequenz der MTBD-Domäne. Auffällig ist eine Region, in der es zu einer Anhäufung mehrerer Lysinreste kommt (blau dargestellt). Um den Einfluss dieser basischen Triade auf den Interaktionsprozess analysieren zu können, wurde eine Mutante hergestellt (MTBD-Q³¹⁰QQ), in der die Lysinreste durch Glutaminreste ersetzt wurden (rot dargestellt).

(B) Cosedimentationsmessungen mit MTBD-Wt und der mutierten Version. MTBD-Wt cosedimentiert mit Mikrotubuli, während MTBD-Q³¹⁰QQ nur im Überstand erscheint. P = Pellet, S = Überstand. GFP-MTBD weist ein Molekulargewicht von 33,3-kDa auf.

(C) TIRF-Messungen mit den beiden MTBD-Versionen. Der rote Kanal zeigt mit ALEXA555-markierte Mikrotubuli, der grüne Kanal GFP-MTBD Fusionsprotein. Nur der Wildtyp dekoriert mit hoher Effizienz Mikrotubuli, während bei MTBD-Q³¹⁰QQ nur wenige Moleküle an Mikrotubuli binden. Maßstab = 5 µm.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass Spastin über positive Ladungen in der MTBD-Domäne mit dem negativ geladenen C-Terminus von Tubulin interagiert und nach Bindung diffusive Bewegung am Filament zeigt. Eine weitere wichtige Frage besteht darin, ob Spastin beim *Severing*-Prozess spezifische Bereiche auf dem Mikrotubulus erkennt. Es ist gut vorstellbar, dass das Protein defekte Stellen identifizieren und daraus resultierend hochfrequentiert an solche Segmente binden kann, um den Schneidevorgang forcieren zu können. TIRF-Messungen gaben erste Hinweise darauf, dass Spastin gehäuft an Regionen bindet, an denen im weiteren Verlauf Schnitte und Brüche entstehen (siehe Abbildung III.19).

III.3.9 Spastin erkennt Defekte im Mikrotubulus

Um herauszufinden, ob Spastin spezifische Stellen am Mikrotubulus bevorzugt bindet, wurden GMPCPP-Elemente in das Filament eingebaut. Zu diesem Zweck wurden segmentierte-Mikrotubuli mit hellen GMPCPP-Nukleationskeimen und schwach markiertem GDP-Tubulin eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass 96% der erzeugten GMPCPP-Mikrotubuli bei der *in vitro* Polymerisation aus 14 Protofilamenten bestehen (Hyman, Chretien et al. 1995). Zudem führt die Polymerisation von Mikrotubuli unter Einfluss von Taxol zum Erhalt von 12 bis 13 Protofilamenten (Arnal und Wade 1995). Deshalb enthalten die hergestellten Segment-Mikrotubuli einen Protofilament-Übergang an den Grenzen zwischen GMPCPP- und GDP-Tubulin. Durch diesen Ansatz sollten auf kontrollierte Art und Weise Defekte in das Mikrotubulus-Filament eingebaut werden. Die segmentierten Mikrotubuli wurden mit geringen Konzentrationen an GFP-Spastin versetzt und mittels TIRF-Messungen analysiert. Experimente zeigten, dass GFP-Spastin bevorzugt an Übergängen bindet und dort oftmals *Cluster*-Bildung hervorruft (Abbildung III.24A/B). Spastin-Moleküle blieben in dieser Region für längere Zeit gebunden, bis *Severing*-Ereignisse auftraten. Um Brüche detektieren zu können, wurde für das Experiment eine finale Spastin-Konzentration von 400 nM eingesetzt. Für die quantitative Analyse wurden die *Severing*-Ereignisse direkt an den Grenzen bestimmt und mit der Anzahl an Schnitten am restlichen Mikrotubulus verglichen. Die Analyse ergab, dass die Schnitt-Rate an den GTP/GDP-Tubulin Grenzen zumeist um den Faktor ≈ 3 höher lag. Für das Experiment wurden 87 Schnitte registriert und den entsprechenden Abschnitten zugeordnet. 72% der *Severing*-Ereignisse konnten dabei an der Grenze zwischen GMPCPP- und GDP-Tubulin registriert werden, lediglich 28% der Schnitte erfolgten im GDP-Restfilament (Abbildung III.24C). Dies ist ein Indikator dafür, dass Spastin bevorzugt an Bereiche bindet, in denen ein Protofilament-Übergang auftritt.

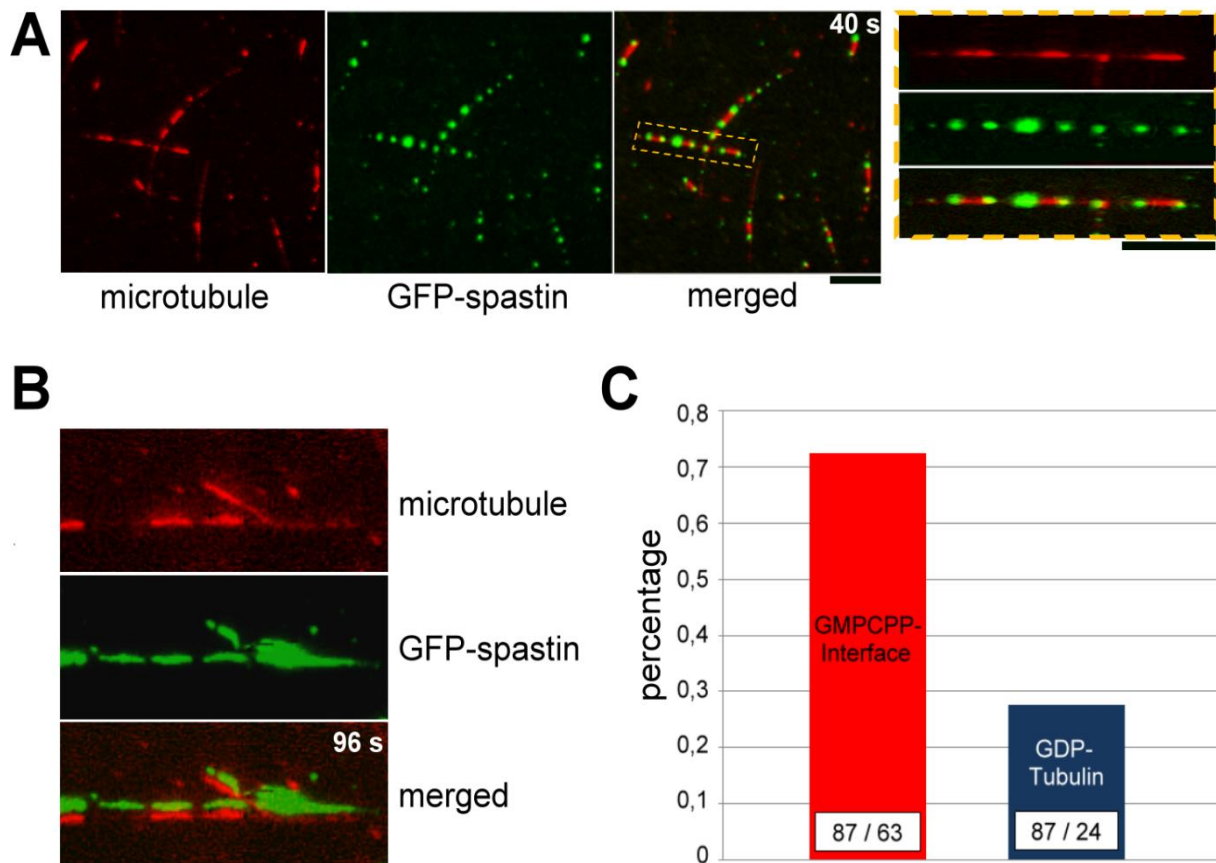


Abbildung III. 24: GFP-Spastin schneidet bevorzugt an Grenzen zwischen GTP- und GDP-Tubulin.

(A) Der rote Kanal zeigt segmentierte Mikrotubuli vor dem Auftreten von Schnitt-Ereignissen. Der GFP-Spastin Ausschnitt ist eine Z-Projektion von gebundenen GFP-Spastin Partikeln (400 nM) innerhalb von 30 s (grün). Spastin lagert sich bevorzugt an GTP/GDP-Grenzen an, wodurch es in diesen Regionen zu *Cluster*-Bildungen kommt. Der in gelber Farbe hervorgehobene Bereich wurde zusätzlich vergrößert dargestellt. Maßstab = 5 μm , Maßstab (Vergrößerung) = 2,5 μm .

(B) Repräsentatives Beispiel: gezeigt ist ein Mikrotubulus mit 4 GMPCPP-Nukleationskeimen (rot). Es ist zu erkennen, dass Schnitte primär an den Grenzen zwischen GTP/GDP-Tubulin entstehen. Die Kanäle sind bei der Verbindung bewusst leicht versetzt dargestellt, um eine bessere Visualisierung zu ermöglichen.

(C) Quantitative Analyse von Schnitt-Ereignissen an den GMPCPP/GDP-Tubulin Grenzen. Die Y-Achse stellt den prozentuellen Anteil an registrierten *Severing*-Ereignissen im GMPCPP-Übergangsbereich oder GDP-Tubulin Segment dar. Die manuell gezählten Ereignisse im jeweiligen Abschnitt wurden durch die Gesamtanzahl an registrierten Schnitten dividiert. Das in die Balken eingebundene Rechteck gibt die Gesamtanzahl an gezählten Mikrotubuli sowie die im entsprechenden Segment gezählten Schnitte wieder.

Eine weitere interessante Frage bestand darin, welche Morphologie Mikrotubuli zeigen, die durch Spastin geschnitten wurden. Für den Fall, dass spezifische Stellen stark frequentiert geschnitten würden, könnte man erwarten, dass kleine Bruchstücke entstehen, die keine großflächigen Zerstörungsmuster zeigen. Da das Protein häufig spezifische Stellen angreift, erwartet man zudem gerade Enden, da das Filament vom Enzym wie mit einem Messer gerade von oben nach unten geteilt würde. Würde Spastin dagegen unspezifische Regionen für den *Severing*-Prozess bevorzugen, so erwartet man zahlreiche Lücken im Mikrotubulus und stärker versetzte Enden.

III.3.10 Morphologie geschnittener Mikrotubuli

In einem weiteren Experiment wurde die Morphologie der Mikrotubuli-Enden untersucht, die durch Schnitte erzeugt wurden. Die Analyse fand auf der Stufe der Elektronenmikroskopie statt. Mikrotubuli wurden dabei entweder mit ATP und Spastin oder mit Protein in Kombination mit AMPPNP eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (Mikrotubuli ohne Enzym) mikroskopisch untersucht. Die Proben wurden auf ein Karbongitter pipettiert und durch *Negative-Staining* fixiert. Die Auswertung ergab, dass Mikrotubuli im ATP-Ansatz eine 3-fach höhere Anzahl an Enden pro Längeneinheit aufzeigten als die beiden analysierten Kontrollansätze. Dieses Ergebnis demonstriert, dass das eingesetzte Spastin aktiv war und in Gegenwart von ATP Mikrotubuli in kleine Fragmente zerlegen konnte. Interessanterweise gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Morphologie der untersuchten Mikrotubuli-Enden. Unter allen getesteten Bedingungen waren die Enden stumpf, lediglich in einigen Fällen ragten einzelne Protofilamente heraus. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem *Severing*-Muster von Katanin (siehe Punkt IV.3.7), so treten keine signifikanten Unterschiede auf. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Spastin und Katanin über ähnliche Mechanismen Schnitte am Mikrotubulus herbeiführen können. Das frequentierte Auftreten von Bruchstücken mit geraden Enden ist ein weiterer Indikator dafür, dass Spastin spezifische Bereiche am Mikrotubulus erkennt und dort *Severing* ermöglicht.

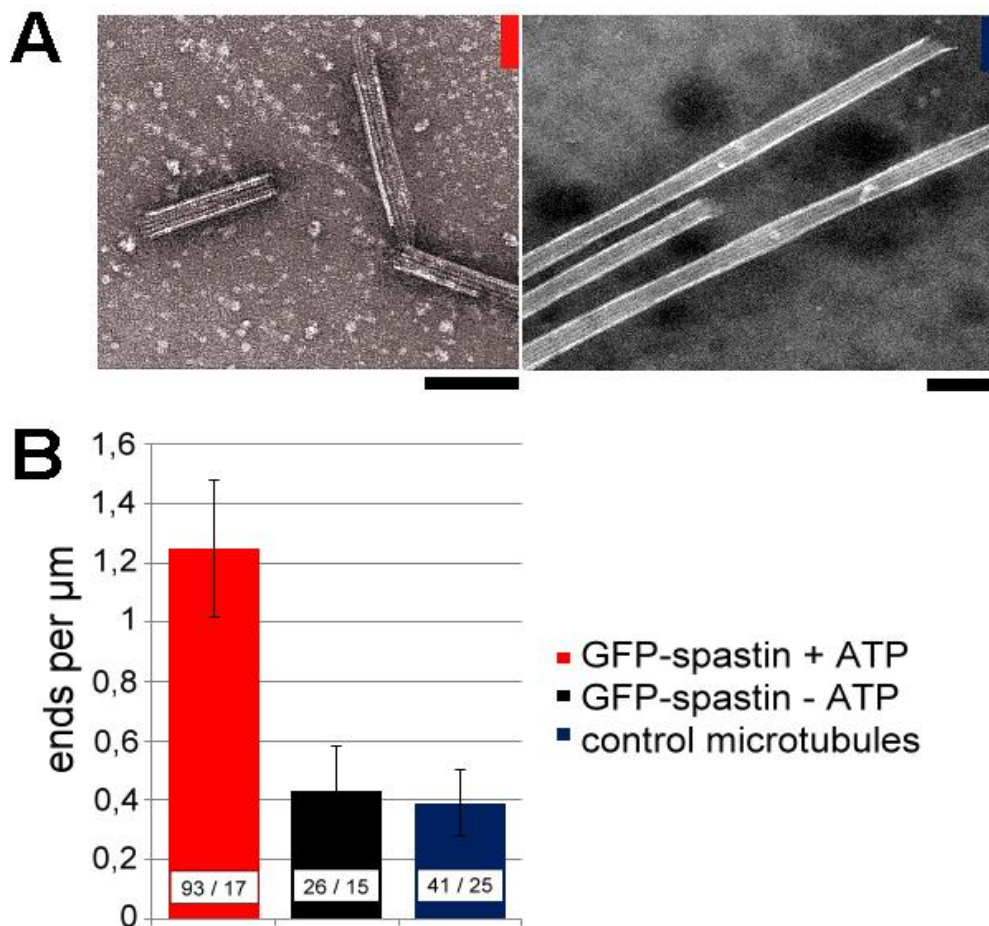


Abbildung III. 25: Spastin erzeugt stumpfe Enden an Mikrotubuli.

(A) Das EM-Bild zeigt Enden von negativ gefärbten Mikrotubuli nach Inkubation mit: (rot) 150 nM Spastin in Kombination mit 2 mM ATP, (blau) kein Spastin (Kontrolle).

(B) Quantifizierung der Mikrotubuli-Enden pro Längeneinheit. Vergleicht man das Ergebnis des Ansatzes Spastin + 2 mM ATP mit dem von Spastin ohne ATP oder der Negativkontrolle (nur Mikrotubuli), so ist die Anzahl an Enden um den Faktor von ≈ 3 erhöht. Nummern in den Balken geben die Anzahl an ausgewerteten Mikrotubuli sowie die Anzahl an studierten Feldern an. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar, vertikale Linien sind die zugehörigen Fehlerindikatoren. Maßstab = 25 nm.

III.3.11 Nukleotid-Abhängigkeit der Bindung, Bewegung und Hexamerisierung von Spastin

Es wurde bereits gezeigt, dass Bindung und Hydrolyse von ATP für Hexamerisierung und *Severing*-Aktivität von Spastin essentiell sind. Um die Bindung, Diffusion und Oligomerisierung näher untersuchen zu können, wurde GFP-Spastin in unterschiedlichen Nukleotidzuständen (ATP, ATP- γ S und AMPPNP) analysiert. Zudem wurden in Gegenwart der oben genannten Nukleotide *Photobleaching*-Studien durchgeführt, um eine Aussage über bevorzugte Oligomerstrukturen machen zu können. Um Bindung und Diffusion genauer analysieren zu können, wurden Kymographen von Mikrotubuli erstellt und Bindungsorte sowie Interaktionsdauern von Spastin-Molekülen studiert. In Anwesenheit von ATP dissoziierte GFP-Spastin nach Bindung sehr schnell vom Mikrotubulus (Abbildung

III.26A). Nur sehr wenige Moleküle zeigten längere Diffusionszeiten, die sich über viele Sekunden erstreckten. Die meisten Partikel verließen das Filament sehr zügig. In Anwesenheit von ATP konnte eine Interaktionszeit von 10,07 s bestimmt werden. In Gegenwart von AMPPNP zeigte GFP-Spastin eine sehr starke Bindung und nur vereinzelt Diffusionsbewegungen. Die meisten Moleküle waren statisch und verharrten für die gesamte Aufnahmezeit am Mikrotubulus, so dass die gemittelte Bindedauer sehr ausgeprägt war und bei 253,69 s lag. Dieser Wert stellt eine Untergrenze dar, weil die Aufnahme nach 300 s beendet wurde. Da AMPPNP als ATP-Analogon nicht hydrolysiert werden kann, erfolgten unter Einfluss dieses Nukleotids erwartungsgemäß keine *Severing*-Ereignisse. In Gegenwart von ATP- γ S trat analog zu ATP Diffusion auf und die analysierte Bindedauer nimmt mit 55,68 s eine Position zwischen der von ATP und AMPPNP ein (siehe Tabelle in Abbildung III.26).

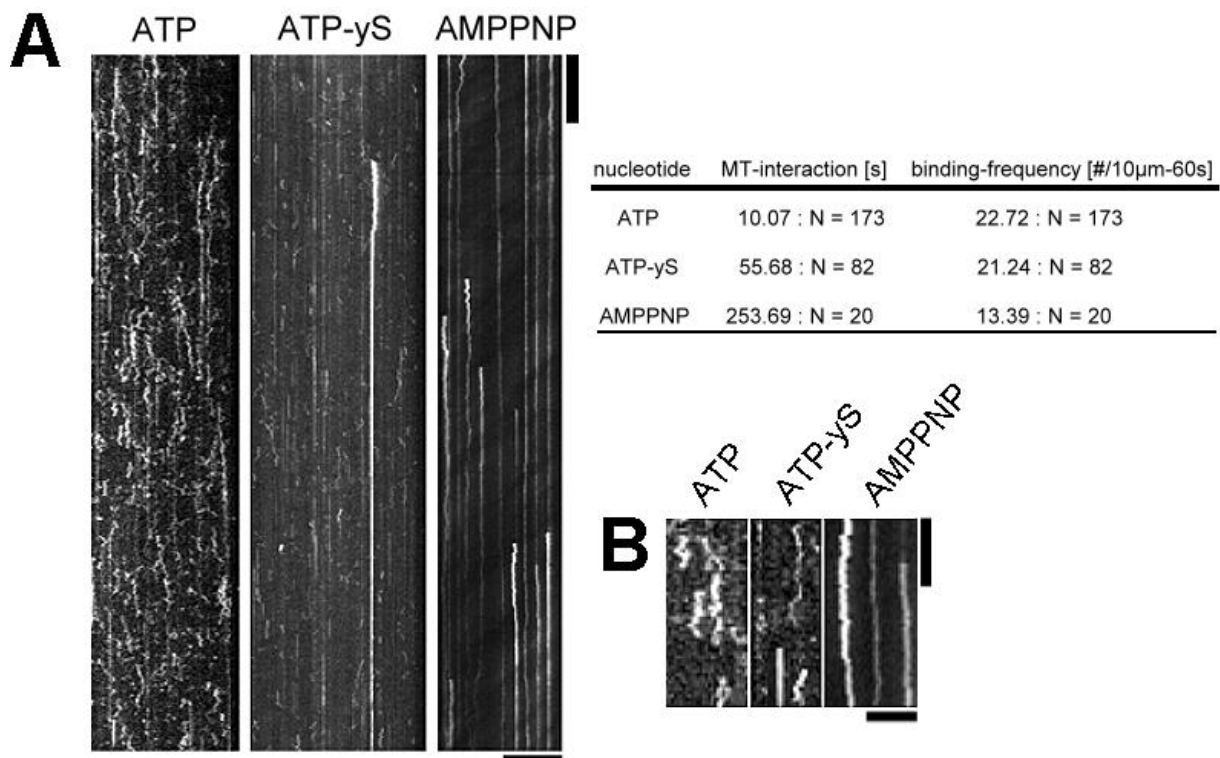


Abbildung III. 26: Die Dynamik von GFP-Spastin hängt vom Nukleotid-Status ab.

(A) Kymographen von 50 nM Spastin in Gegenwart von 1 mM ATP, 1 mM AMPPNP und 1 mM ATP- γ S. Vertikaler Maßstab = 30 s, horizontaler Maßstab = 5 μ m. Die Tabelle zeigt die errechneten Werte für Bindefrequenz sowie Interaktionsdauer unter den angegebenen Nukleotidbedingungen.

(B) Ausschnitte aus den Kymographen zeigen Diffusion von GFP-Spastin Einzelmolekülen entlang Taxol stabilisierter Mikrotubuli (1 mM ATP / 1 mM ATP- γ S / 1 mM AMPPNP). Vertikaler Maßstab = 10 s, horizontaler Maßstab = 1 μ m.

Um den Einfluss von Nukleotiden auf die Oligomerisierung von GFP-Spastin studieren zu können, wurden *Photobleaching*-Experimente durchgeführt. In Gegenwart von 2 mM ATP sind klare Ausbleichstufen zu erkennen, die manuell gezählt werden konnten (Abbildung III.27A). Abbildung III.27B zeigt Histogramme, in denen die analysierten Einzelmoleküle den diversen Ausbleichstufen

zugeordnet wurden. *Photobleaching* wurde zudem in Anwesenheit von AMPPNP und ATP- γ S durchgeführt. Auch unter Einfluss von ATP- γ S konnten eindeutige Schritte beobachtet werden. Unter Einsatz von AMPPNP war es sehr schwierig, alle Ausbleichstufen registrieren zu können, da wesentlich mehr GFP-Moleküle aneinander gekoppelt waren. In diesem Fall bestand die Problematik häufig darin, dass mehrere GFP-Komponenten gleichzeitig ausgebleicht sind. Um trotzdem aussagekräftige Daten zu erhalten wurde die letzte GFP-Ausbleichstufe herangezogen und nach oben skaliert, bis das Fluoreszenzmaximum erreicht wurde. Die Analyse der Histogramme ergab, dass in Anwesenheit von ATP Monomere, hinsichtlich ATP- γ S eine Kombination aus Dimeren/Tetrameren und in Gegenwart von AMPPNP Hexamere die dominanten Oligomer-Formen widerspiegeln.

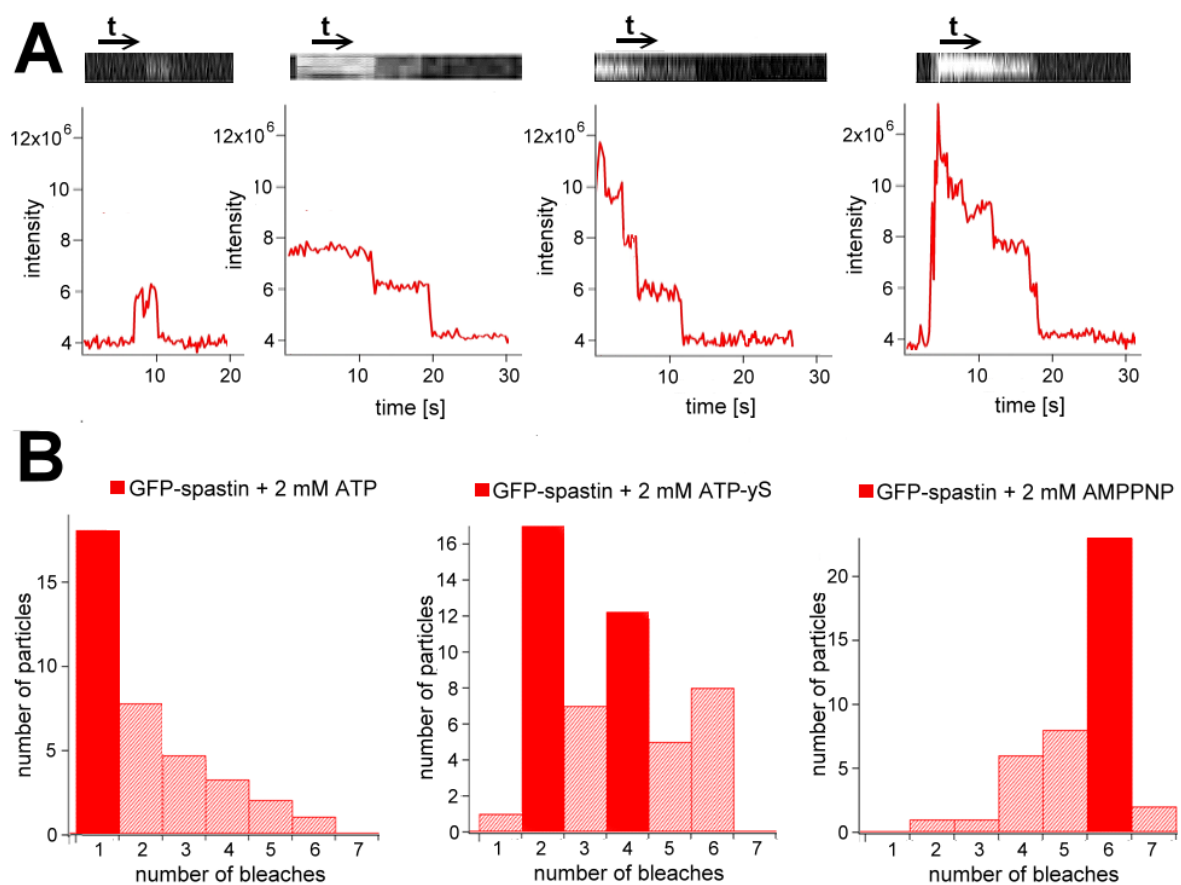


Abbildung III. 27: *Photobleaching* und Analyse der Fluoreszenzintensitäten von GFP-Spastin.

(A) Beispiele für Einstufen-*Bleaching* in Anwesenheit von 2 mM ATP, Zwei- und Vierstufen-*Bleaching* unter 2 mM ATP- γ S und Sechsstufen-*Bleaching* in Gegenwart von 2 mM AMPPNP. Über den Spektren sind die entsprechenden Kymographen der untersuchten Mikrotubuli dargestellt.

(B) Verteilung der Ausbleichereignisse pro Spastin-Komplex in Anwesenheit von 2 mM ATP, 2 mM ATP- γ S und 2 mM AMPPNP. Die dominante Anzahl an ermittelten Ausbleichereignissen entspricht 1/Komplex für ATP, 2 und 4/Komplex für ATP- γ S und 6/Komplex für AMPPNP. Die dunkelroten Balken heben die dominanten Spezies hervor.

Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass diverse Zwischenstufen bei der Oligomerisierung von Spastin existieren. In Anwesenheit des langsam hydrolysierbaren ATP-Analogons ATP- γ S konnten zwei dominante Strukturen detektiert werden. Analytische Ultrazentrifugationsläufe mit Spastin zeigten bereits, dass unter Einfluss von ATP- γ S Zwischenstufen entstehen können (siehe Punkt III.2.5). Das im Zuge der *Photobleaching*-Studien frequentierte Auftreten von Dimeren und Tetrameren ist ein Indiz dafür, dass Zwischenstufen bei der Bildung von Spastin-Ringstrukturen eine große Rolle spielen könnten.

III.3.12 Detektion möglicher Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess von Spastin

Um herauszufinden, ob Spastin tatsächlich eine bevorzugte Zwischenstufe auf dem Weg zum aktiven Hexamer bildet, wurden *Cross-Linking* Experimente durchgeführt. In Kombination dazu erfolgten Strukturanalysen mittels TEM, um die aus den *Cross-Linking* Versuchen erhaltenen Daten auf optischer Ebene überprüfen zu können. In *Cross-Linking* Experimenten wurde unmarkiertes Spastin eingesetzt, um eine mögliche unspezifische Interaktion zwischen GFP-Komponenten ausschließen zu können. Es wurden bei einer konstanten EDAC/NHS Konzentration von 20 μ M steigende Mengen an Spastin eingesetzt. Die Inkubation sehr geringer Mengen an Spastin (25–100 nM) mit EDAC zeigt auf dem SDS-Gel eine Bande, welche einem Monomer entspricht ($M_w \approx 45$ -kDa). Im Fall höherer Proteinkonzentrationen im Bereich von 150 bis 200 nM tritt eine zusätzliche Bande in Erscheinung, die ein Molekulargewicht von 90-kDa aufweist. Dies ist ein Indikator für die Ausbildung einer stabilen Dimer-Population. Wird die Proteinkonzentration weiter erhöht, so ist eine starke Abnahme der Bandenintensität im Monomer- und Dimer-Bereich zu beobachten, während gleichzeitig eine dominante Spezies im hochmolekularen Bereich erscheint. Aufgrund des hohen Molekulargewichts von > 200 -kDa konnte die Größe dieser Population durch Gel-Analyseprogramme nicht genau ermittelt werden. Um trotzdem verlässliche Daten zu erhalten, wurde die Probe mittels EM strukturell untersucht. Auf den untersuchten elektronenmikroskopischen Bildern sind zahlreiche homogene Ringstrukturen mit einer zentralen Pore zu erkennen, die sich nach dem Partikel-*Averaging* als Hexamere herausstellten. Die Analyse der weiteren Ansätze mittels TEM konnten die Daten aus den *Cross-Linking* Experimenten bestätigen. So ist auf den EM-Bildern mit sehr geringer Spastin-Konzentration hauptsächlich eine Monomer-Spezies, im Fall höherer Konzentrationen dagegen eine Dimer-Population dominant. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Resultate, dass Spastin in der Lage ist, auf dem Weg vom Monomer zum aktiven Hexamer eine Zwischenstufe in Form eines Dimers auszubilden.

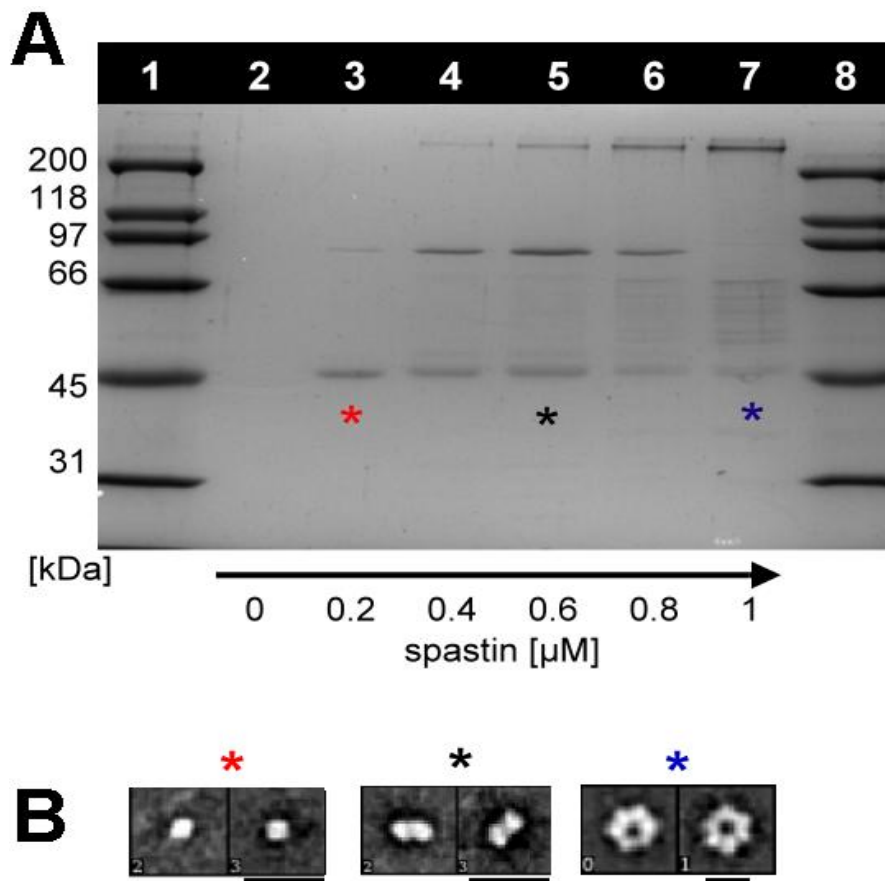


Abbildung III. 28: Struktur und Oligomerisierung von Spastin.

(A) SDS-Gel mit quervernetzten Spastin-Untereinheiten bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (von links nach rechts ansteigend). Das Gel zeigt mit steigenden Mengen an Spastin einen Übergang vom Monomer über ein Dimer zum aktiven Hexamer. Spuren 1/8: Standard, Spur 2: kein Spastin, Spur 3: 0,2 μM Spastin, Spur 4: 0,4 μM Spastin, Spur 5: 0,6 μM Spastin, Spur 6: 0,8 μM Spastin, Spur 7: 1 μM Spastin.

(B) Drei Ansätze mit 0,2, 0,6 und 1 μM Spastin wurden gleichzeitig mittels TEM überprüft und ein Partikel-Averaging durchgeführt. Diese Mittelung zeigt, dass im Ansatz mit geringer Spastin-Konzentration eine Monomer-Spezies, im mittleren Konzentrationsbereich ein Dimer und im hochkonzentrierten Bereich eine Hexamer-Population dominant ist. Maßstab = 10 nm.

Photobleaching und *Cross-Linking* Experimente lieferten wichtige Hinweise auf den Oligomerisierungsgrad von Spastin unter Einfluss verschiedener Nukleotide und Einsatz variabler Proteinkonzentrationen. Da die Experimente ohne Mikrotubuli durchgeführt wurden, konnten damit noch keine Informationen über den Einfluss verschiedener Nukleotide auf den Bindegrad von Spastin am Mikrotubulus-Filament erhalten werden.

Um eine genaue Aussage über das molare Bindeverhältnis von Spastin zu Tubulin treffen zu können, wurden Cosedimentationsmessungen durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine effiziente Trennung des an Mikrotubuli assoziierten Proteins von ungebundenem Spastin. Die Menge an cosedimentiertem Spastin hängt dabei primär von seinem Oligomerisierungsgrad ab. *Photobleaching*-Experimente haben bereits gezeigt, dass Oligomerisierung durch Nukleotide beeinflusst wird (siehe Punkt III.3.11). Um die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli genau untersuchen zu können, wurden Cosedimentationsmessungen

in Kombination mit ADP, ATP und ATP- γ S durchgeführt. Dabei kam sowohl der Wildtyp als auch die mutierte Version E442Q zum Einsatz. Für die durchgeführten Läufe wurde Spastin mit variablen Konzentrationen von 0 bis 4,5 μ M eingesetzt. Die Tubulin-Konzentration blieb dabei konstant und belief sich auf 1 μ M. Abbildung III.29A zeigt ein typisches SDS-Gel eines Cosedimentationslaufs mit Spastin. In Gegenwart von 1 mM ADP beträgt das molare Bindeverhältnis von Wildtyp-Spastin zu Tubulin 1,37:1. Das Resultat zeigt, dass unter dieser Bedingung hauptsächlich Spastin-Monomere an Tubulinen binden. Wird die Reaktion dagegen mit dem langsam hydrolysierbaren ATP-Analogen ATP- γ S durchgeführt, so bindet jeweils ein Spastin-Dimer an eine Tubulin-Einheit. Dementsprechend liegt das molare Verhältnis zwischen Wildtyp und Tubulin bei 2,09:1. Neben Spastin-Wildtyp wurde auch die hydrolysedefiziente Mutante E442Q in die Messungen miteinbezogen. Während in Anwesenheit von ADP primär Monomere an Mikrotubuli binden, liegt in Gegenwart von ATP- γ S das molare Verhältnis von Enzym zu Tubulin bei 2,27:1. Wurde die Mutante unter Einfluss von ATP mit Mikrotubuli inkubiert, so resultierte dies in einer steigenden Menge an gebundenem Enzym. Unter dieser Bedingung konnte ein molares Verhältnis Spastin zu Tubulin von \approx 3:1 registriert werden. Abbildung III.30B zeigt eine komprimierte Zusammenfassung der Daten. Ausgehend von elektronenmikroskopischen Experimenten hätte man erwarten können, dass E442Q in Gegenwart von ATP hauptsächlich als Hexamer und nicht in Form eines Trimers an das Filament bindet. Diese Diskrepanz wird ausführlich unter Punkt V.3.7 behandelt.

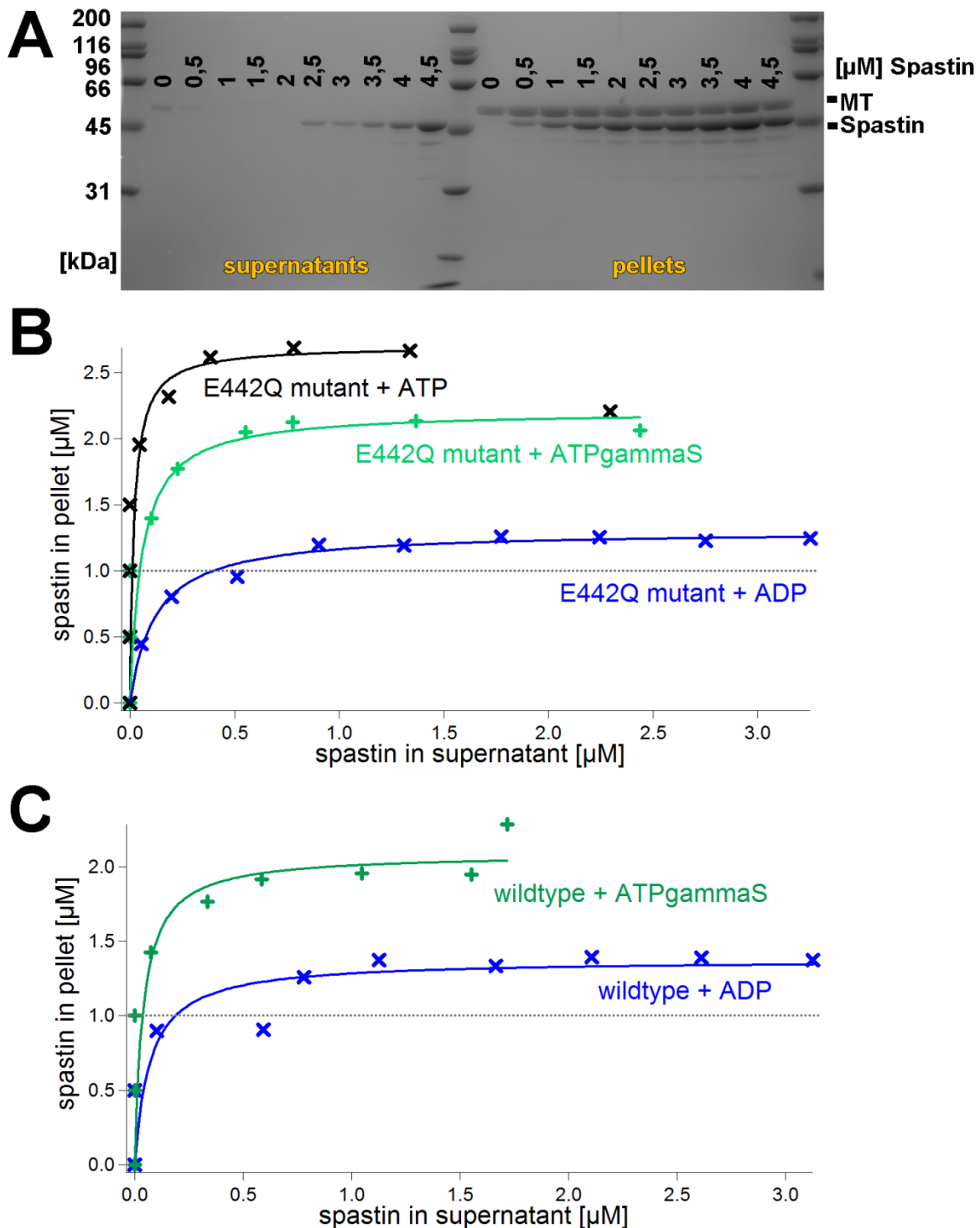


Abbildung III. 29: Bestimmung der Spastin-Bindekapazität am Mikrotubulus unter Einfluss verschiedener Nukleotide.

Um den Bindegrad analysieren zu können, wurden in Gegenwart von ADP, ATP oder ATP- γ S steigende Spastin-Konzentrationen (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 μ M) zu einer konstanten MT-Konzentration von 1 μ M gemischt. An Mikrotubuli assoziiertes Protein wurde von ungebundenem Enzym durch Zentrifugation separiert.

(A) Repräsentatives SDS-Gel einer Cosedimentationsmessung mit Spastin.

(B+C) Die Proteinmengen in Pellet und Überstand wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und die Spastin-Konzentration im Pellet als Funktion gegen die detektierte Proteinmenge im Überstand dargestellt. Der Bindegrad der Mutante E442Q wurde in Gegenwart von ADP (blau), ATP (schwarz) und ATP- γ S (grün) analysiert, während beim Wildtyp ADP (blau) und ATP- γ S (grün) zum Einsatz kamen. Die finale Konzentration der verwendeten Nukleotide lag bei jeweils 1 mM.

E442Q

nucleotide	ADP	ATP-yS	ATP
tubulin [μM]	1	1	1
spastin in pellet [μM]	1,30	2,21	2,70
spastin subunits/tubulin-dimer	1,30/1	2,21/1	2,70/1
oligomer	monomer	dimer	trimer

wildtype

nucleotide	ADP	ATP-yS
tubulin [μM]	1	1
spastin in pellet [μM]	1,37	2,09
spastin subunits/tubulin-dimer	1,37/1	2,09/1
oligomer	monomer	dimer

Abbildung III. 30: Zusammenfassung der Cosedimentationsmessungen.

Komprimierte Wiedergabe der aus den Cosedimentationsmessungen erhaltenen Daten für E442Q (oben) und Wildtyp-Spastin (unten).

III.3.13 Oligomerisierungs- und ATPase-Studien künstlicher Dimere

Photobleaching, *Cross-Linking* und Cosedimentationsexperimente deuten darauf hin, dass eine Dimer-Struktur im Zuge des Spastin-Oligomerisierungsvorgangs eine wichtige Zwischenstufe einnimmt. Um die Bedeutung des Dimers für die Hexamerisierung näher zu analysieren, wurde mit Hilfe einer stabilen *Coiled-Coil* (cc)-Struktur (Bornschoegl und Rief 2008) ein künstliches Dimer, bestehend aus zwei gekoppelten Spastin-Untereinheiten, hergestellt. Nach der Aufreinigung wurde das Protein auf einem SDS-Gel überprüft und die Größe analysiert. Befand sich das Reduktionsmittel 2-Mercaptoethanol im Probenpuffer, so konnte Protein mit einem Molekulargewicht von 47-kDa detektiert werden, das einer Monomer-Einheit entspricht. In Abwesenheit des Reduktionsmittels trat eine Verschiebung der Proteinbande zu einem höheren Molekulargewicht auf. Das Protein kam im Größenbereich von 90-kDa zum Stehen, so dass eine Dimer-Spezies abgeleitet werden konnte (Abbildung III.31A). Nach dem Erhalt von reinem Protein wurden analytische Experimente eingeleitet. Im ersten Schritt wurden mit dem *Coiled-Coil* Spastin Konstrukt Cosedimentationsmessungen durchgeführt (Abbildung III.31A). Damit sollte überprüft werden, ob das Protein generell in der Lage ist, MT-Filamente binden und schneiden zu können. In Abwesenheit von Nukleotiden befindet sich sowohl der Wildtyp als auch die E442Q-Mutante im Pellet, wodurch Cosedimentation mit Mikrotubuli bestätigt werden konnte. Das *Coiled-Coil* Konstrukt ist somit in der Lage, Filamente zu binden. Befanden sich Wildtyp und ATP im Ansatz, so konnten Mikrotubuli im Überstand registriert werden. Dies ist ein Indiz dafür, dass das generierte cc-Spastin Konstrukt die Fähigkeit zum Schneiden von Mikrotubuli besitzt. Im nächsten Schritt wurde die Struktur von

cc-Spastin mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. Ohne Nukleotid konnten sehr viele Dimer-Strukturen beobachtet werden. Wurde dagegen ATP in Kombination mit cc-E442Q Spastin eingesetzt, so traten die für Hexamere charakteristischen Ringstrukturen in Erscheinung. Diese Beobachtungen zeigen, dass das generierte Konstrukt tatsächlich in der Lage ist, aktive Hexamerstrukturen auszubilden. Dies impliziert, dass drei Dimere zu einem funktionsfähigen Hexamer gekoppelt werden können. Somit konnten die Resultate aus den *Cross-Linking* und *Photobleaching*-Studien in der Hinsicht bestätigt werden, dass die Dimer-Spezies eine wichtige Zwischenstufe auf dem Weg zum Hexamer darstellt.

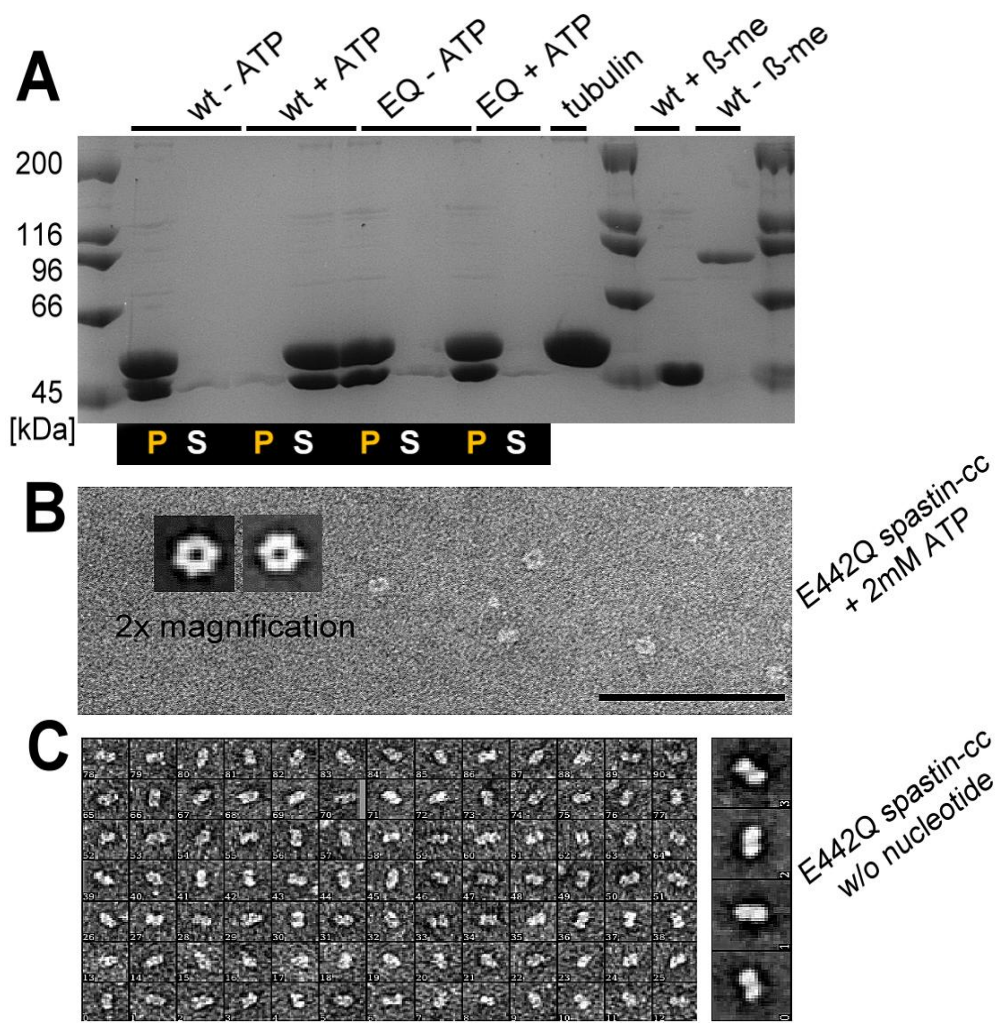


Abbildung III. 31: Generierte *Coiled-Coil* Dimere bilden Hexamere, welche zum *Severing* befähigt sind.

(A) Cosedimentationsmessungen mit cc-Spastin Wildtyp und der mutierten Version E442Q. Ohne ATP cosedimentieren Wildtyp und Mutante mit Mikrotubuli. In Gegenwart von ATP schneidet der Wildtyp Mikrotubuli, so dass eine Tubulin-Fraktion im Überstand registriert werden kann. Befindet sich 2-Mercaptoethanol im Probenpuffer, so ist eine Monomer-Bande (47-kDa) sichtbar, unter nativen Bedingungen dominiert eine Dimer-Population (90-kDa).

(B) Elektronenmikroskopisches Bild von cc-Spastin E442Q, welches Ringstrukturen präsentiert. Partikel-Averaging zeigt Hexamere. Maßstab = 100 nm.

(C) Fehlt ATP im Ansatz, so dominieren Dimere. Auf der linken Seite ist eine Auswahl von Dimeren dargestellt, auf der rechten Seite befinden sich 4 Klassen nach dem Partikel-Averaging. Maßstab = 10 nm.

Im nächsten Schritt wurde das hergestellte *Coiled-Coil* Spastin-Konstrukt auf kinetischer Ebene analysiert. Zu diesem Zweck wurde das Protein mit Hilfe gekoppelter enzymatischer Tests und Variation der MT- und ATP-Konzentration studiert. Die Resultate sollen anschließend mit Daten verglichen werden, die unter Einsatz von delta227-Spastin erhalten wurden. Dadurch soll der Einfluss des Dimers auf die ATP-Umsatzrate analysiert werden. Um Verwechslungen zu vermeiden, wird das konventionelle Spastin-Protein im folgenden Abschnitt als „delta227-Spastin“ bezeichnet, während für das künstlich generierte Konstrukt die Bezeichnung „*Coiled-Coil* Spastin“ Verwendung findet.

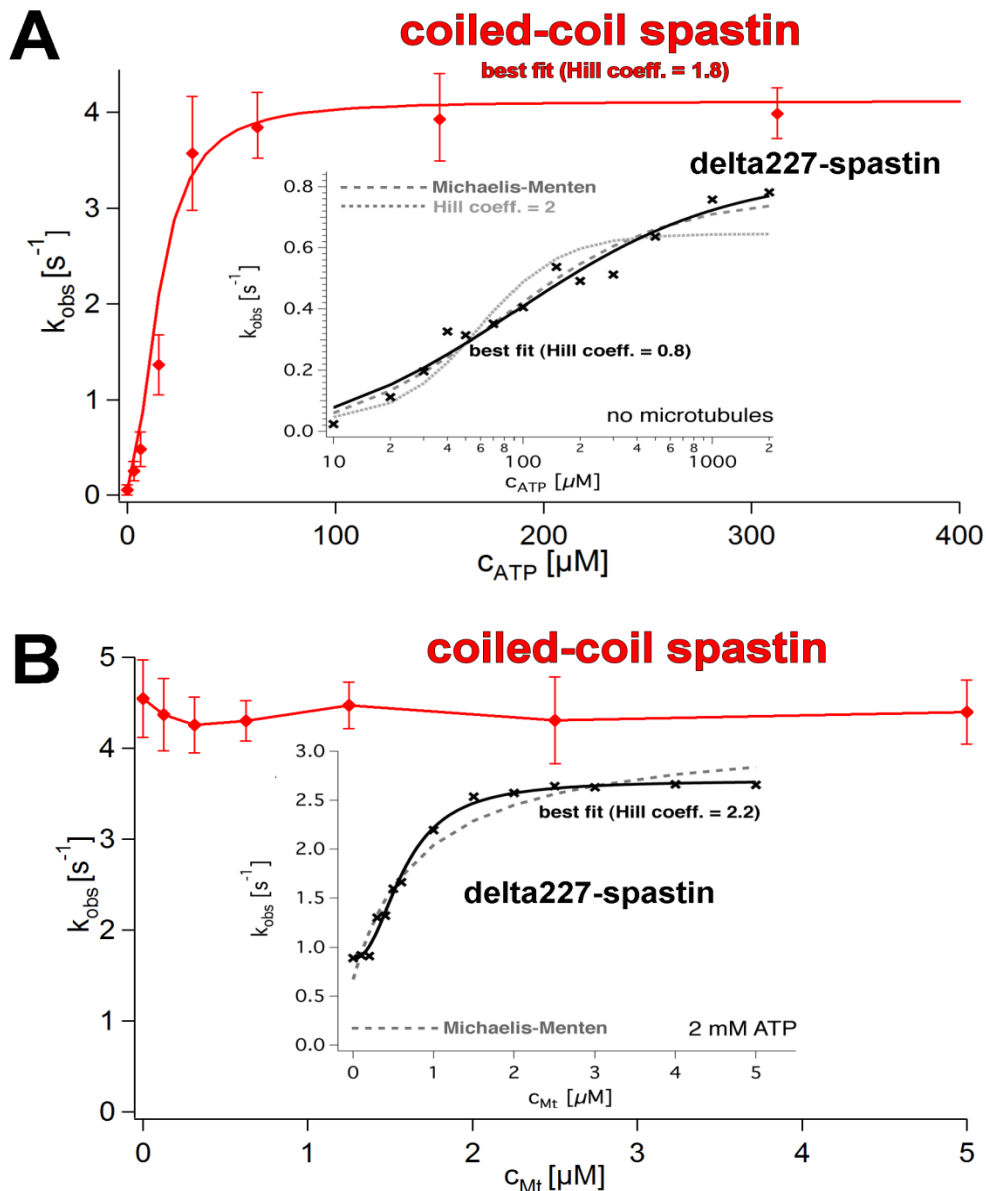


Abbildung III. 32: ATPase-Tests von *Coiled-Coil* Spastin mit variablen Konzentrationen an ATP und Mikrotubuli.

(A) ATPase-Rate in Abwesenheit von Mikrotubuli. Während delta227-Spastin eine basale Hydrolyserate von ≈ 1 ATP/s aufweist (inneres Bild), erreicht das *Coiled-Coil* Konstrukt selbst ohne Mikrotubuli eine maximale Umsatzrate von ≈ 4 ATP/s.

(B) Die Umsatzrate von cc-Spastin erfährt durch Mikrotubuli keine Stimulierung. Selbst in Abwesenheit der Filamente kann maximaler ATP-Umsatz registriert werden. Dies steht im Gegensatz zur ATP-Umsatzrate von delta227-Spastin, welche durch Mikrotubuli stimuliert wird (inneres Bild).

Um die erhaltenen Messwerte des künstlich erzeugten Dimers besser interpretieren zu können, wurden die erhaltenen Daten mit den ATP-Hydrolyseraten von delta227-Spastin verglichen. Für diesen Zweck wurden die Messdaten mit Hilfe der Michaelis-Menten oder der Hill-Gleichung gefittet.

- **ATP-Titration**

Die ATP-Titration wurde für delta227-Spastin sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von MT durchgeführt. Für das Dimer-Konstrukt wurde dagegen eine ATP-Titrationsstudie ohne Mikrotubuli durchgeführt. Die ATP-Titration von delta227-Spastin ohne MT kann sowohl mit dem Hill-Modell mit $h = 0,93 \pm 0,15$ als auch mit dem Michaelis-Menten-Modell genähert werden. Damit tritt in Reaktionsansätzen ohne Mikrotubuli keine Kooperativität auf. Im Gegensatz dazu zeigen ATP-Titrationsanalysen von delta227-Spastin mit Mikrotubuli ($h = 2,1 \pm 0,2$) sowie *Coiled-Coil* Spastin ohne MT ($1,86 \pm 0,22$) eindeutiges Kooperativitätsverhalten. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass in Bezug auf delta227-Spastin ATP nur in Anwesenheit von MT kooperatives Verhalten auslösen kann. Dagegen tritt bei der *Coiled-Coil* Variante Kooperativität auch ohne Mikrotubuli-Filamente auf.

- **MT-Titration**

Ein signifikanter Unterschied zwischen *Coiled-Coil* Spastin und delta227-Spastin besteht darin, dass die ATP-Umsatzrate des künstlichen Dimers keine Stimulierung durch Mikrotubuli erfährt. Der Datensatz von Wildtyp-Spastin lässt sich sowohl mit der Michaelis-Menten als auch mit der Hill-Gleichung gut beschreiben. Bei den in Abwesenheit von Mikrotubuli erfolgten Messungen konnte keine Kooperativität beobachtet werden. Der berechnete Hill-Koeffizient lag bei $1,28 \pm 0,28$. Vergleicht man den Wert mit Messdaten aus Mikrotubuli-Titrationsstudien, so tritt ein signifikanter Unterschied in die Richtung auf, dass der Hill-Koeffizient h einen Wert von $2,2 \pm 0,4$ annimmt. Dies ist ein Indikator dafür, dass durch Hinzugabe von MT kooperatives Verhalten induziert wird. Im Gegensatz dazu konnten in Titrationsexperimenten mit dem fusionierten Dimer-Konstrukt von MT unabhängige ATP-Umsatzraten beobachtet werden. Für cc-Spastin wurde in Abwesenheit von MT eine maximale Rate von 4,65 ATP/s ermittelt. Das Konstrukt benötigt somit für maximale Aktivität keine Mikrotubuli.

Die unterschiedlichen Verhaltensmuster der *Coiled-Coil* Variante und delta227-Spastin werden unter Punkt V.4 ausführlich diskutiert.

III.4 Methoden; Spastin-Projekt

III.4.1 Primer für Amplifikationen

Folgende Formel wurde herangezogen, um die Schmelztemperatur zu bestimmen:

$$T_m = 64,9 + 41 \cdot [(y \cdot G + z \cdot C - 16,4) / (w \cdot A + x \cdot T + y \cdot G + z \cdot C)]$$

(w, x, y und z spiegeln dabei die Anzahl der Basen A, T, C, G in der Basensequenz wider).

Forward-Primer für KKCK-Spastin (pGEX6P2-Vektor)

5'-AATAAT**GGATCCAAGAAATGCAAG**ATGAGTGGAGCTGTTCCAAAAAGAAAAGA
CCCCTTAACACAC-3'

$$T_m = 73,46^\circ\text{C}$$

Reverse-Primer für KKCK-Spastin (pGEX6P2-Vektor)

5'-AATAAT**GCGGCCGCCTA**TCTCAAACAGTGGTATCTCCAAAGTCCTTGTTCCAACGT
ATGTACGC-3'

$$T_m = 75,98^\circ\text{C}$$

Forward-Primer für GFP (pGEX6P2 Spastin-Vektor)

5'-AATAAT**GGATCC**GTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'

$$T_m = 69,77^\circ\text{C}$$

Reverse-Primer für GFP (pGEX6P2 Spastin-Vektor)

5'-CCTGCG**GGATCCGGGTGCTCCTGGTGCTCC**CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG
AGTGATCC-3'

$$T_m = 69,51^\circ\text{C}$$

- NotI
- BamHI
- Stop-Codon
- GAPGAP-Linker
- KKCK

Forward-Primer für Spastin-MTBD5'-GAAGAA**CCATGG**AAAGCGGACTGTCAATGG-3' $T_m = 65,16^\circ\text{C}$ **Reverse-Primer für Spastin-MTBD**5'-GAAGAA**GGATCC**TTAATCAGATTCGCCAGATTTG-3' $T_m = 65,54^\circ\text{C}$

- *NcoI*
- *BamHI*

III.4.2 Proteinexpression im bakteriellen System und Aufreinigung

III.4.2.1 Expression und Proteinaufreinigung

Aus einer Glyzerinkultur wurde eine Übernachtskultur hergestellt, die auf eine OD_{600} von 0,2 verdünnt wurde. Dazu wurde selektives LB^{Carb} -Medium mit einer finalen Konzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ Carbenicillin (AppliChem) verwendet. Zellen wurden in einem Schüttelinkubator (180 rpm, New Brunswick Scientific) bei 37°C hochgezogen. Erreichte die OD_{600} der Zellen einen Wert von 0,6, so wurde die Inkubator-Temperatur auf 20°C reduziert. Bei Erreichen einer OD_{600} von 0,8 wurde die Expression des Proteins mit 0,5 mM IPTG (Sigma-Aldrich) induziert und die Kultur über Nacht inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines Photometers (DU® 730, Beckman Coulter) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Für das Ernten der Bakterienzellen wurde der Ansatz bei $1500 \times g$ für 20 Minuten und 4°C zentrifugiert (Rotanta 460 R, Hettich). Nach dem Resuspendieren der Zellen in Puffer 2 erfolgte der Transfer der Suspension in ein steriles 50 ml Falcon-Gefäß. Nach erneuter Zentrifugation (4°C , $1500 \times g$, 10 Minuten) wurde der Überstand entfernt, das Pellet gewogen und die Zellen entweder bei -20°C eingefroren oder zur sofortigen Extraktion in vorgekühltem Puffer 2 resuspendiert. Zur Zellsuspension wurden pro 10 Gramm Pellet 3000 U Lysozym (Applichem), eine Protease-Inhibitor-Cocktail Tablette (Roche) hinzugefügt und der Ansatz auf Eis gelagert. Um die Ausbildung unspezifischer Disulfidbrücken zu unterbinden, wurde DTT (1 mM) benutzt. Alle folgenden Schritte wurden entweder auf Eis, in der Kühlkammer oder in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge durchgeführt. Die resuspendierten Zellen wurden in einer vorgekühlten *French® Pressure* Zelle (Fisher Scientific) aufgebrochen und Zelltrümmer bei $50000 \times g$ und 4°C für 40 Minuten vom Proteinüberstand getrennt (Optima™ L-90K, Beckman Coulter). Während des Zentrifugationslaufs wurde Glutathion-Sepharose Säulenmaterial (GE Healthcare) gewaschen und mit Puffer 2 äquilibriert. Dazu wurden 500 μl Säulenmaterial auf 500 ml Expressionsansatz eingesetzt. Das Säulenmaterial wurde in einer vorgekühlten Tischzentrifuge

fuge (PerfectSpin 24 R, PEQLAB) bei 4°C und 1000 x *g* für 5 Minuten pelletiert und der Überstand verworfen. Das Glutathion-Sepharose Säulenmaterial wurde 1-mal mit H₂O gewaschen und anschließend 3-mal mit Puffer 2 äquilibriert. Der Proteinüberstand aus der Ultrazentrifuge wurde mit einem 0,2 µm Filtropur Spritzen-Filter (Sarstedt) sterilfiltriert und in Kombination mit dem Säulenmaterial für 1 Stunde auf einem Überkopffroller im Kühlraum inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz gewaschen. Dazu wurde der Ansatz bei 4°C mit 1000 x *g* für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 ml Puffer 2 resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und das in 1 ml Puffer 2 resuspendierte Säulenmaterial in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Dieser Waschvorgang wurde so lange wiederholt bis der Überstand im Bradford-Test keine Blaufärbung mehr aufwies. Damit konnte sichergestellt werden, dass keine unspezifischen Proteine co-eluiert werden. Für den Elutionsvorgang wurden 10 mM reduziertes Glutathion (Sigma-Aldrich) in Puffer 2 verwendet. Je nach Probenvolumen wurde das Säulenmaterial mit einem Volumen zwischen 500 und 1000 µl Puffer 3 resuspendiert, für 2 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die Elution so lange wiederholt bis mit dem Bradford-Test kein Protein mehr nachgewiesen werden konnte.

III.4.2.2 Kationenaustauscher-Chromatographie

Um einen sehr hohen Reinheitsgrad zu erhalten, wurde GST-Spastin Fusionsprotein zusätzlich über eine Sulfopropyl-Säule (SP-Sepharose, Volumen = 1 ml, GE Healthcare) aufgereinigt. Die aus der Affinitätschromatographie erhaltenen Proteinfraktionen wurden auf die Kationenaustauscher-Säule appliziert, die zuvor mit Puffer 2 äquilibriert wurde. Nach dem Beladen der Säule mit Protein erfolgte ein Waschschriff mit Puffer 2 (3-faches Säulenvolumen). Die Elution von Spastin wurde durch einen Hochsalzpuffer mit 0,3 M NaCl (Puffer 1) realisiert. Alle Wasch- und Elutionsschritte wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt.

III.4.2.3 Abspaltung des Affinitäts-Tags

Um den GST-Tag vom Spastin abtrennen zu können, wurde ein spezifisches Enzym – die *PreScission*-Protease (GE Healthcare) – zum Proteinansatz hinzugefügt. Diese Protease erkennt und schneidet eine spezifische Sequenz, die das Ende des GST-Tags markiert. Nach dem Verdau stand Spastin ohne Fusions-Tag zur Verfügung. Auf 5 mg in Puffer 1 gelöstes Protein wurden 50 U *PreScission*-Protease hinzugegeben und der Ansatz für 5 Stunden bei 4°C inkubiert. Das geschnittene Protein wurde erneut mit Glutathion-Sepharose Säulenmaterial behandelt. Während der abgetrennte GST-Tag an das Säulenmaterial bindet, befindet sich das unfusionierte Spastin-Protein nach Zentrifugation im Überstand. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff

schockgefroren und im -80°C -Schrank gelagert. Zur Analyse der Reinheit des Proteins wurde 1 Aliquot auf einem SDS-Gel analysiert.

Lösungen

Puffer 1

50 mM HEPES (pH 7,4)

300 mM NaCl

5 mM MgCl_2

5% Glyzerin (v/v)

1mM DTT

Puffer 2

50 mM HEPES (pH 7,4)

150 mM NaCl

5 mM MgCl_2

5% Glyzerin (v/v)

1 mM DTT

Puffer 3

50 mM HEPES (pH 7,4)

150 mM NaCl

5 mM MgCl_2

5% Glyzerin (v/v)

1 mM DTT

10 mM reduziertes Glutathion

III.4.3 Chemische Konjugation von Proteinen mit Fluorophoren

Für die Analyse des Spastin-Oligomerisierungsgrads mittels analytischer Ultrazentrifuge (Proteom-Lab XL-A, Beckman Coulter) wurde das Protein nach Affinitäts- und Kationenaustauscher-Chromatographie kovalent an den Maleimid-Farbstoff ATTO488 (ATTO-TEC) gekoppelt. Da im Spastin-Konstrukt ein KKCK-Motiv zur Verfügung stand, konnte der Farbstoff spezifisch und definiert an den N-Terminus von Spastin gebunden werden. Für die chemische Konjugation musste zunächst DTT aus dem Ansatz entfernt werden, da dieses Reduktions-

mittel die Kopplung zwischen Cystein und Maleimid-Komponente beeinträchtigen würde. Unter Einsatz der Gelfiltrationssäule Illustra NAP-5 (GE Healthcare) erfolgte das Umpuffern mit Puffer 1 (ohne Glycerin), der anstelle von DTT 1 mM TCEP (Sigma-Aldrich) enthielt. Danach wurde das Protein mit einem zweifach molaren Überschuss an ATTO488 inkubiert und die Reaktion bei 4°C über 20 Minuten fortgesetzt. Zum Abstoppen des Reaktionsprozesses wurden 10 mM DTT zum Ansatz hinzugegeben. Zur effizienten Abtrennung von überschüssigem Farbstoff wurde der Ansatz erneut auf eine Gelfiltrationssäule (NAP-5) appliziert. Aufgrund des höheren Molekulargewichts der Protein/Farbstoff-Komponente war eine sehr gute Separation von freiem Farbstoff möglich. ATTO488-Spastin wurde entweder sofort in analytische Ultrazentrifugationsläufe eingesetzt oder aliquotiert, schockgefroren und im -80°C Schrank gelagert.

III.4.4 Analytische Ultrazentrifugation (AUZ)

In der analytischen Ultrazentrifuge kann das Sedimentationsverhalten von Makromolekülen verfolgt werden. Dabei finden unterschiedliche optische Detektionssysteme Verwendung. Dazu gehören die Lichtabsorption und/oder die Interferenz. Weiterhin kann in die Interferenzoptik ein zusätzlicher Fluoreszenzdetektor eingebaut werden. Dieser registriert Fluoreszenzsignale, die von Probenmolekülen ausgehen, wenn sie mit Laserlicht der entsprechenden Wellenlänge angeregt werden. Dies erlaubt dem Experimentator, die Entwicklung der Probenkonzentration gegen die Achse des Rotationsprofils zu beobachten. In Abhängigkeit von der Rotationsgeschwindigkeit bildet sich ein „selbstformender“ Dichtgradient heraus. Alternativ können vorgeformte Dichtegradienten (zum Beispiel Saccharose oder Glycerin) eingesetzt werden. Mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge können zwei Arten von Experimenten durchgeführt werden: Sedimentationsgeschwindigkeits- und Sedimentationsgleichgewichtsexperimente.

- Sedimentationsgeschwindigkeitsanalysen versuchen die vollständige Zeitreihe der Sedimentation zu interpretieren. So können Aussagen über Form und molare Massen der getrennten Moleküle getroffen werden. Die Auflösung der Größe skaliert etwa mit dem Quadrat der Partikel-Radien. Durch eine Anpassung der Rotor-Geschwindigkeit können Molekülgrößen zwischen 100-Da und 10-GDa analysiert werden. Die Sedimentationsgeschwindigkeit kann auch für das Studieren reversibler chemischer Gleichgewichte zwischen makromolekularen Spezies verwendet werden.
- Sedimentationsgleichgewichtsexperimente befassen sich ausschließlich mit dem finalen Gleichgewichtszustand, der sich am Ende des Experiments eingestellt hat. In dieser Phase ist die Sedimentation durch Auftrieb ausgeglichen, die dem Konzentrationsgradienten entgegengesetzt ist. Daraus ergibt sich ein Konzentrationsprofil. Sedimentationsgleichgewichtsverteilungen im Zentrifugationsfeld werden durch die Boltzmann-Verteilung charakterisiert. Diese Variante der Ultrazentrifugation erlaubt keine Aussagen über die Form von Molekülen, sondern gibt vielmehr Hinweise auf die molare Masse

von Makromolekülen. Im Fall chemischer Reaktionsgemische können weiterhin Aussagen über chemische Gleichgewichtskonstanten gemacht werden.

Zusammengefasst liefern die beiden experimentellen Versionen im Rahmen der Ultrazentrifugation folgende Informationen: Form, Konformationsänderungen und Größenverteilung makromolekularer Proben können analysiert werden. Für Makromoleküle, die sich in einem chemischen Gleichgewicht mit unterschiedlichen nichtkovalenten Komplexen befinden, können Anzahl und Stöchiometrie der Komplex-Untereinheiten sowie deren Gleichgewichtskonstanten bestimmt werden.

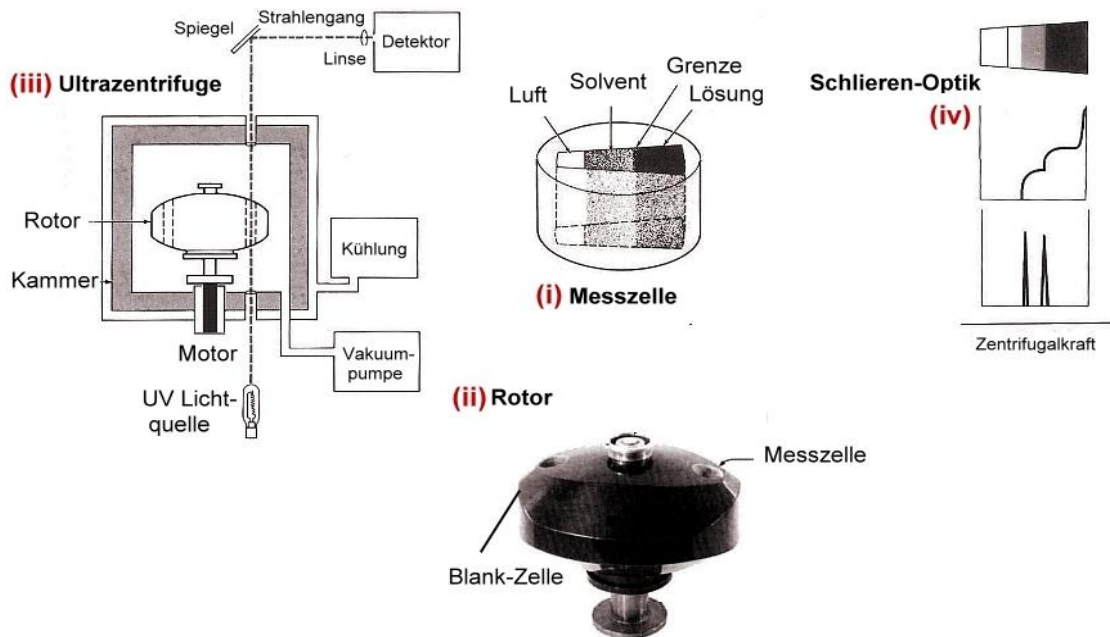


Abbildung III. 33: Aufbau und Funktionsweise einer analytischen Zentrifuge.

Die analytische Ultrazentrifuge verwendet sehr hohe Zentrifugalkräfte ($>> 100.000 \times g$), um höhermolekulare Moleküle oder Organellen, die sich nur marginal in ihrer Dichte unterscheiden, separieren zu können. **(i)** Die zu analysierende Probe wird in eine Probenzelle pipettiert, die analog zu einem Zentrifugenröhrchen einen permanenten rechten Winkel zur Rotationsachse aufweist. **(ii)** Die Messzelle wird in eine zylindrische Vertiefung an der Rotorseite gegeben und mit einer Referenzzelle ausgeglichen, die das gleiche Gewicht aufweist. Der Rotor wird dann auf eine Spindel gesetzt, die mit dem Motor gekoppelt ist. **(iii)** Der Reaktionsraum ist mit einer Vakuumpumpe ausgestattet, um Luftreibung zu verhindern. Gekühlt wird mit einem integrierten Kühlmantel, welcher sicherstellt, dass eine konstante Temperatur aufrecht erhalten bleibt und Überhitzung ausgeschlossen wird. Der Fortschritt des Experiments wird durch das Passieren eines Lichtstrahls durch ein im unteren Teil der Zelle lokalisiertes Quarzfenster beobachtet. Zusätzlich passiert Licht ein durchlässiges Glasfenster im oberen und unteren Bereich der Zelle und verlässt durch ein weiteres Fenster die Kammer, wo es durch Umlenkspiegel zum Detektor geleitet wird. Moleküle im Ansatz diffundieren dabei zentripetal (zur Achse hin), während Lösung und Lösungsmittel ineinander diffundieren. **(iv)** Im dargestellten Beispiel sind zwei molekulare Spezies dargestellt. Eine leichtere davon wandert schneller und weiter (zum Zentrum hin), während die dichtere Fraktion dahinter bleibt. Die Dichteänderung im Grenzgebiet zwischen den beiden Regionen (mittleres Diagramm) führt zur Beugung des Lichts, das die Probenzelle passiert. Die daraus resultierende Überlagerung angrenzender Signale (Schlieren-Optik) wird durch einen Peak am Übergangspunkt angezeigt. Höhe und Position dieses Impulses sind Indikatoren für Menge und molekulares Gewicht der eingesetzten Komponente. (Abbildung modifiziert nach Freifelder, 1983).

III.4.4.1 Probenvorbereitung

Für die analytische Ultrazentrifugation wurde $\Delta 227$ -Spastin eingesetzt, welches über eine Cystein-Komponente mit ATTO488 gekoppelt wurde (siehe Punkt III.4.3). Die Experimente wurden in einer Beckman ProteomLab XL-A Zentrifuge durchgeführt, die mit einem Fluoreszenzdetektor ausgestattet war (Aviv Biomedical). Die Proteinkonzentration variierte dabei zwischen 0,1 und 1 μM Spastin in BRB80-Puffer, das Probenvolumen betrug jeweils 350 μl . Die Sedimentation der Ansätze - in Gegenwart oder Abwesenheit von Nukleotid - wurde bei $142000 \times g$ für 3 Stunden und 20°C beobachtet. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms SedView (Hayes und Stafford 2010) visualisiert, die weitere Analyse erfolgte mit dem Software Paket UltraScan (Demeler 2005). Um das Molekulargewicht der Proben nach der Einstein-Relation (die in das Programm UltraScan implementiert ist) bestimmen zu können, wurden deren Sedimentationsgeschwindigkeiten berücksichtigt. Es muss beachtet werden, dass die Einstein-Relation nur korrekte Resultate liefert, so lange die zu analysierenden Partikel während des gesamten Laufs stabil sind.

III.4.5 Kooperativität der Oligomerisierung

III.4.5.1 Oligomerisierungsgleichgewicht

Die Assoziation von Spastin wurde mit Hilfe eines Dimer-Modells beschrieben. Ein Modell, das sich auf die Verknüpfung von vier Untereinheiten fokussiert, liefert eine wesentlich komplexere Formel. Dagegen kann ein Modell für sechs miteinander interagierende Untereinheiten aufgrund seiner Komplexität nicht mehr analytisch gelöst werden. Durch die Definition

$$K_d = c_{WtWt,eq}/c_{Wt,eq}^2 \text{ und der Bedingung} \\ c_{Wt,total} = c_{Wt,eq} + 2 c_{WtWt,eq} \quad (\text{Gleichung 1})$$

mit $c_{Wt,total}$ -Konzentration von Wildtyp-Enzym, $c_{Wt,eq}$ - Konzentration der Wildtyp-Monomere im Gleichgewicht, $c_{WtWt,eq}$ - Konzentration der Wildtyp-Dimere im Gleichgewicht folgt, dass

$$c_{WtWt,eq} = 1/8 \cdot (4 \cdot c_{Wt,total} + 1/K_d - \sqrt{[1 + 8 \cdot c_{Wt,total} K_d]/K_d}) \quad (\text{Gleichung 2})$$

Um den ATP-Umsatz annähern zu können, wurde der rechte Abschnitt der Formel mit $2 \cdot k_{cat,Wt}$ multipliziert - dabei wurde nur eine der Untereinheiten berücksichtigt. In der Praxis waren Näherungen, die mit Hilfe von Gleichung 1 und der hyperbolischen Variante (Gleichung 2) durchgeführt wurden, kaum voneinander zu unterscheiden.

III.4.5.2 *Steady-State* ATPase-Kinetik

Um die *Steady-State* Kinetik von Spastin und Mischungen, bestehend aus Wildtyp und Mutante, zu verstehen, wurden mehrere Ansätze verfolgt. Zum einen wurden die Daten mit Hilfe der Michaelis-Menten Gleichung visualisiert, zum anderen kam das Hill-Modell zum Einsatz, welches Kooperativität beschreibt. Das Hill-Modell wurde schließlich mit dem praxisbezogeneren Adair-Modell verglichen. Das Fitten der Daten erfolgte mit der Software IgorPro (Wavemetrics, Portland OR, U.S.A.), die Statistik wurde mit der Software GraphPad Prism (Graphpad, La Jolla, CA, U.S.A.) erstellt. Die Michaelis-Menten Gleichung wurde herangezogen um zu überprüfen, ob nichtkooperative-Modelle die experimentellen Daten erklären können (Fersht 1984):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot c_S / (K_{0.5} + c_S) \quad (\text{Gleichung 3})$$

k_{cat} – katalytische Konstante, c_S – Substrat-Konzentration, $K_{0.5}$ – halbmaximale Aktivierungskonstante.

Um Rohdaten annähern zu können, wurde die Hill-Gleichung in ihrer hyperbolischen Form (nicht logarithmisch) (Segel 1975) eingesetzt. Dieses Hill-Modell beschreibt h fortlaufende Bindungsereignisse für ein Enzym mit h kooperativen Stellen als einen Schritt mit einer zusammengefassten Assoziationskonstante $K' = c_E \cdot c_S^h / c_{\text{ES},h}$ (c_E – Konzentration von freiem Enzym im Gleichgewicht, c_S – Substrat-Konzentration, $c_{\text{ES},h}$ – Konzentration des gesättigten Enzym-Substrat-Komplexes im Gleichgewicht).

Es muss beachtet werden, dass die Assoziationskonstante K' die Einheit $[M]^h$ aufweist. Für den Fall, dass nur der vollständig besetzte Enzym-Substrat-Komplex aktiv ist, folgt für die Umsatzrate pro Untereinheit k_{obs} ,

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot c_{\text{ES},h} / c_{\text{E},\text{total}} \quad (\text{Gleichung 4})$$

($c_{\text{E},\text{total}}$ – Enzymkonzentration). Beachtet man die Definition von K' , so erhält man für k_{obs}

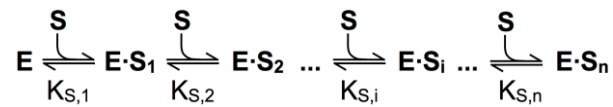
(Hill-Gleichung):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot c_S^h / (K' + c_S^h) \quad (\text{Gleichung 5})$$

h – Hill-Koeffizient. Die halbmaximale Aktivität, $c_S = K_{1/2}$, ist bei einer Substratkonzentration von $K_{1/2} = (K')^{(1/h)}$ erreicht.

Im Allgemeinen können über den Hill-Koeffizienten keine Aussagen über die Anzahl an interagierenden Untereinheiten getroffen werden, weil das Modell die Abfolge der Substratbindungsereignisse nicht berücksichtigt. Somit schließt das Modell zeitgleich Aktivität, welche durch partiell mit Substrat bestückten Intermediaten hervorgerufen wird, aus. Das Adair-Modell (Schema 1)

berücksichtigt diese Problematik, indem es Substratbindung als sequentiellen Prozess (Adair und Field 1925) betrachtet



SCHEMA 1: ADAIR-MODELL

Dieses Modell basiert darauf, dass die Konzentrationen jeder Zwischenstufe durch die rekursive Verwendung der sequentiellen Dissoziationskonstante $K_{S,i}$ berechnet wird. Diese Konstante wird anschließend mit der katalytischen Konstante jeder besetzten Stufe ($k_{p,i}$) multipliziert. Daraus resultiert (Segel 1975):

$$k_{\text{obs}} = \left((k_{p,1} c_S^1 / (K_{S,1})) + (k_{p,2} c_S^2 / (K_{S,1} K_{S,2})) + \dots + (k_{p,n} c_S^n / (K_{S,1} K_{S,2} \dots K_{S,n})) \right) / \left(1 + c_S^1 / K_{S,1} + c_S^2 / (K_{S,1} K_{S,2}) + \dots + c_S^n / (K_{S,1} K_{S,2} \dots K_{S,n}) \right)$$

(Gleichung 6)

Gleichung 6 zeigt, dass das Modell zu $2 \cdot n$ freien Parametern führt, die ohne zusätzliche Informationen bezüglich der Raten und Substrat-Bindungsaffinitäten zu kaum verlässlichen Daten führt.

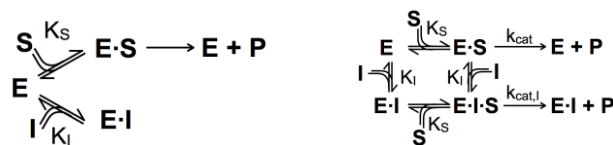
III.4.5.3 Inhibition durch Substrat-Analoga

Kompetitive Hemmung wurde nach Schema 2 beschrieben (linke Seite) und mit Hilfe der folgenden Gleichung angenähert (Fersht 1984):

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot c_S / (c_S + K_S \cdot (1 + c_I/K_I))$$

(Gleichung 7)

c_I – Konzentration des Inhibitors, K_M – Michaelis-Menten Konstante, K_I – Inhibitionskonstante.



SCHEMA 2: KOMPETITIVE INHIBITION

Nicht-kompetitive Hemmung wurde nach Schema 2 beschrieben (rechte Seite) und mit folgendem Term gefittet (Fersht 1984):

$$k_{\text{obs}} = c_S (c_I k_{\text{cat},I} + K_I k_{\text{cat}}) / ((K_I + c_I) \cdot (K_S + c_S))$$

(Gleichung 8)

Das Konzept von Gleichung 6 kann sowohl für die sequentielle Substratbindung als auch für Substrat-Analoga verwendet werden. Vernachlässigt man die Werte in der Potenzreihe, führt dies zu einer Vereinfachung, welche analog zur Hill-Simplifizierung ist. Abhängig davon, ob sich ATP und ATP- γ S gegenseitig kooperativ beeinflussen, gilt für die Näherungsgleichung

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot (c_S^h / (1 + c_I^h / K_I)) / (K_M + c_S^h) \quad (\text{Gleichung 9a})$$

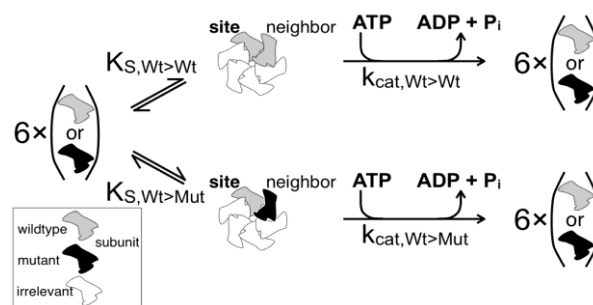
oder

$$k_{\text{obs}} = k_{\text{cat}} \cdot (c_S / (1 + c_I^h / K_I)) / (K_M + c_S) \quad (\text{Gleichung 9b})$$

In der Praxis lieferten die beiden Modelle sehr ähnliche Ergebnisse, weil die genäherten Hill-Koeffizienten nahe 1 lagen.

III.4.5.4 Mutanten-Inhibition

Die Inhibition von Spastin durch mutierte Untereinheiten wurde durch die Zugabe steigender Konzentrationen an Mutante zu einer konstanten Konzentration an Wildtyp beobachtet. In Gegenwart der Mutante erfolgte eine Abnahme der Aktivität von Wildtyp-Untereinheiten (Punkt III.2.3). Dies ist ein starker Indikator für auftretende Wildtyp-Mutanten Interaktion. Das folgende Modell geht davon aus, dass jede Wildtyp-Untereinheit durch einen Nachbarn beeinflusst wird (Schema 3). Strukturelle Daten deuten darauf hin, dass die aktive Form von Spastin eine hexamere Ringstruktur darstellt (Roll-Mecak und Vale 2008). Das vorgestellte Modell ist jedoch nicht auf diese Annahme reduziert. Es benötigt lediglich mindestens zwei miteinander interagierende Untereinheiten (bevorzugt Nachbar-Interaktion) sowie einen unterschiedlichen Effekt abhängig davon, ob der Nachbar links oder rechts vom Wildtyp lokalisiert wird. Die Orientierung zwischen Wildtyp und Nachbarn wird im Folgenden durch die Verwendung eines Pfeils `>` dargestellt (Wt > X bedeutet: Wt = Wildtyp-Untereinheit, X = Spezies, welche die rechte Nachbarposition einnimmt). Schema 2 zeigt die Grundlage für die Berechnung der Aktivität einer Wildtyp-Untereinheit an einer spezifischen „Stelle“, abhängig vom rechts lokalisierten Nachbarn.



SCHEMA 3: NACHBAR-INTERAKTIONSMODELL

Für die Aktivität pro „Stelle“ gilt

$$k_{\text{obs}} = (k_{\text{cat,Wt>Wt}} \cdot c_{\text{Wt>Wt}} + k_{\text{cat,Wt>Mut}} \cdot c_{\text{Wt>Mut}}) / c_{\text{Wt,total}} \quad (\text{Gleichung 10})$$

$k_{\text{cat,Wt>X}}$ – katalytische Konstante der Wildtyp-Untereinheiten mit Nachbar X, $c_{\text{Wt>X}}$ – Konzentration der Wildtyp-Untereinheiten mit Nachbar X im Gleichgewicht. Es

muss beachtet werden, dass Mutanten an der entsprechenden „Stelle“ als inaktiv betrachtet werden. Für die gesamte Wildtyp-Konzentration, $c_{Wt,total}$, gilt

$$c_{Wt,total} = 2 \cdot c_{Wt>Wt} + c_{Wt>Mut} + c_{Mut>Wt} + c_{Wt} \quad (\text{Gleichung 11})$$

mit $c_{Mut>Wt}$ – Konzentration von Wildtyp mit einer benachbarten Mutante im Gleichgewichtszustand, c_{Wt} – Konzentration von Wildtyp-Monomer im Gleichgewicht. Unter Berücksichtigung des Massenwirkungsgesetzes für die Nachbar-Formation,

$$\begin{aligned} K_{a,Wt>Wt} &= c_{Wt>Wt} / c_{Wt}^2 \\ K_{a,Wt>Mut} &= c_{Wt>Mut} / c_{Wt} \cdot c_{Mut} \\ K_{a,Mut>Wt} &= c_{Mut>Wt} / c_{Wt} \cdot c_{Mut} \\ K_{a,Mut>Mut} &= c_{Mut>Mut} / c_{Mut}^2 \end{aligned}$$

wird aus Gleichung 10

$$k_{obs} = (k_{cat,Wt>Wt} \cdot c_{Wt} \cdot K_{a,Wt>Wt} + k_{cat,Wt>Mut} \cdot c_{Mut} \cdot K_{a,Wt>Mut}) / (2 c_{Wt} \cdot K_{a,Wt>Wt} + c_{Mut} (K_{a,Wt>Mut} + K_{a,Mut>Wt}) + 1) \quad (\text{Gleichung 12})$$

Aufgrund der bimolekularen Natur der Assoziationsvorgänge für Wildtyp > Wildtyp sowie Mutante > Mutante Nachbar-Formation, ist es nicht möglich, die freien Gleichgewichtskonzentrationen von Wildtyp und Mutante aus dem Nenner zu streichen. Um eine Annäherung zu erhalten, galt

$$\begin{aligned} c_{Wt} &= c_{Wt,total} - 2 c_{Wt>Wt} - c_{Wt>Mut} - c_{Mut>Wt} \\ c_{Mut} &= c_{Mut,total} - 2 c_{Mut>Mut} - c_{Wt>Mut} - c_{Mut>Wt} \end{aligned}$$

sodass Gleichung 12 folgendermaßen modifiziert werden konnte

$$k_{obs} = (k_{cat,Wt>Wt} \cdot K_{a,Wt>Wt} \cdot (c_{Wt,total} - 2 c_{Wt}^2 K_{a,Wt>Wt}) - c_{Mut} \cdot c_{Wt} \cdot 2 \cdot K \cdot (k_{cat,Wt>Wt} \cdot K_{a,Wt>Wt} + k_{cat,Wt>Mut} \cdot K_{a,Wt>Mut}) - 2 c_{Mut}^2 k_{cat,Wt>Mut} K_{a,Mut>Mut} K_{a,Wt>Mut} + c_{Mut,total} \cdot k_{cat,Wt>Mut} \cdot K_{a,Wt>Mut}) / (1 + c_{Mut,total} \cdot 2 \cdot K - 2 \cdot c_{Mut}^2 K_{a,Mut>Mut} \cdot 2 \cdot K - c_{Mut} \cdot c_{Wt} \cdot 2 \cdot K \cdot (2 \cdot K + 2 K_{a,Wt>Wt}) + 2 K_{a,Wt>Wt} \cdot (c_{Wt,total} - 2 c_{Wt}^2 K_{a,Wt>Wt})) \quad (\text{Gleichung 13})$$

mit

$$2 \cdot K = K_{a,Wt>Mut} + K_{a,Mut>Wt}$$

Für die Annahme des unbegrenzten Einsatzes von Wildtyp und Mutante schrumpft die Konzentration der Monomere gegen 0 (Gleichung 1 und 2). Als Konsequenz nehmen alle Bereiche von Gleichung 13, welche freie Monomerkonzentrationen enthalten den Wert 0 ein. Deshalb kann Gleichung 13 bei hohen Enzymkonzentrationen folgendermaßen angenähert werden

$$k_{obs} \approx (k_{cat,Wt>Wt} \cdot c_{Wt,total} \cdot K_{a,Wt>Wt} + k_{cat,Wt>Mut} \cdot c_{Mut,total} \cdot K_{a,Wt>Mut}) / (2 c_{Wt,total} \cdot K_{a,Wt>Wt} + 2 c_{Mut,total} \cdot K + 1) \quad (\text{Gleichung 14})$$

Es ist zu beachten, dass dieses Modell zu jenem mit kompetitierenden Substraten (Cha 1968) ähnlich ist, welches in folgender Form ($K_d = 1/K_a$) für die Annäherungsprozeduren verwendet wurde:

$$k_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat,Wt>Wt}} \cdot c_{\text{Wt,total}} / K_{\text{d,Wt>Wt}} + k_{\text{cat,Wt>Mut}} \cdot c_{\text{Mut,total}} / K^{-1})}{(2 c_{\text{Wt,total}} / K_{\text{d,Wt>Wt}} + c_{\text{Mut,total}} / (2 \cdot K^{-1}) + 1)} \quad (\text{Gleichung 15})$$

Hier muss in Betracht gezogen werden, dass die Fitting-Prozeduren mögliche Unterschiede zwischen $K_{\text{a,Wt>Mut}}$ und $K_{\text{a,Mut>Wt}}$ vernachlässigen.

III.4.5.5 Alternatives Modell

Eine zufällige Anordnung von Kombinationen aus Wildtyp und Mutanten in Hexamer-Einheiten kann durch die binomiale Verteilung beschrieben werden. Die Wahrscheinlichkeit für das Eingliedern von k Mutanten in das Hexamer kann durch folgenden Term ausgedrückt werden

$$P(k) = \binom{6}{k} p^k \cdot (1-p)^{(6-k)}$$

mit $\binom{6}{k} = \frac{6!}{k!(6-k)!}$, dem Binomialkoeffizienten und $p = c_{\text{Mut}} / (c_{\text{Wt}} + c_{\text{Mut}})$, der Wahrscheinlichkeit für die Eingliederung einer mutierten Untereinheit. Für den Fall, dass eine bestimmte Anzahl an mutierten Untereinheiten ($k_{\text{limit}} = 1, 2, \dots$ oder 5 pro Hexamer) in der Lage ist, die Aktivität der verbleibenden Wildtyp-Untereinheiten auf ein basales Niveau, $k_{\text{cat,Wt+Mut}}$, zu reduzieren, läge die beobachtete Rate bei

$$k_{\text{obs}} = \frac{\sum(k < k_{\text{limit}}) k_{\text{cat,Wt}}}{\sum(k < k_{\text{limit}}) \binom{6}{k} \cdot p^k \cdot (1-p)^{(6-k)}} + \frac{\sum(k \geq k_{\text{limit}}) k_{\text{cat,Wt+Mut}}}{\sum(k \geq k_{\text{limit}}) \binom{6}{k} \cdot p^k \cdot (1-p)^{(6-k)}} \quad (\text{Gleichung 16})$$

Die Werte zahlreicher Wildtyp-Mutanten-Mischungen wurden bestimmt und für die Erstellung von Prognosen verwendet.

III.4.6 *Dm* Kinesin-1 Neck Coiled-Coil (*DmK1cc*)

Um den Einfluss des Dimers auf Hexamerisierung und Funktionalität von humanem Spastin zu untersuchen, wurde ein künstliches Dimer durch Fusion der *Neck Coiled-Coil* Komponente von Kinesin-1 (*D. melanogaster*) mit Spastin- $\Delta 227$ und einem flexiblen *Linker* erzeugt. *DmK1* ist ein doppelköpfiges Motorprotein, das sich prozessiv vom Minus- zum Plus-Ende des Mikrotubulus bewegt und dabei seine Fracht transportiert (Landschulz, Johnson et al. 1988; Vale 2003). Die Köpfe sind durch eine doppelhelikale *Coiled-Coil* Sequenz miteinander verbunden. Diese Verbindung muss eine hohe mechanische Stabilität aufweisen und eine Motor-Regulation durch geladene Seitenketten zulassen. Trotz der relativen Steifigkeit von *DmK1cc* hat es eine ähnliche mechanische Stabilität wie der weichere LZ10 (Bornschlogl, Woehlke et al. 2009). Das *DmK1cc* kann in zwei Segmente unterteilt werden. Segment 1 ist hoch konserviert und stellt eine domänenartige Unterstruktur dar. Sie wird durch einen N-terminalen, hydrophoben „Kragen“ und einem stark geladenen EKEK-Motiv charakterisiert. Das ist für eine *Coiled-Coil* Struktur untypisch und wirkt sich vermeintlich destabilisierend auf das Segment 1 aus. Insgesamt wird die Stabilität von Segment 1 nur erreicht, wenn die geringe Stabilität der EKEK-Region durch den hydrophoben „Kragen“ kompensiert wird und eine kooperative Wechselwirkung zeigt. Dabei liefert sie eine beachtliche thermodynamische Stabilität von 14 kBT (kB = Boltzmann-Konstante, T = Temperatur). Segment 2 stellt eine kurze, *Coiled-Coil* ausbildende Sequenz dar.

←segment I→|←segment II→

AEEWKRRYEKEKEKNARLKGKVEKLEIELARC
a d a d a d a d a d



Abbildung III. 34: Sequenz der *Dm* Kinesin1-Neck Coiled-Coil Struktur.

Die C-terminale Hälfte (Segment II) zeigt ein kanonisches „Knob-into-Holes“ Modell, während in Segment I unregelmäßige Aminosäuren auftreten.

(Abbildung modifiziert nach Bornschlogl, Woehlke et al. 2009)

Der gesamte *DmK1cc* agiert trotz der Unterteilung in zwei Segmente als Einheit, die entweder gefaltet oder offen ist. Insgesamt kann *DmK1cc* seine strukturelle Integrität selbst bei großer Krafteinwirkung aufrechterhalten. Durch diese spezielle Eigenschaft und aufgrund der Tatsache, dass das Faltungsverhalten von *DmK1cc* bereits über hochauflösende Kraftspektroskopie ausreichend untersucht worden ist, wurde dieses Konstrukt für die künstliche Kopplung zweier Spastin-Monomere gewählt. Klonierung und Herstellung der *Coiled-Coil* Spastin Bacmid-DNA wurden von Susanne Link realisiert.

III.4.6.1 Vergleich der Verhaltensweisen von *Coiled-Coil* Spastin mit delta227-Spastin

Um die erhaltenen Messwerte des künstlich erzeugten Dimers besser interpretieren zu können, wurden die Daten mit den ATP-Hydrolyseraten von delta227-Spastin verglichen. Für diesen Zweck wurden die erhaltenen Messdaten mit Hilfe der Michaelis-Menten (siehe Gleichung 3) oder der Hill-Gleichung (siehe Gleichung 5) gefittet.

III.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung III. 1: Struktur von Spastin.	63
Abbildung III. 2: Postulierter <i>Severing</i> -Prozess.	67
Abbildung III. 3: Abhängigkeit der Spastin ATPase-Rate von der Mikrotubuli-Konzentration	70
Abbildung III. 4: Sigmoide Abhängigkeit der ATPase-Rate in Abwesenheit von Mikrotubuli	71
Abbildung III. 5: Abhängigkeit der ATPase-Rate von ATP.	72
Abbildung III. 6: Effekt von ATP- γ S.	73
Abbildung III. 7: Inhibition der ATP-Umsatzrate durch ATP- γ S unter Verwendung einer konstanten ATP-Konzentration (0,5 mM).	75
Abbildung III. 8: Inhibition von Wildtyp-Spastin durch die inaktive E442Q-Mutante.	77
Abbildung III. 9: Abhängigkeit der Spastin-Aktivität von der Enzymkonzentration	79
Abbildung III. 10: <i>Severing</i> -Aktivität von Spastin.....	80
Abbildung III. 11: Einfluss der inaktiven E442Q-Mutante auf die <i>Severing</i> -Aktivität.....	81
Abbildung III. 12: Instabilität der Hexamer-Ringstrukturen.	84
Abbildung III. 13: Oligomerisierungsstudien.....	85
Abbildung III. 14: Konstruktion der pGEX6P2-Plasmide.....	86
Abbildung III. 15: Überprüfung der PCR-Produkte.	87
Abbildung III. 16: Aufreinigung von Δ 227-Spastin.....	88
Abbildung III. 17: Flusskammer-Studien.	89
Abbildung III. 18: GFP-Spastin diffundiert am Mikrotubulus entlang.	90
Abbildung III. 19: Lokalisation von GFP-Spastin am Mikrotubulus während des Schneideprozesses.....	92
Abbildung III. 20: Quantitative Analyse des Mikrotubuli- <i>Severing</i> Prozesses.....	93
Abbildung III. 21: Effekt des E-Hooks auf die Bindung von Spastin an Mikrotubuli.....	95
Abbildung III. 22: Bindefrequenz und Interaktionsdauer hängen von der Ionenstärke ab.....	96

Abbildung III. 23: Eine Lysin-Triade ist für die Interaktion mit Mikrotubuli entscheidend.	98
Abbildung III. 24: GFP-Spastin schneidet bevorzugt an Grenzen zwischen GTP- und GDP-Tubulin.	100
Abbildung III. 25: Spastin erzeugt stumpfe Enden an Mikrotubuli.	102
Abbildung III. 26: Die Dynamik von GFP-Spastin hängt vom Nukleotid-Status ab.	103
Abbildung III. 27: <i>Photobleaching</i> und Analyse der Fluoreszenzintensitäten von GFP-Spastin.....	104
Abbildung III. 28: Struktur und Oligomerisierung von Spastin.....	106
Abbildung III. 29: Bestimmung der Spastin-Bindekapazität am Mikrotubulus unter Einfluss verschiedener Nukleotide.	108
Abbildung III. 30: Zusammenfassung der Cosedimentationsmessungen.	109
Abbildung III. 31: Generierte <i>Coiled-Coil</i> Dimere bilden Hexamere, welche zum <i>Severing</i> befähigt sind.....	110
Abbildung III. 32: ATPase-Tests von <i>Coiled-Coil</i> Spastin mit variablen Konzentrationen an ATP und Mikrotubuli.....	111
Abbildung III. 33: Aufbau und Funktionsweise einer analytischen Zentrifuge. .	118
Abbildung III. 34: Sequenz der <i>Dm Kinesin1-Neck Coiled-Coil</i> Struktur.	125

III.6 Literaturverzeichnis

- Adair, G. S., Bock, W. t. c. o. A. V., and H. Field, J. (1925) JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY **63**, 529-545
- Arnal, I. and R. H. Wade (1995). "How does taxol stabilize microtubules?" Curr Biol **5**(8): 900-908.
- Beetz, C., M. Brodhun, et al. (2004). "Identification of nuclear localisation sequences in spastin (SPG4) using a novel Tetra-GFP reporter system." Biochem Biophys Res Commun **318**(4): 1079-1084.
- Blackstone, C. (2012). "Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia." Annu Rev Neurosci **35**: 25-47.
- Bornschlogl, T. and M. Rief (2008). "Single-molecule dynamics of mechanical coiled-coil unzipping." Langmuir **24**(4): 1338-1342.
- Bornschlogl, T., G. Woehlke, et al. (2009). "Single molecule mechanics of the kinesin neck." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(17): 6992-6997.
- Cha, S. (1968). "Kinetics of enzyme reactions with competing alternative substrates." Mol Pharmacol **4**(6): 621-629.
- Charvin, D., C. Cifuentes-Diaz, et al. (2003). "Mutations of SPG4 are responsible for a loss of function of spastin, an abundant neuronal protein localized in the nucleus." Hum Mol Genet **12**(1): 71-78.
- Ciccarelli, F. D., C. Proukakis, et al. (2003). "The identification of a conserved domain in both spartin and spastin, mutated in hereditary spastic paraplegia." Genomics **81**(4): 437-441.
- Claudiani, P., E. Riano, et al. (2005). "Spastin subcellular localization is regulated through usage of different translation start sites and active export from the nucleus." Exp Cell Res **309**(2): 358-369.
- Crippa, F., C. Panzeri, et al. (2006). "Eight novel mutations in SPG4 in a large sample of patients with hereditary spastic paraplegia." Arch Neurol **63**(5): 750-755.
- Demeler, B. (2005). "UltraScan A Comprehensive Data Analysis Software Package for Analytical Ultracentrifugation Experiments in Modern Analytical Ultracentrifugation: Techniques and Methods (Scott, D. J., Harding, S. E., and Rowe, A. J. eds.), Royal Society of Chemistry (UK). pp 210-229
- Errico, A., A. Ballabio, et al. (2002). "Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics." Hum Mol Genet **11**(2): 153-163.
- Evans, K., C. Keller, et al. (2006). "Interaction of two hereditary spastic paraplegia gene products, spastin and atlastin, suggests a common pathway for axonal maintenance." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(28): 10666-10671.
- Evans, K. J., E. R. Gomes, et al. (2005). "Linking axonal degeneration to microtubule remodeling by Spastin-mediated microtubule severing." J Cell Biol **168**(4): 599-606.
- Fersht, A. R. (1984). "Fidelity of DNA replication in vitro." Adv Exp Med Biol **179**: 525-533.
- Fonknechten, N., D. Mavel, et al. (2000). "Spectrum of SPG4 mutations in autosomal dominant spastic paraplegia." Hum Mol Genet **9**(4): 637-644.
- Gieseke, A. (2008). Molekulare Grundlagen der Hereditären Spastischen Paraplegie. Fakultät für Biologie München, Ludwigs-Maximilian-Universität. Diplomarbeit: 83.

- Guex, N., M. C. Peitsch, et al. (2009). "Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: a historical perspective." Electrophoresis **30 Suppl 1**: S162-173.
- Habura, A., I. Tikhonenko, et al. (1999). "Interaction mapping of a dynein heavy chain. Identification of dimerization and intermediate-chain binding domains." J Biol Chem **274**(22): 15447-15453.
- Hartman, J. J., J. Mahr, et al. (1998). "Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit." Cell **93**(2): 277-287.
- Hartman, J. J. and R. D. Vale (1999). "Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin." Science **286**(5440): 782-785.
- Hayes, D. B. and W. F. Stafford (2010). "SEDFVIEW, real-time sedimentation analysis." Macromol Biosci **10**(7): 731-735.
- Hazan, J., N. Fonknechten, et al. (1999). "Spastin, a new AAA protein, is altered in the most frequent form of autosomal dominant spastic paraplegia." Nat Genet **23**(3): 296-303.
- Hazan, J., B. Fontaine, et al. (1994). "Linkage of a new locus for autosomal dominant familial spastic paraplegia to chromosome 2p." Hum Mol Genet **3**(9): 1569-1573.
- Helenius, J., G. Brouhard, et al. (2006). "The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends." Nature **441**(7089): 115-119.
- Hoskins, J. R., S. M. Doyle, et al. (2009). "Coupling ATP utilization to protein remodeling by ClpB, a hexameric AAA+ protein." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(52): 22233-22238.
- Hyman, A. A., D. Chretien, et al. (1995). "Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate." J Cell Biol **128**(1-2): 117-125.
- Lacroix, B., J. van Dijk, et al. (2010). "Tubulin polyglutamylation stimulates spastin-mediated microtubule severing." J Cell Biol **189**(6): 945-954.
- Lakamper, S. and E. Meyhofer (2005). "The E-hook of tubulin interacts with kinesin's head to increase processivity and speed." Biophys J **89**(5): 3223-3234.
- Landschulz, W. H., P. F. Johnson, et al. (1988). "The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins." Science **240**(4860): 1759-1764.
- Mancuso, G. and E. I. Rugarli (2008). "A cryptic promoter in the first exon of the SPG4 gene directs the synthesis of the 60-kDa spastin isoform." BMC Biol **6**: 31.
- Martin, A., T. A. Baker, et al. (2008). "Diverse pore loops of the AAA+ ClpX machine mediate unassisted and adaptor-dependent recognition of ssrA-tagged substrates." Mol Cell **29**(4): 441-450.
- Martin, A., T. A. Baker, et al. (2008). "Protein unfolding by a AAA+ protease is dependent on ATP-hydrolysis rates and substrate energy landscapes." Nat Struct Mol Biol **15**(2): 139-145.
- McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). "Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules." Cell **75**(3): 419-429.
- McNally, K. P., D. Buster, et al. (2002). "Katanin-mediated microtubule severing can be regulated by multiple mechanisms." Cell Motil Cytoskeleton **53**(4): 337-349.

- Pantakani, D. V., L. S. Swapna, et al. (2008). "Spastin oligomerizes into a hexamer and the mutant spastin (E442Q) redistribute the wild-type spastin into filamentous microtubule." *J Neurochem* **106**(2): 613-624.
- Paschal, B. M., R. A. Obar, et al. (1989). "Interaction of brain cytoplasmic dynein and MAP2 with a common sequence at the C terminus of tubulin." *Nature* **342**(6249): 569-572.
- Qiang, L., W. Yu, et al. (2006). "Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin." *J Neurosci* **26**(12): 3120-3129.
- Ramey, V. H., H. W. Wang, et al. (2011). "The Dam1 ring binds to the E-hook of tubulin and diffuses along the microtubule." *Mol Biol Cell* **22**(4): 457-466.
- Roll-Mecak, A. and F. J. McNally (2010). "Microtubule-severing enzymes." *Curr Opin Cell Biol* **22**(1): 96-103.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2005). "The Drosophila homologue of the hereditary spastic paraplegia protein, spastin, severs and disassembles microtubules." *Curr Biol* **15**(7): 650-655.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2008). "Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin." *Nature* **451**(7176): 363-367.
- Salinas, S., R. E. Carazo-Salas, et al. (2005). "Human spastin has multiple microtubule-related functions." *J Neurochem* **95**(5): 1411-1420.
- Segel, I. H. (1975) *Enzyme Kinetics*, 1st ed., Wiley New York
- Sharma, N., J. Bryant, et al. (2007). "Katanin regulates dynamics of microtubules and biogenesis of motile cilia." *J Cell Biol* **178**(6): 1065-1079.
- Sharp, D. J. and J. L. Ross (2012). "Microtubule-severing enzymes at the cutting edge." *J Cell Sci*.
- Solowska, J. M., G. Morfini, et al. (2008). "Quantitative and functional analyses of spastin in the nervous system: implications for hereditary spastic paraplegia." *J Neurosci* **28**(9): 2147-2157.
- Sudo, H. and P. W. Baas (2010). "Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts." *J Neurosci* **30**(21): 7215-7226.
- Svenson, I. K., A. E. Ashley-Koch, et al. (2001). "Identification and expression analysis of spastin gene mutations in hereditary spastic paraplegia." *Am J Hum Genet* **68**(5): 1077-1085.
- Svenson, I. K., M. T. Kloos, et al. (2005). "Subcellular localization of spastin: implications for the pathogenesis of hereditary spastic paraplegia." *Neurogenetics* **6**(3): 135-141.
- Trotta, N., G. Orso, et al. (2004). "The hereditary spastic paraplegia gene, spastin, regulates microtubule stability to modulate synaptic structure and function." *Curr Biol* **14**(13): 1135-1147.
- Vale, R. D. (2003). "The molecular motor toolbox for intracellular transport." *Cell* **112**(4): 467-480.
- Verhey, K. J. and J. Gaertig (2007). "The tubulin code." *Cell Cycle* **6**(17): 2152-2160.
- Werbeck, N. D., S. Schlee, et al. (2008). "Coupling and dynamics of subunits in the hexameric AAA+ chaperone ClpB." *J Mol Biol* **378**(1): 178-190.
- Wharton, S. B., C. J. McDermott, et al. (2003). "The cellular and molecular pathology of the motor system in hereditary spastic paraparesis due to mutation of the spastin gene." *J Neuropathol Exp Neurol* **62**(11): 1166-1177.

- White, S. R., K. J. Evans, et al. (2007). "Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing." J Cell Biol **176**(7): 995-1005.
- Zanic, M., J. H. Stear, et al. (2009). "EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice." PLoS One **4**(10): e7585.

IV Katanin-Projekt

IV.1 Einleitung

IV.1.2 Aufbau und Mechanismus von Katanin

Katanin ist ein Hetero-Dimer, bestehend aus einer 60-kDa Domäne mit katalytischer Aktivität und einer 80-kDa Untereinheit, die regulatorische Aufgaben wahrnimmt (McNally und Vale 1993). Katanin besitzt ein hochkonserviertes 230 Aminosäuren umfassendes AAA-Modul, so dass es zur Klasse der AAA-ATPasen gehört. Katanin stellt, aufgrund seiner Fähigkeit Mikrotubuli schneiden zu können, ein „zelluläres Schwert“ dar. Diese Funktion gab dem Protein den Namen Katanin, abgeleitet vom japanischen Samurai-Schwert „Katana“. Orthologe von *p60*-Katanin sind im Menschen, in *Drosophila*, *C.elegans* und *Arabidopsis* präsent. Ausgehend von TEM-Daten und einem Vergleich mit anderen AAA-Proteinen schlugen Hartman et al. (Hartman, Mahr et al. 1998) ein Modell vor, in dem Katanin in seiner aktiven Form als Oligomer arbeitet. Der Nachweis dafür gelang mittels FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) unter Einsatz markierter Katanin-Untereinheiten. Dafür wurde eine Mischung aus CFP-*p60* und YFP-*p60* als Donor/Akzeptor-Paar verwendet und deren Interaktion durch Detektion des Energietransfers analysiert (Hartman und Vale 1999). Damit *p60*-Katanin ein stabiles Oligomer bilden konnte, haben die Autoren eine hydrolyse-defiziente Mutante von *p60* (E334Q) eingesetzt. Die Studien haben ergeben, dass die gemessene ATPase-Rate bei Mikrotubuli-Konzentrationen zwischen 2 und 10 μM maximal ist, bei höheren MT-Konzentrationen jedoch eine Inhibition erfährt (Hartman, Mahr et al. 1998). Hartman und Vale konnten auch bei der Oligomerisierung und dem Mikrotubuli-*Severing* eine analoge Abhängigkeit der ATPase-Aktivität von der Mikrotubuli-Konzentration feststellen. Werden die Daten zusammengefügt, so kann folgendes Modell (Abbildung IV.1) aufgestellt werden: Mikrotubuli stellen eine Plattform dar, auf der Katanin durch Bindung von ATP oligomerisieren kann. Nachdem sechs Monomere zu einem aktiven Hexamer assembliert sind, kommt es zur Stimulierung der ATPase-Aktivität. Nach der Hydrolyse von ATP und der anschließenden Freisetzung von ADP erfährt das Hexamer eine Konformationsänderung, die zur Destabilisierung von Tubulin-Tubulin-Kontakten innerhalb des Mikrotubulus-Fragments führt. ADP-Katanin hat eine geringere Affinität sowohl für Katanin-Untereinheiten als auch für Tubulin-Dimere. Dies hat einen Zerfall des Komplexes zur Folge, so dass freigesetzte Katanin-Untereinheiten für neue Oligomerisierungsprozesse zur Verfügung stehen (*Recycling*) (Hartman und Vale 1999). Dieses Modell beinhaltet mehrere Regulationsmöglichkeiten: (i) der Nukleotid-Austausch könnte das Beladen von *p60* mit ATP regulieren, (ii) die Zugänglichkeit zu den Mikrotubuli könnte durch die Abkopplung schützender MAPs erfolgen. (iii) Protein-Segmente, die für den Oligomerisierungsvorgang essentiell sind, könnten durch regulatorische Faktoren blockiert werden, (iv) weiterhin könnten andere Faktoren ATP-Hydrolyse und

Severing stimulieren respektive inhibieren. Zudem könnte die ubiquitär auftretende *p80*-Untereinheit eine fundamentale Rolle einnehmen. Die *in vivo* Funktion der *p80*-Untereinheit ist weiterhin nicht vollständig geklärt jedoch nimmt man an, dass sie für *Targeting* und Regulation wichtig ist. Die N-terminale WD40-Domäne von *p80* ist tatsächlich in der Lage ein generiertes *p80*WD40-GFP Fusionsprotein zu Interphasen-Chromosomen zu leiten (Hartman, Mahr et al. 1998). Studien von McNally et al. (McNally, Buster et al. 2002) demonstrierten, dass sowohl *p60* als auch die C-terminale *p80*-Domäne Mikrotubuli *in vitro* binden können. Zudem erhöht die Interaktion der beiden Untereinheiten (*p60* und *p80*) die Affinität des Komplexes zu Mikrotubuli und stimuliert gleichzeitig den Mikrotubuli-*Severing* Prozess.

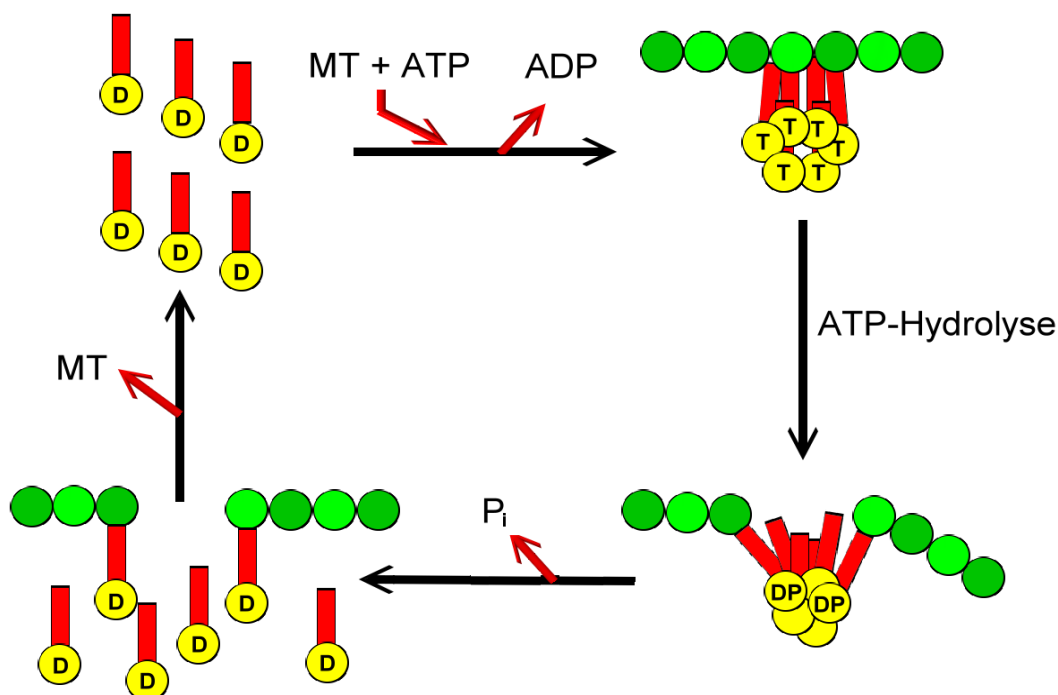


Abbildung IV. 1: Modell für den *Severing*-Vorgang durch Katanin.

Zur Vereinfachung wurde lediglich ein Protofilament des Mikrotubulus dargestellt. T, DP und D repräsentieren den ATP-, ADP + P_i- und ADP-Zustand.

(Abbildung modifiziert nach Hartman und Vale 1999)

IV.1.3 Funktion von Katanin innerhalb der Zelle

IV.1.3.1 Katanin in *Caenorhabditis elegans* Meiose

Die Funktion von Katanin in der M-Phase wurde am sorgfältigsten während der Oocyten-Meiose in *C.elegans* untersucht. Tatsächlich wurden die Gene, die *C.elegans* Katanin *p60* (*mei-1*) und *p80*-Untereinheiten (*mei2*) codieren, in einem *Screening*-Test für embryonale letale Mutanten - somit vor der Entdeckung des Mikrotubuli-*Severing* Vorgangs - identifiziert (Mains, Kemphues et al. 1990). Null-Mutationen in *mei-1* und *mei-2* stören dabei den Aufbau der meiotischen Spindel und führen dazu, dass Mikrotubuli eine unorganisierte Masse

um die Chromosomen aufzubauen (Clandinin und Mains 1993; Clark-Maguire und Mains 1994; Srayko, O'Toole E et al. 2006). In hypomorphen Katanin-Mutanten (in denen Katanin zwar präsent, jedoch weniger aktiv ist) bilden sich bipolare Spindel aus, welche jedoch abnormal elongiert sind und Defekte in Orientierung und Dynamik am Oocyten-Cortex zeigen (McNally, Audhya et al. 2006). Treffenderweise führt der Verlust der Katanin-Aktivität in diesem System zu weniger, jedoch längeren Spindel-Mikrotubuli, was durch folgendes Modell erklärt wird: die durch Katanin herbeigeführten *Severing*-Ereignisse erhöhen die Anzahl und Dichte der Mikrotubuli in der Spindel durch Entstehung zahlreicher kurzer Polymere, die wiederum als Stellen für neues Mikrotubulus-Wachstum fungieren (Roll-Mecak und Vale 2006; Srayko, O'Toole E et al. 2006). Katanin aus *C.elegans* kommt vermehrt an meiotischen Chromosomen und Spindel-Polen vor, was dafür spricht, dass Amplifikation von Mikrotubuli hauptsächlich an diesen spezifischen Orten erfolgt (Clark-Maguire und Mains 1994; Srayko, Buster et al. 2000). Es gibt auch Hinweise darauf, dass Katanin mit γ -Tubulin bei der Herstellung der Spindel-Pole zusammenarbeitet, da Katanin γ -Tubulin Doppelmutanten einen gleichzeitigen Verlust von Mikrotubuli-Polymeren zeigen (McNally, Audhya et al. 2006). Die Funktion von *C.elegans* Katanin während der Meiose ist allerdings nicht auf die Amplifikation der Mikrotubuli begrenzt. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass es den Aufbau der bipolaren Spindel, unabhängig von seiner *Severing*-Aktivität, unterstützt. Für diesen Vorgang scheint eine sekundäre Rolle bei der Bündelung der Mikrotubuli-Filamente entscheidend zu sein (McNally und McNally 2011). *C.elegans* Katanin wird am Ende der Meiose abgebaut und spielt in diesem Organismus bei der Mitose keine Rolle (Lu und Mains 2007). Bei Vertebraten gibt es Hinweise darauf, dass sowohl Katanin als auch ein Katanin-ähnliches Protein am Aufbau der mitotischen Spindel in Vertebraten-Zellen beteiligt sind, allerdings in einem weitaus geringeren Umfang als in der *C.elegans* Meiose (Buster, Zhang et al. 2007; Sonbuchner, Rath et al. 2010).

IV.1.3.2 Katanin im Nervensystem

Eine neuronale Funktion für Katanin wurde erstmals in kultivierten Ratten-Neuronen gezeigt, in denen die Inhibition von Katanin-*p60* einen Überwuchs der Axone umfasste und einen Zuwachs an Zentrosomen-assoziierten Mikrotubuli sowie verlängerte Filamente im Zellkörper und Axon verursachte (Ahmad, Yu et al. 1999). Von diesen Daten ausgehend wurde postuliert, dass Katanin das Axon-Wachstum durch die Freisetzung von Mikrotubuli von den Zentrosomen her stimuliert. Die durch Katanin geschnittenen kurzen Segmente werden entlang der länger ausgeprägten Mikrotubuli zum Axon transportiert, wo sie als Baueinheiten für neue Mikrotubuli fungieren. Betrachtet man den potentiell möglichen zerstörerischen Einfluss eines unkontrollierten *Severing*-Vorgangs innerhalb des Neurons, so ist es nicht überraschend, dass die Funktion von Katanin auf verschiedenen Ebenen stark reguliert wird. Der am besten charakterisierte Regulator ist tau. Tau gehört zu den Axon-spezifischen Mikrotubuli-assoziierten Protei-

nen und schützt den Mikrotubulus vor dem Abbau durch Katanin (Qiang, Yu et al. 2006). Es gibt Daten die belegen, dass Katanin durch Phosphorylierung Mikrotubuli-bindender Domänen innerhalb von tau auf axonalen Mikrotubuli aktiviert wird. Dieser Vorgang resultiert in der MAP-Freisetzung vom Mikrotubulus (Qiang, Yu et al. 2010). Diese Beobachtung führte zu Spekulationen, dass eine falsche Regulierung von Katanin zur Tauopathie beitragen könnte - beispielsweise der Alzheimer-Erkrankung - welche mit einer Hyperphosphorylierung von tau einhergeht (Baas, Karabay et al. 2005). Eine aktuelle Studie zeigt, dass Katanin durch das schützende Neuropeptid (NAP) inhibiert wird, wodurch im Tier-Modell diverse Symptome der Alzheimer-Krankheit reduziert werden konnten (Sudo und Baas 2011). Zusätzlich zu seiner Regulierung durch tau wurde entdeckt, dass Katanin selektiv acetylierte Mikrotubuli angreift, welche hauptsächlich im Axon vorkommen (Sudo und Baas 2010). Der Expressionsgrad von Katanin verändert sich während der neuronalen Entwicklungsphase dramatisch. Während in Phasen des schnellen Axonwachstums maximale Katanin-Produktion erreicht wird, tritt danach ein starker Rückgang auf (Karabay, Yu et al. 2004).

IV.1.3.3 Mikrotubuli-Severing in der Zellmigration

Eine neue Funktion Mikrotubuli-schneidender Enzyme brachten Analysen im Bereich der Zell-Migration hervor. Die Inhibition von Katanin-*p60* führte zur Inhibition der neuronalen Migration (Toyo-Oka, Sasaki et al. 2005), während die Inhibition von Katanin-*p80* die Bewegung von kultivierten Ratten-Epithelzellen verlangsamte (Sudo und Maru 2008). Eine aktuellere Studie zeigt, dass Katanin-*p60* in Metastasen (Prostata-Krebs) anomal exprimiert wird. Zudem führt die Überexpression in den Krebszellen zu einer verstärkten Motilität (Ye, Lee et al. 2012). Es ist möglich, dass Katanin die Zellmotilität dadurch fördert, indem es Mikrotubuli vom Zentrosom freisetzt und deren Transport zur Vorderkante der Zellbewegung begünstigt. Tatsächlich konnte die Freigabe zentrosomaler Mikrotubuli für einige in die Migration involvierten Zelltypen beobachtet werden (Abal, Piel et al. 2002). Einen starken Kontrast stellt die Abreicherung von Katanin-*p60* in *Drosophila* Zellen dar. Dieser Vorgang resultiert in einer deutlichen Zunahme der Motilitätsrate, so dass Katanin auch als negativer Regulator der Zell-Migration fungieren kann. In diesem Fall bindet Katanin an den Zellkortex und führt Depolymerisationen an Mikrotubuli Plus-Enden durch, welche die kortikale Seite einnehmen (Zhang, Grode et al. 2011). Das humane Katanin-ähnliche Protein KATNAL1 zeigt ein ähnliches Bindemuster und hat einen vergleichbaren Einfluss auf die Zell-Migration in Brustkrebs-Zellen (Zhang, Grode et al. 2011). Dadurch bestünde die Möglichkeit, dass das Protein antagonistisch zu Katanin-*p60* arbeitet und der Verlust der gegenseitigen Regulation zur Metastasenbildung führen könnte. Für kortikales Katanin wurde ein Weg für die stimulierende Wirkung auf die Depolymerisation von Mikrotubuli Plus-Enden vorgeschlagen, welcher sehr ähnlich zur Rolle von Kinetochor-Katanin in der Mitose sein dürfte. Durch das Entfernen der stabilisierenden EB1-Schutzkappen von den Plus-Enden der Mikrotubuli wird die Depolymerisation durch Kinesin-13 induziert. Das

Drosophila Kinesin-13 (Klp10A) bindet an polymerisierenden Plus-Enden und fördert die Depolymerisation hauptsächlich am Zellkortex (Mennella, Rogers et al. 2005). Auf welchem Weg *Drosophila* Katanin und humanes KATNAL1 die Bewegungsfähigkeit der Zellen reduziert, ist unbekannt. Dieser Prozess könnte allerdings die Funktion der kleinen GTPase Rac erfordern. Rac wird durch die Polymerisation von Mikrotubuli aktiviert. Katanin könnte durch die Unterdrückung der Mikrotubuli-Polymerisation an der Vorderkante der Zellbewegung Rac lokal inhibieren (Best, Ahmed et al. 1996; Waterman-Storer, Worthylake et al. 1999). Konsistent mit diesem Modell ist die Beobachtung, dass RNAi-induzierte Abreicherung von Katanin sowohl den Umfang als auch die Frequenz des Membran-Überhangs in *Drosophila* S2-Zellen erhöht (Zhang, Grode et al. 2011).

IV.1.3.4 Katanin in höheren Pflanzen

Das *Arabidopsis* Katanin-codierende Gen (ATKN1) wurde ursprünglich in einem *Screening*-Test für Ethyl-Methansulfonat-induzierte Mutationen identifiziert, die eine reduzierte mechanische Stärke des Halms herbeiführen (Burk, Liu et al. 2001). Der Verlust der Halmfestigkeit in ATKN1-Mutanten geht mit einer umfassenden Änderung der Pflanzen-Morphologie einher. Diese pleiotropischen Auswirkungen resultieren aus Defekten in der Zellmorphogenese und Biosynthese der Zellwand, die durch die Störung der Anordnung kortikaler Mikrotubuli verursacht wird. In *Arabidopsis* Wildtyp-Zellen bilden Mikrotubuli parallele Anordnungen unterhalb der Plasmamembran, die unter anderem die Ablagerung von Cellulose kontrollieren. Mutationen in ATKN1, die eine Funktionsstörung zur Folge haben, verzögern die Ausbildung der kortikalen Mikrotubulus Anordnung, während Überexpression von ATKN1 kortikale Mikrotubuli erzeugt. Diese formieren sich zu dichten Bündeln, welche letztendlich depolymerisieren (Burk, Liu et al. 2001; Stoppin-Mellet, Gaillard et al. 2003). Zellanalysen erlaubten einen detaillierten Einblick in die Vorgänge, wie sich die kortikalen Mikrotubuli-Anordnungen in Pflanzenzellen bilden und trugen Katanin eine wichtige Funktion in diesem Prozess zu. Die Studien haben gezeigt, dass die Mehrheit der kortikalen Mikrotubuli in einem Winkel von etwa 40° aus Zweigen bereits existierender Filamente entstanden sind (Chan, Calder et al. 2003; Shaw, Kamyar et al. 2003; Murata, Sonobe et al. 2005). Diese neu formierten Mikrotubuli, die durch die γ -Tubulin Ringkomplexe nukleiert werden, lösen sich dann von der Ursprungsstelle ab und bewegen sich davon weg. Dieser Vorgang wird wahrscheinlich über Filamentbewegungen realisiert. Mutationen in ATKN1 verhindern nahezu vollständig die Prozedur des Ablösens, was die Hypothese nährt, dass diese Bewegungsformen durch Katanin gefördert werden. Dieses Modell wird durch die Beobachtung gestützt, dass GFP-ATKN1 enthaltende Ansammlungen häufig an Stellen detektiert werden, an denen *Severing* erfolgt (Nakamura, Ehrhardt et al. 2010). In diesem System besitzt Katanin eine Doppelfunktion: (i) als Baueinheiten, an denen Mikrotubulus-Wachstum stattfindet und (ii) zur Entfernung der Schutzkappen vom Mikrotubulus Minus-Ende, was in Hinblick auf die Filamentbewegung erforderlich ist.

IV.1.4 Zielsetzung

Obwohl Katanin bereits vor über zwei Dekaden identifiziert wurde, gab es auf biophysikalischer Ebene nur langsame Fortschritte. Ein Hauptgrund dafür liegt in der sehr instabilen Form des exprimierten Enzyms, so dass sich Aufreinigungsprozesse als sehr aufwändig herausstellten. Zurückliegende Studien haben gezeigt, dass Katanin die aus der ATP-Hydrolyse freigesetzte Energie für den *Severing*-Prozess einsetzt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die ATP-Umsatzrate des Enzyms durch Mikrotubuli stimuliert wird (McNally und Vale 1993; Hartman, Mahr et al. 1998). Strukturanalysen, bestehend aus elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *p60* und *p60/p80* (Hartman, Mahr et al. 1998), Gelfiltration und FRET, zeigten, dass Katanin ein kurzlebiges Hexamer in Gegenwart von Mikrotubuli und ATP ausbildet (Hartman und Vale 1999). Zudem konnte demonstriert werden, dass der Nukleotid-Status und das Mikrotubulus-Filament einen wichtigen Einfluss auf den Oligomerisierungsgrad von Katanin haben (Hartman und Vale 1999). Es gibt jedoch noch zahlreiche unbeantwortete Fragen hinsichtlich der Arbeitsweise von Katanin. Deshalb sollte in dieser Arbeit fluoreszenzmarkiertes Katanin hergestellt und mit Hilfe eines TIRF-Mikroskops studiert werden. Katanin konnte aufgrund der nicht zur Verfügung stehenden posttranslationalen Modifikationen und den in *E.coli* Zellen fehlenden Faltungshelfern nicht funktional erhalten werden. Deshalb sollte das Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystem für die Expression von Vollängen-Katanin und seiner Mutante E309Q eingesetzt werden. Mit Hilfe von Einzelmolekülmessungen sollte der Bindevorgang und das Bewegungsmuster des Enzyms analysiert werden. Um Aussagen über den Oligomerisierungsgrad machen zu können, sollten mittels *Photobleaching* und *Cross-Linking* Versuchen potentielle Zwischenstufen stabilisiert und ein Modell für die Assemblierung von Untereinheiten aufgestellt werden. Ein weiteres Ziel lag in der Charakterisierung des Vollängenkonstrukts. Durch den Vergleich mit Katanin-Versionen aus anderen Organismen sollten signifikante Domänen auf ihre jeweilige Funktion hin überprüft werden. Dabei lag der Fokus auf der Bindefähigkeit an Mikrotubuli und auf dem Oligomerisierungsverhalten der einzelnen Domänen. Das Domänen-*Mapping* sollte zur Aufklärung des biochemischen Mechanismus von Katanin herangezogen werden.

IV.2 Ergebnisse – Domänen-Mapping

IV.2.1 Herstellung der Katanin-Konstrukte und Proteinexpression

Die Katanin-codierende Genregion wurde in einem ersten Schritt in den pFastBac™1-Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Amplifikation von GFP-DNA aus dem eGFP-Plasmid. Die Basensequenz von GFP wurde an den N-Terminus von Katanin gekoppelt, so dass ein Fusionsprotein konstruiert wurde, bestehend aus dem grün-fluoreszierenden Protein GFP und Vollängen-Katanin.

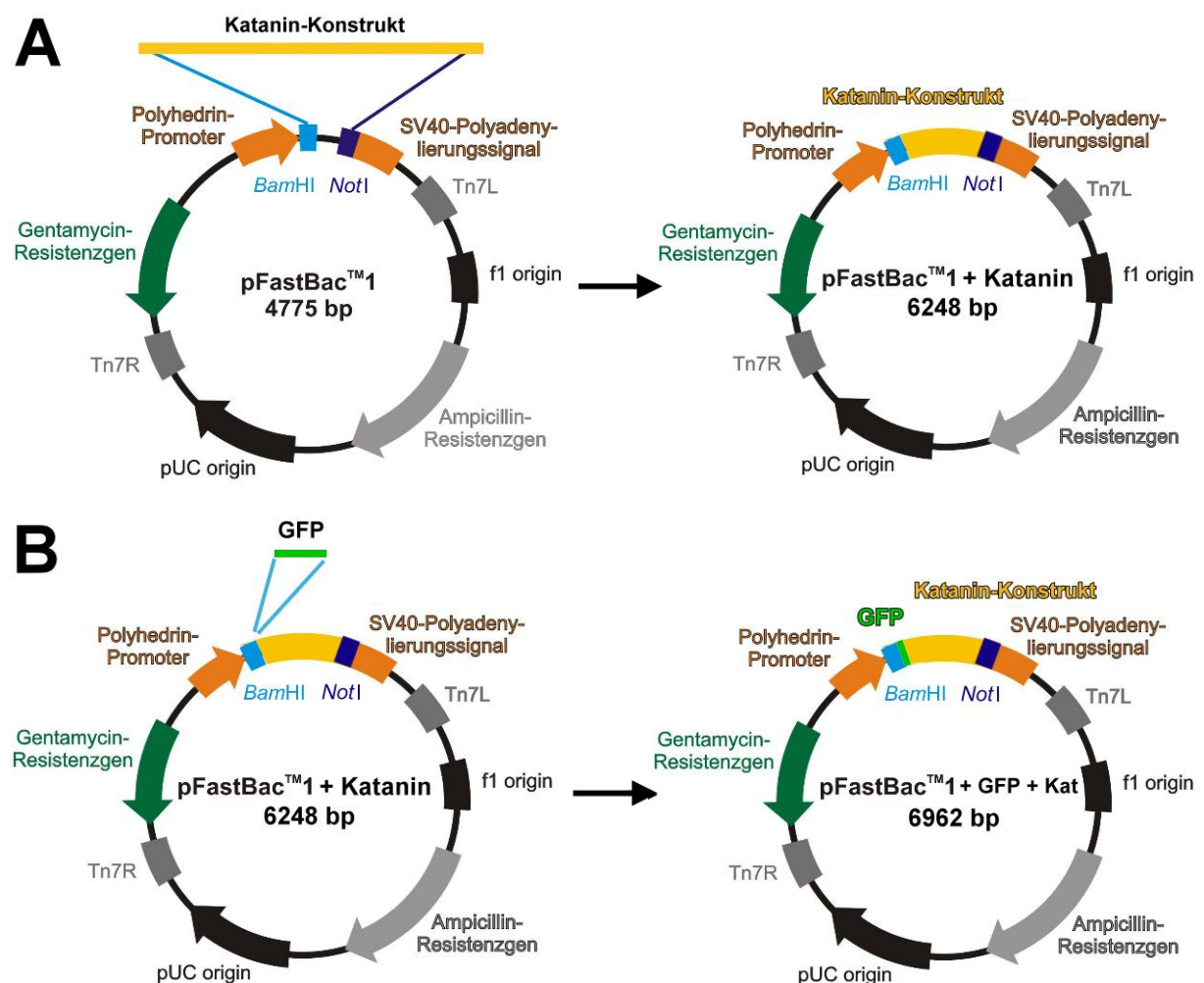


Abbildung IV. 2: Konstruktion der pFastBac™1-Plasmide.

(A) Im ersten Schritt wurde das Katanin-Gen in den pFastBac™1-Vektor kloniert. Vektor-DNA und das Katanin-PCR Produkt wurden mit den beiden Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I geschnitten.

(B) Im zweiten Schritt erfolgte der Transfer des Fluoreszenzmarkers GFP an den N-Terminus von Katanin. Geschnitten wurde mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI.

(Abbildungen modifiziert nach Gieseke 2008).

IV.2.2 Insertion von Katanin und GFP in den pFastBac™1-Vektor

Die PCR-Amplifikation des Katanin- und GFP-Gens resultierte in DNA-Produkten, die eine Größe von 1473 bp respektive 714 bp zeigten. Die Sequenz für Katanin wurde in den pFastBac™1-Vektor kloniert und erfolgreiche Insertion durch Restriktionsverdau überprüft. Die DNA von gepickten Klonen wurde sequenziert um sicher zu gehen, dass das Plasmid das Katanin-Insert mit der entsprechenden Basensequenz ohne mutative Stellen trägt. Das GFP-Gen wurde durch Schneiden mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI in den pFastBac™1-Katanin Vektor kloniert und ebenfalls durch Sequenzanalyse auf Korrektheit überprüft.

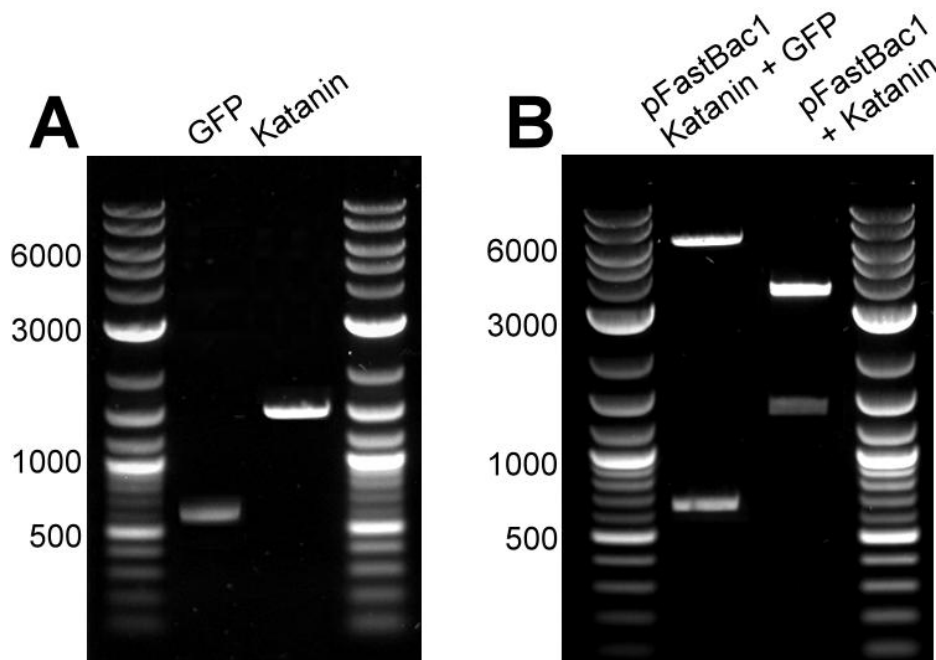


Abbildung IV. 3: Überprüfung der PCR-Produkte.

(A) PCR-Amplifikation der Katanin-DNA sowie des GFP-Gens aus dem eGFP-Plasmid. Die Katanin-Sequenz umfasst 1473 bp, während GFP eine Größe von 714 bp aufweist.

(B) Linke Seite: Testverdau des pFastBac™1-Katanin Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Not*I. Rechte Seite: Restriktionsverdau der pFastBac™1-GFP-Katanin DNA unter Einsatz des Enzyms *Bam*HI. Nach komplettiertem Verdau zeigen die Proben jeweils zwei Banden, welche dem geschnittenen Vektor und dem daraus entfernten *Insert* entsprechen. Der pFastBac™1-Vektor hat eine Größe von 4775 bp, GFP umfasst 714 bp und Katanin weist 1473 bp auf.

IV.2.3 Herstellung des rekombinanten Bacmid-Plasmids

Um Protein in Sf9-Zellen exprimieren zu können, wurden pFastBac™1-Katanin und pFastBac™1-GFP-Katanin Plasmide in den Baculovirus *Shuttle*-Vektor der DH10Bac™ *E.coli*-Zellen transponiert. Die Rekombination der Transfer-Vektoren mit der Bacmid-DNA wird durch eine stellenspezifische Transposition gewährleistet. Erfolgreiche Rekombination konnte durch PCR-Analyse bestätigt werden. Ein Beispiel für eine derartige PCR-Analyse ist in Abbildung IV.4 gezeigt.

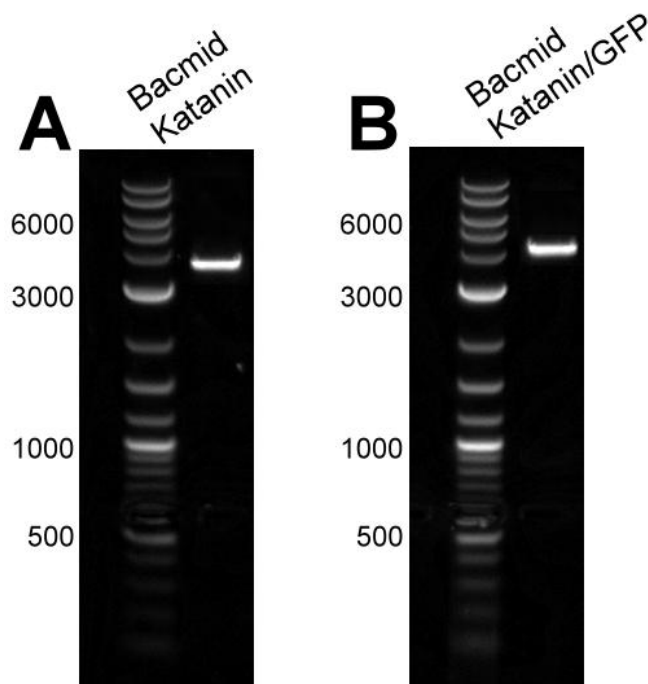


Abbildung IV. 4: PCR-Analyse der Bacmid-DNA.

(A) Die PCR-Analyse der pFastBac™1-Katanin Bacmid-DNA, die das Vollängenkonstrukt von Katanin enthält, wurde mit Hilfe des *Primer*-Paars M13_fw/M13_rev durchgeführt. Die für das PCR-Produkt erwartete Größe liegt bei ≈ 3800 bp.

(B) PCR-Analyse der pFastBac™1-GFP-Katanin Bacmid-DNA wurde ebenfalls mit Hilfe des *Primer*-Paars M13_fw/M13_rev durchgeführt. Die für das PCR-Produkt erwartete Größe liegt bei ≈ 4500 bp.

IV.2.4 Aufreinigung der Katanin-Fusionskonstrukte

Alle Katanin-Konstrukte enthielten einen N-terminalen FLAG®-Tag, so dass für die Proteinaufreinigung eine Affinitätschromatographie unter Einsatz von Anti-FLAG® Säulenmaterial durchgeführt wurde (Abbildung IV.5). Auf dem SDS-Gel zeigen die Elutionsfraktionen Katanin-Protein mit einem Molekulargewicht von 57-kDa. Aufgrund des sehr hohen Reinheitsgrads war der Einsatz zusätzlicher Chromatographie-Verfahren nicht erforderlich und das Protein konnte in dieser Form in Messungen eingesetzt werden.

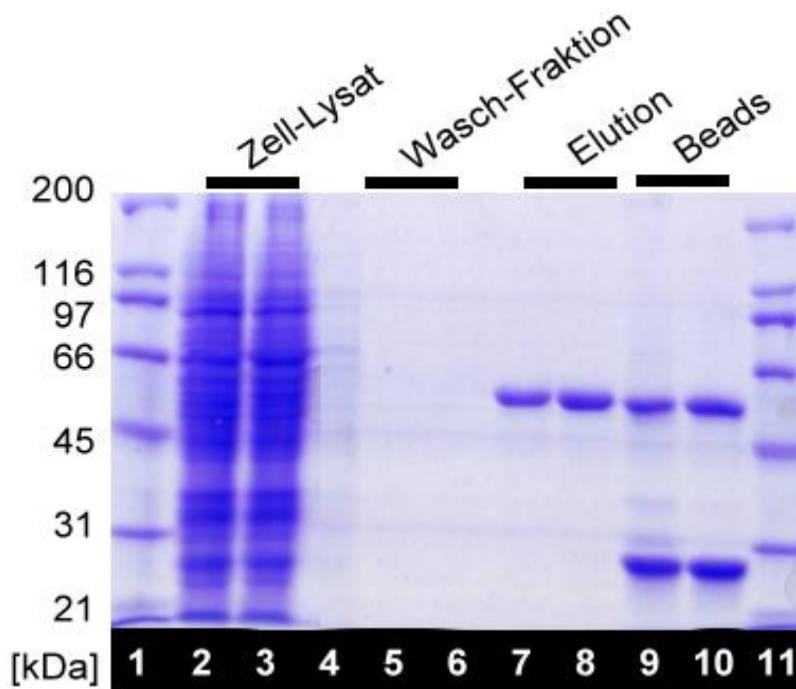


Abbildung IV. 5: Aufreinigung von Katanin.

Spuren 1/11: Marker, Spuren 2/3: Zell-Lysat, Spuren 4-6: Waschschrte, Spuren 7/8: Elution, Spuren 9 /10: Säulenmaterial (12% SDS-Polyacrylamid-Gel).

IV.2.5 Identifikation der Mikrotubuli-bindenden Domäne von humanem Katanin

Um den molekularen Mechanismus von Katanin zu verstehen, wurden im ersten Schritt die Funktionen einzelner Domänen analysiert. Auf der Basis eines Aminosäuresequenzvergleichs von humanem Katanin mit Versionen anderer Organismen (*C. elegans*, Zugangscode S47861; *Chlamydomonas reinhardtii*, Zugangscode AAF12877; *D. melanogaster*, Zugangscode AAF34687; *Strongylocentrotus purpuratus*, Zugangscode AAC15706; *Xenopus laevis*, Zugangscode AAD53310) erfolgte eine Auftrennung in drei signifikante Domänen (Abbildung IV.6). Als DNA-Sequenzdatenbank wurde GenBank (NCBI) herangezogen.

HsMSLLMISENVKLAREYALLGNYSAMVYVYOGVLDOMNKYLYSVKDTYLOQKWOQVWQEIINVEAKHKVDIMKTLESF	76
XlMSLLMISENVKLAREYALLGNYSAMVYVYOGVLDOMNKYLYSVKDTYLOQKWOQVWQEIINMECKHKVDIMSTLEGF	76
SpMSVDEICENTKMGREYALLGNYSLSLVYVYOGVLOQKLLTSVHEPORKHQTIRQELSQOEYEHVKNITKTLNGF	76
Dm	MSITLLRGGKQKTTTCVGMTVMAKTTFEETCENAKLARDMALTCNYDSACIYYEGLQGLLARQLKATADPLRKGKWSMINKQISQEHAKIKAIQRTLQDI	100
AtMVGSSNSLAGLQDHLKLAREYALCESYDTSVIFFDGALAQINKHINTLDDPLARTKMNWVKAMEETEYVVKQDAERRAF	81
CrMGGADVQAITIAVTTGRDCAMSCDYSAGCTYVENAVELITRYVRTLGDPHAIROWSALLKEVQDEHSSVRQCDKEARGM	79
CeMNGDVQSVIRGYLERAQVAKTMSDAERWNEAGDLLRQLMTDVKSKCISASNRDEHDARNTFLRALLEANLKLVOQNVREDDEL	82
<hr/>		
Hs	KLDSTP.....LKAAQH.....DLPASEGEVMSHPV.....VERRPSP.....GPRKRQSSQYSDPKS.....HGNRPSTT	133
Xl	KLDSPP.....VKTTQH.....EFPSHDGEVMSLPV.....VERRPSP.....GPRKRQSVQCNDNKS.....HNNRFSA	133
Sp	KSEPAAP.....EPAPNHRAAPFHHQHAAPAAAEPAARDPDPVPPPTP.....VDHRPSPYQ.....RAARKDPPRRSEPSK.....PANRAGN	153
Dm	SLDLQSTKFAHKLRLHQLESEESTSKDPSAWFKDPDDIWTTPPKDPDVGPKKPPPTTQAVGRRRAANNRRRTTATQNSRPSSTIQS.....TARNGPAS	195
At	KEAPTGRR.....AASPPINTKSSVFQPLDEYPTSSGGGPMDDDPVWRPPTTR.....DVTSTRRPARAG...QTGTRKSPQDGAWARG.....PTTRTGPA	164
Cr	RVYDSVAR..SNSYPEMNDPRGSAAYDDGYRQPIVVCNHSQEDDPMVWRPPTTRGEGRSQAPARAGAPPARRASSQDDNKLPSWANNNGGGGPPARGNAA	177
Ce	HEAMTRQS.....GSPEEPADPDVSKRSE.....PLPSSSKFGATKKG.....VGAAGPRP	129
<hr/>		
Hs	VR.VHRSQAQNVHNRDGA...VRCREKKEQNKGREEKNKSPAA.....VTEPETNKFDST.GYDKDLVEALERDIISQNP..NVRWDD	210
Xl	AKGNLPSARNANNVMKMP...VRAREKKD...ALIKNKSSAD.....VSETEVKRFDGS.GYDKDLIEALERDIISQNP..NIRWDD	207
Sp	DRGGRGPPDRRGDARSGGGGRGGARGSDKDKNRGGKSDKDKKAPS.....GEEGDEKKFDPA.GYDKDLVENLERDIVQRNP..NVHWAD	235
Dm	TRNSRNSTSATAPSGGARTNTRAGGRKLSSTNNEARDDSTAGNNGGAAGDGENGDVQAAQEEERKFQPNNHIEAELVDILERDILQKDE..KVRWSD	294
At	SRGGRGATSKSTAGARSS...TAGKKAASKSNAKESMNGDAE.....DGKSKRGLYEGP...DEDLAAMLERDVLDDST..SVKWD	240
Cr	GPSTRGASAPRRPTGNAPAGNAAGGSYDRPWRQNMQKQGAAGPGGKPGDKGS.....AGEKAKQVSGP...DOELAAMLERDIVDQGT..GVRWDD	266
Ce	REISKSTSSMSTNPADVKP.....ANPTQGIPL.....QNSAGDSFDAS..AYDAYIVQAVRGTMATNTENTMSLDD	194
<hr/>		
Hs	IADLVEAKRLKEAVVLPWMPEFFKCHRRPFWKGVLMVGPPEGTGKTLARAVATECKTTFNIVSSSTLTSKYRGSEKIVRLLFEMARFYSPATIFIDEI	310
Xl	IADLEBAKRLKEAVVLPWMPEFFKCHRRPFWKGVLMVGPPEGTGKTLARAVATECKTTFNIVSSSTLTSKYRGSEKIVRLLFEMARFYAPITIFIDEI	307
Sp	IAGLTEAKRLLEEAVVLPWMPEFFKCHRRPFWKGVLMVGPPEGTGKTLARAVATECGTTFNIVSSASLTSKYHGSEKIVRLLFEMARFYAPSTIFIDEI	335
Dm	IADLHDAKRLLEEAVVLPMLMPDYFKCHRRPFWKGVLMVGPPEGTGKTLARAVATECGTTFNIVSSATLTSKYRGSEKIVRLLFEMARFYAPSTIFIDEI	394
At	VAGLSEAKRLLEEAVVLPWMPEYFQCHRRPFWKGVLMVGPPEGTGKTLARAVATECGTTFNIVSSATLASKWRGSEBMRVRCFLFEMARFYAPSTIFIDEI	340
Cr	IAGLEBAKRVINEALVLPIMPEFFKCHRRPFWKGVLLFPPGTGKTLARAAATETSCTFNIVSSATLASKYRGSEBMRVRLFEMARDLAPSMIFIDEV	366
Ce	IIGMDVKRQVLEAVVLPVPEFFQCHRRPFWKAMVLAGPEGTGKTLARATASESSSTFTVSSDLSKWRGSEKIVRLLFEMARFYAPSIIFIDEI	294
<hr/>		
Hs	DSICSRGTSSEHEASRRVKAELVLDVGDVGGTSENDDPSK.....VVMVLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPSARGRELLRISLRELELAD	402
Xl	DSICSRGTSSEHEASRRVKAELVLDVGDVGGASENEDPSK.....VVMVLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPSARGRELLRINLKELELAD	399
Sp	DSICSRGTSSEHEASRRVKAELVLDVGDVSGPSAGEESSK.....VVMVLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPEIDGREQLRINLKEVPLAD	427
Dm	DSLCSRRGSESEHEASRRVKAELVLDVGDVAR...EEQAK.....VVMVLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPSDEGREALLKINLREVKVD	482
At	DSLCSRRGSGSEHEASRRVKAELVLDVGDVSNATNEDGSRK.....VVMVLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPDFESRKALININLRTVEVAS	433
Cr	DSLCSRRGTAMEHEASRRVKAELVLDVGDVHGSEKDKPEGPDGPPAPKIVFLAATNFPWDIDEALRRRLEKRIYIPLPGQACRLQLKINLRDVAVAP	466
Ce	DLLGGRCNSGSEHEASRRVKAELVLDVGDSONKFDSSR.....VFLAATNIPWELIDEALRRRLEKRIYIPLDIDARKKLEKSMEGTPKSD	382
<hr/>		
Hs	DVDLASTEINMEGYSGADITNVCRDASLMAMRRRIEGLTPEEIR.NLSKEEMHM...PTTMEDEFMALKKVKSVSAAADIERYEKMIFFPGSC	491
Xl	DVNIECTEINMDCYSGADITNVCRDASLMAMRRRIEGLTPEEIR.NLSRDDMHM...PTTMEDEFMALKKVKSVSASDIEKYEKMIFFPG..	486
Sp	DIDLEKSTAEKMDGYSGADITNVCRDASMMAMRRRIEGLRPEEIR.HIPKEELNQ...PSTPADFLALQKVKSVGKEDLVKYMAWMEBFGSV	516
Dm	SVDLTYVANELKGYSGADITNVCREASMMMRRIAGLTPEQIR.OLATEEVDL...PVSNKDFNEAMSRCNKSVSRADLDKYEKWREBFGSS	571
At	DVNLEDVARRTEGYSGLDITNVCRDASMMMRRIAGLTPEEIR.NMSKDDISND..PVMCDEBEARKVQPSVSSSDIEKHEKMLSEFGSA	523
Cr	DVNLEAVAGQMDGYSGADITNVCRDASMMMRRLVAGKTPEEIK.ALREAGMTGGQEPITSDDFREALRKINPSVKEDIKRHEEMLSEVFGST	558
Ce	EINYDDLAARTEGYSGADIVVSLCRTAAINLVRRYFRYDTKSLRGELTAAEMESLKAELVRNIDEAALQAVSVPAGPDTMLCKEWCDSFGAM	475

Abbildung IV. 6: Vergleich der Aminosäuren bekannter Katanin-*p60* Konstrukte.

X. laevis (Xl), *S. purpuratus* (Sp), *D. melanogaster* (Dm), *A. thaliana* (At), *C. reinhardtii* (Cr) und *C. elegans* (Ce). Identische und ähnliche Aminosäuren sind durch einen schwarzen respektive grauen Hintergrund hervorgehoben. Striche zwischen Aminosäuren deuten Lücken an. Die Bindedomäne *Kat2* ist durch einen gelben, die AAA-Domäne (*Kat3*) durch einen grauen Balken hervorgehoben.

Die erste Domäne mit der Bezeichnung *Kat1* umfasst die Aminosäuren 1-55. Dieser Abschnitt hat einen hohen Konservierungsgrad zu anderen Katanin-*p60* Untereinheiten. *Kat1* weist dabei eine 60%ige Sequenzhomologie zu Katanin aus *A. thaliana*, *X. laevis*, *S. purpuratus* und *D. melanogaster* auf. Domäne *Kat2* (AS 56-181) umfasst ein Zwischenareal ohne signifikante Ähnlichkeit zu Katanin anderer Organismen. Die Region *Kat3* repräsentiert eine lange C-terminale ATPase-Domäne, die unter allen aufgelisteten *p60*-Einheiten hochkonserviert ist (80%ige Homologie zu *C. elegans*, *D. melanogaster* und *X. laevis* Aminosäuresequenzen). Einzelne Domänen (*Kat1*, *Kat2* und *Kat3*) wurden als Fusionsproteine in Kombination mit einem FLAG®-Tag hergestellt. Chimären mit den Kombinationen *Kat12*, *Kat13* sowie *Kat23* wurden ebenfalls im SF9-Insektenzellsystem exprimiert.

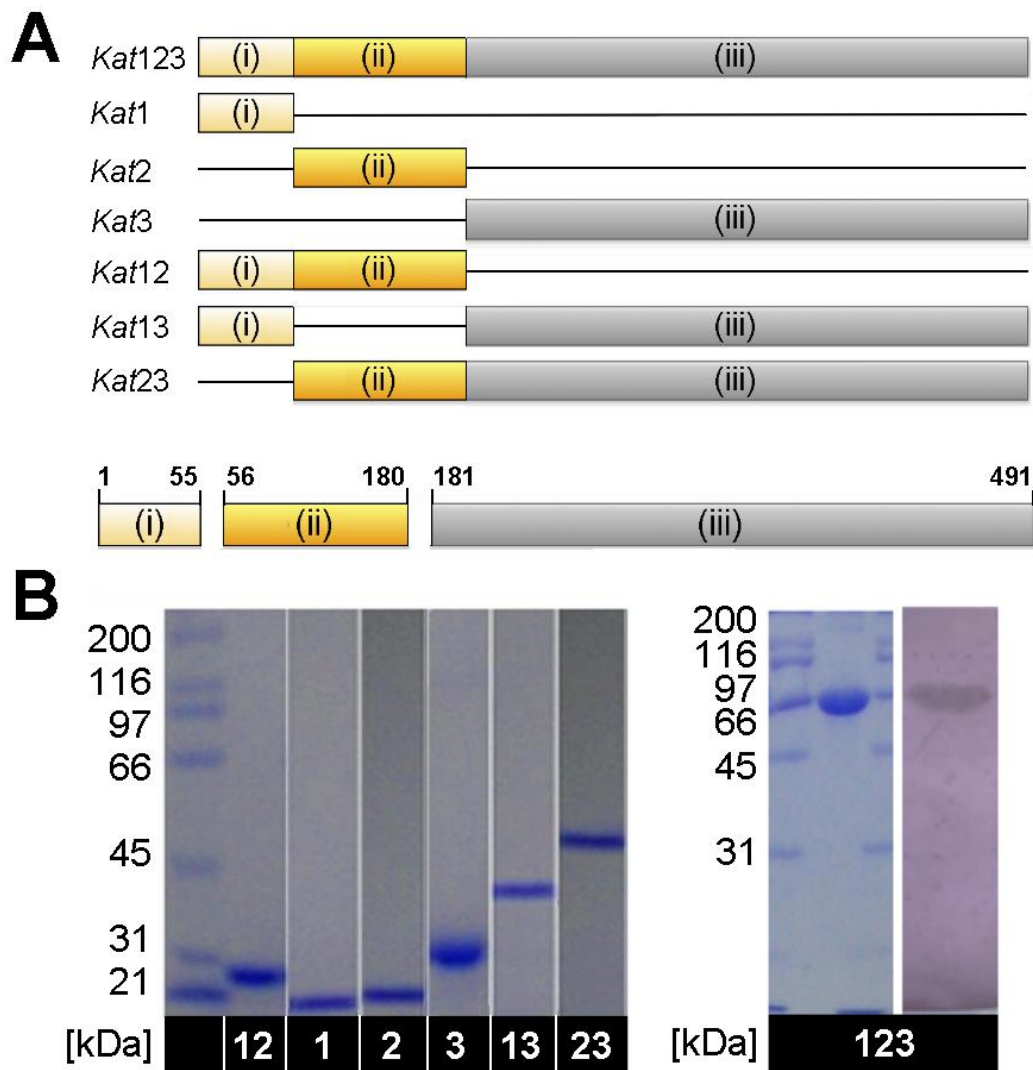


Abbildung IV. 7: Verwendete Katanin-Konstrukte.

(A) Diagramm der generierten Konstrukte, bestehend aus Kombinationen von Domäne 1 (AS 1-55), Domäne 2 (AS 56-180) und Domäne 3 (AS 181-491).

(B) Dokumentation der aufgereinigten *Kat*-Konstrukte auf einem SDS-Gel. Von links nach rechts: *Kat12*, *Kat1*, *Kat2*, *Kat3*, *Kat13* und *Kat23*. Das rechte Gel zeigt das gereinigte Volllängenkonstrukt *Kat123* mit einer Größe von 57-kDa. Um die Spezifität zu überprüfen, wurde ein Western-Blot unter Einsatz des Anti-FLAG® Antikörpers durchgeführt.

Um die Bindedomäne von humanem Katanin zu identifizieren, wurden Cosedimentationsmessungen durchgeführt. Dabei wurden die hergestellten Katanin-Konstrukte in Gegenwart von Taxol-stabilisierten Mikrotubuli inkubiert. Die Analyse der Überstand- und Pellet-Fraktionen ergab, dass die Domänen-Kombinationen *Kat12* und *Kat23* sowie die Einzeldomäne *Kat2* mit Mikrotubuli cosedimentieren können. Weder *Kat1* noch die C-terminale ATPase-Domäne (*Kat3*) sowie ihr Kombinationsprodukt *Kat13* konnten mit Mikrotubuli interagieren. Diese Resultate zeigen, dass die Bindedomäne von Katanin im N-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert ist und die Aminosäuren 56-180 umfasst. Dagegen scheint die ATPase-Domäne am C-Terminus keinen Einfluss auf die Interaktion mit Mikrotubuli zu haben. Um die Dissoziationskonstanten der MT-bindenden Konstrukte *Kat12* und *Kat2* bestimmen zu können, wurden

Cosedimentationsexperimente mit unterschiedlichen Konzentrationen an Tubulin-Dimeren durchgeführt. Die Konzentration variierte dabei zwischen 0 und 10 μM mit den Zwischenstufen 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 und 4 μM . Dagegen wurde für alle Messungen eine konstante Katanin-Konzentration eingesetzt, die bei 1 μM lag. In Abbildung IV.8B wurde der Anteil an gebundenen Katanin-Konstrukten gegen die Tubulin-Konzentration aufgetragen. Aus den erhaltenen Daten konnte eine gemittelte K_D von 0,32 μM für *Kat12* und 0,30 μM für *Kat2* bestimmt werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Katanin mittels Domäne *Kat2* an Mikrotubuli bindet. Interessanterweise sind *Kat1* und die AAA-Domäne nicht am Mikrotubuli-Bindeprozess beteiligt.

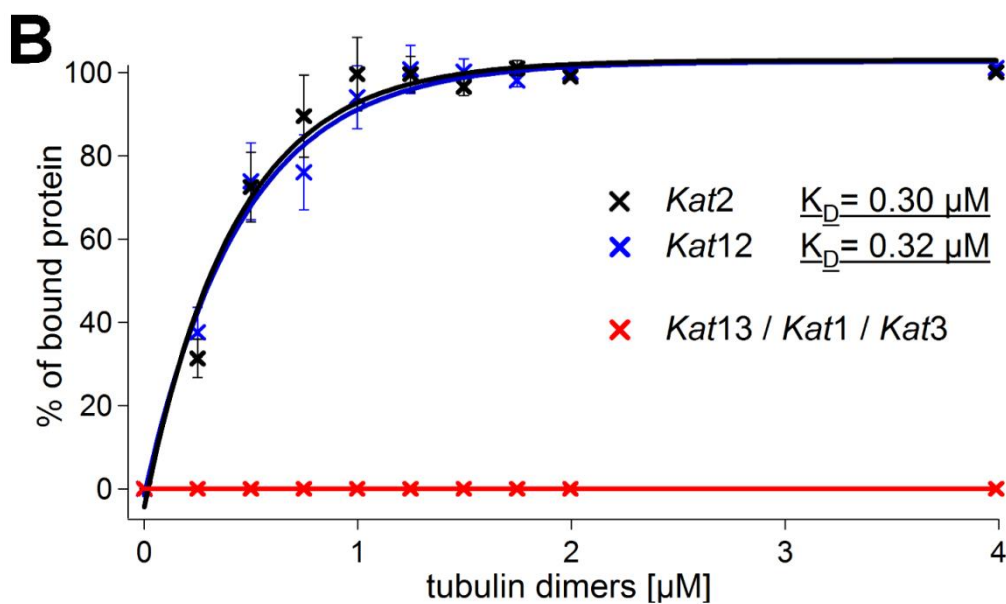
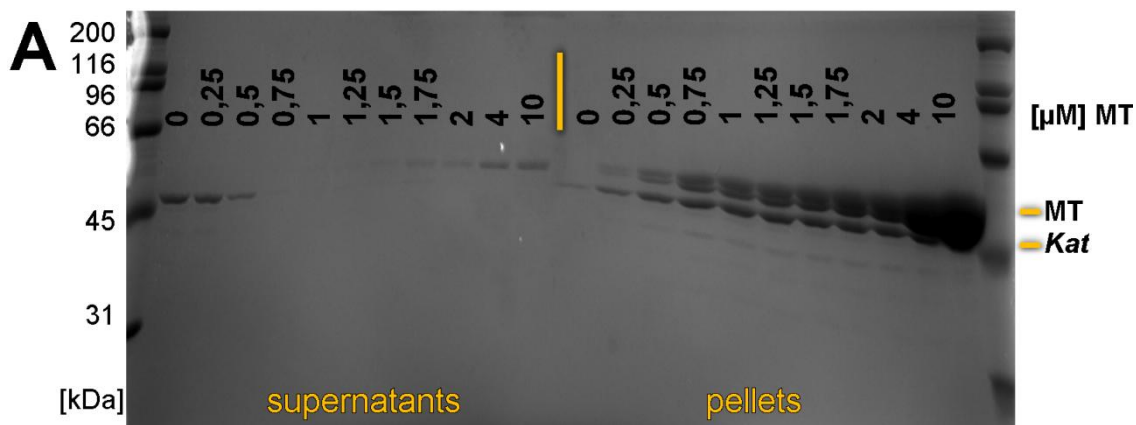


Abbildung IV. 8: Cosedimentationsanalysen mit den hergestellten *Kat*-Konstrukten.

(A) Repräsentatives Gelbild eines Cosedimentationsexperiments mit den diversen Katanin-Domänen. Die Tubulin-Konzentration variierte von 0 bis 10 μM mit den Zwischenstufen 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25, 1,5, 1,75, 2 und 4 μM . Die Konzentration der eingesetzten Katanin-Proteine war konstant und lag bei 1 μM .

(B) Bestimmung der Dissoziationskonstanten (K_D) der Mikrotubuli-bindenden Konstrukte. Der Graph zeigt einen Plot des prozentualen Anteils an gebundenem *Kat*-Konstrukt gegen die Konzentration an Tubulin-Dimeren.

IV.2.6 Oligomerisierung der generierten *Kat*-Konstrukte

Um herauszufinden, ob das aufgereinigte Volllängenkonstrukt *Kat123* in der Lage ist Oligomere auszubilden, wurde die Struktur von Katanin auf der Ebene der Elektronenmikroskopie untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Walker B EQ-Mutante in Gegenwart von ATP Ringstrukturen mit einem Durchmesser von etwa 12 bis 15 nm formt (Hartman und Vale 1999). Im Zuge dieser Arbeit konnten besser aufgelöste EM-Aufnahmen an der E309Q-Mutante angefertigt werden, die zeigen, dass die Ringe aus sechs Untereinheiten bestehen. Ausgehend von analysierten EM-Bildern können einzelne Monomere innerhalb der Ringstruktur registriert werden (Abbildung IV.9). Eine genaue Strukturanalyse der Ringe erfolgt unter Punkt IV.3.9.

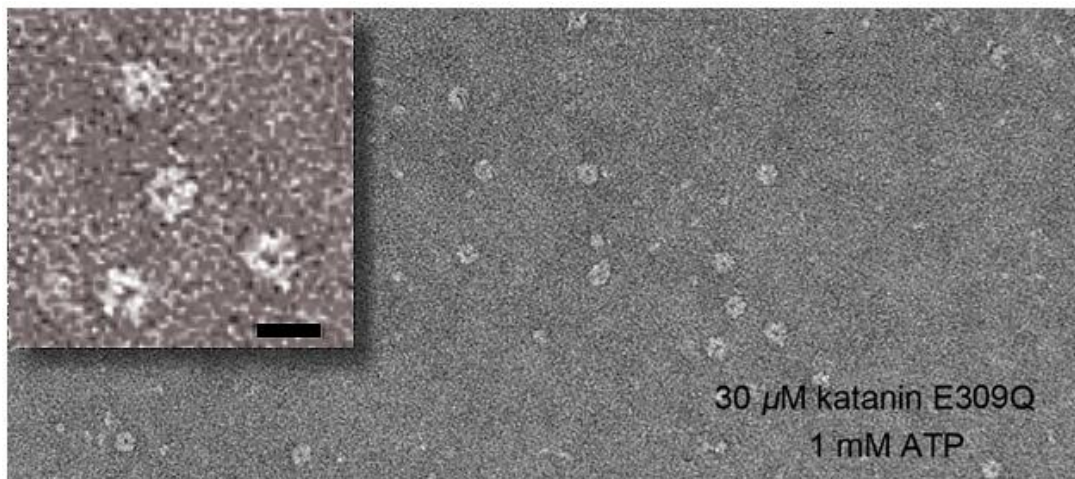


Abbildung IV. 9: Struktur von humanem Katanin E309Q.

EM-Aufnahme von E309Q-Volllängenkatanin in Gegenwart von 1 mM ATP. Katanin ist in der Lage, Ringstrukturen zu bilden, deren Durchmesser zwischen 12 und 15 nm beträgt. In das Bild eingefügt ist eine 3-fache Vergrößerung der detektierten Ringstrukturen. Maßstab Großbild = 100 nm, Maßstab Kleinbild = 15 nm.

Um Domänen identifizieren zu können, die in den Oligomerisierungsprozess involviert sind, wurden die einzelnen Konstrukte auf ihren Oligomerisierungsgrad hin untersucht. In einem ersten Schritt wurden die Molekülmassen der Domänen mittels Gelfiltration analytisch bestimmt. Die N-terminale *Kat1* und die ATPase-Domäne (*Kat3*) traten jeweils als Monomere auf. Im Gegensatz dazu wurden die drei Konstrukte *Kat12*, *Kat2* und *Kat23*, die das Mikrotubulus-Bindeareal enthalten, in Form höherer Strukturen von der Säule eluiert (Abbildung IV.10).

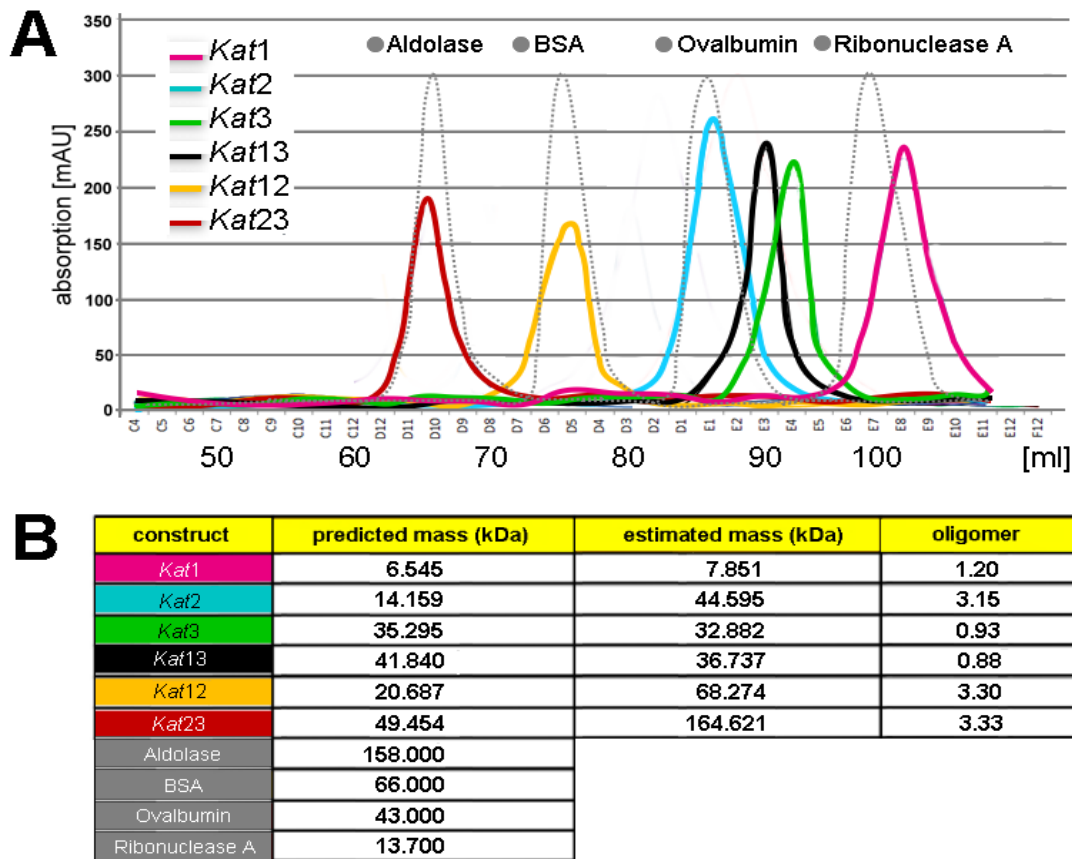


Abbildung IV. 10: Überprüfung der Oligomerisierung durch analytische Gelfiltration.

(A) Gelfiltrationsläufe wurden mit allen erstellten Konstrukten durchgeführt. Mit Hilfe einer aus Standardproteinen erstellten Eichkurve konnte das Molekulargewicht der applizierten Proben ermittelt werden.

(B) Die berechneten Daten sind in einer Tabelle zusammengefasst. Konstrukte mit vorhandener Bindedomäne (*Kat2*) sind in der Lage, höhere Strukturen (Trimere) auszubilden, während Konstrukte ohne Bindedomäne als Monomere vorliegen.

Neben den Gelfiltrationsanalysen wurden in einem weiteren Schritt *Cross-Linking* Experimente durchgeführt. Dabei wurden $0,6 \mu\text{M}$ der entsprechenden *Kat*-Proteine mit $20 \mu\text{M}$ EDAC/NHS versetzt und die Reaktionen nach 15 Minuten durch Hinzufügen von 9 mM Glycin abgestoppt. Die Inkubationsansätze von *Kat12*, *Kat2* und *Kat23* mit dem *Cross-Linker* zeigen auf dem SDS-Gel jeweils eine Proteinbande, deren Molekulargewicht das Dreifache eines Monomers entspricht. Im Fall von *Kat12* kann eine Bande im Bereich von 60-kDa registriert werden (Monomer = 19-kDa), hinsichtlich des Konstrukts *Kat2* erscheint eine ausgeprägte Proteinbande im Größenbereich von 40-kDa (Monomer = 13-kDa) und das gekoppelte *Kat23*-Produkt weist ein Molekulargewicht im Bereich von 150-kDa auf (Abbildung IV.11). Dies ist ein Indikator dafür, dass die Bindedomäne höhere Formen, höchstwahrscheinlich Trimere ausbilden kann. Keine der anderen analysierten Konstrukte, denen die *Kat2*-Bindedomäne fehlte, konnten sich zu höheren Strukturen formieren. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Resultate, dass Katanin in der Lage ist, Ringstrukturen auszubilden und dass die identifizierte Mikrotubuli-Bindedomäne (*Kat2*) in diesen Oligomerisierungsvorgang involviert ist.

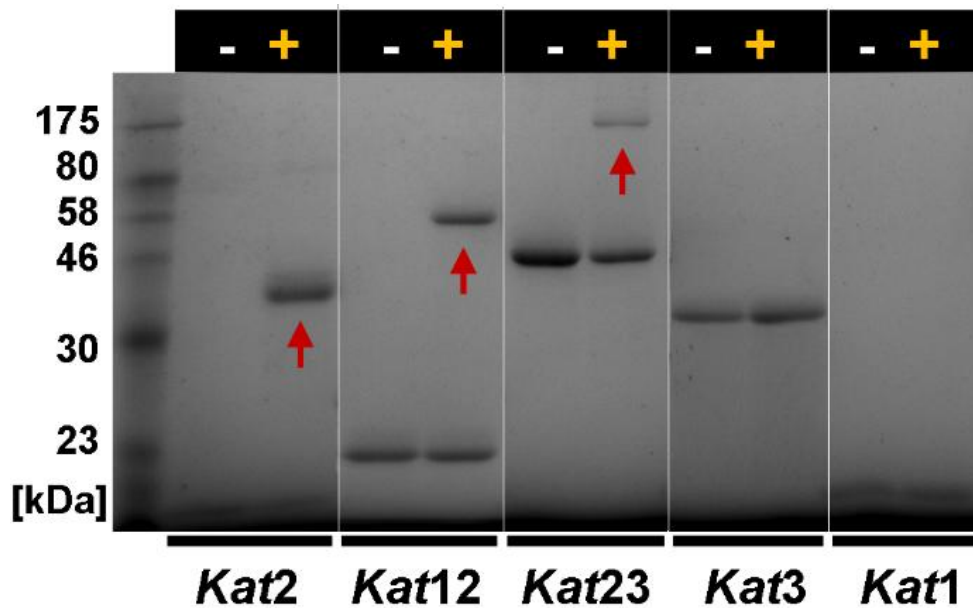


Abbildung IV. 11: Oligomerisierung der *Kat*-Konstrukte.

Cross-Linking Analyse: *Kat1*, *Kat2*, *Kat3*, *Kat12* und *Kat23* wurden entweder in Abwesenheit (-) oder in Anwesenheit (+) des *Cross-Linkers* EDAC inkubiert. Die Ansätze wurden auf SDS-Gelen analysiert. Rote Pfeile zeigen höhere Strukturen, die spezifisch durch den *Cross-Linker* entstanden sind. In der Studie wurden jeweils 0,6 μM *Kat*-Protein mit 20 μM EDAC/NHS versetzt.

IV.2.7 ATPase-Raten und Mikrotubuli-Severing Aktivität der *Kat*-Konstrukte

Mit Hilfe gekoppelter enzymatischer Tests in Kombination mit mikroskopischen *Severing*-Messungen konnten sowohl die ATP-Umsatzraten als auch das *Severing*-Verhalten der generierten Domänen-Proteine untersucht werden. Von den eingesetzten Proteinen konnten nur solche ATP hydrolysieren, welche die katalytisch aktive Domäne *Kat3* enthielten. Zu diesen Konstrukten gehörten *Kat13*, *Kat23* und *Kat3* selbst. Konstrukte (*Kat12*, *Kat1* und *Kat2*) ohne AAA-Domäne (*Kat3*) zeigten im gekoppelten enzymatischen Test keine messbaren Umsatzraten. Die Absorptionsabnahme mit der Zeit, ein Indikator für ATP-Hydrolyseaktivität, zeigt, dass *Kat23* eine basale Aktivität aufweist, die in Gegenwart von 2,5 μM Tubulin eine 7-fache Stimulierung erfährt. Die Konstrukte *Kat13* und *Kat3* weisen geringe ATPase-Aktivitäten auf, die aufgrund der fehlenden Bindedomäne nicht durch Mikrotubuli stimuliert werden können (Abbildung IV.12A). Diese Ergebnisse unterstützen die aus Cosedimentationsanalysen erhaltenen Daten in der Hinsicht, dass die ATPase-Domäne alleine nicht in der Lage ist, eine Interaktion mit dem Mikrotubulus einzugehen. Mit Hilfe mikroskopischer Experimente konnte eine Aussage über die *Severing*-Aktivität der hergestellten Domänen gemacht werden. Fluoreszenzmikroskopische Studien zeigten, dass *Kat23* Mikrotubuli schneiden kann. Keine der anderen Konstrukte, denen entweder die katalytische oder die für die Bindung erforderliche *Kat2*-Domäne fehlten, konnten Mikrotubuli abbauen (Abbildung IV. 12B).

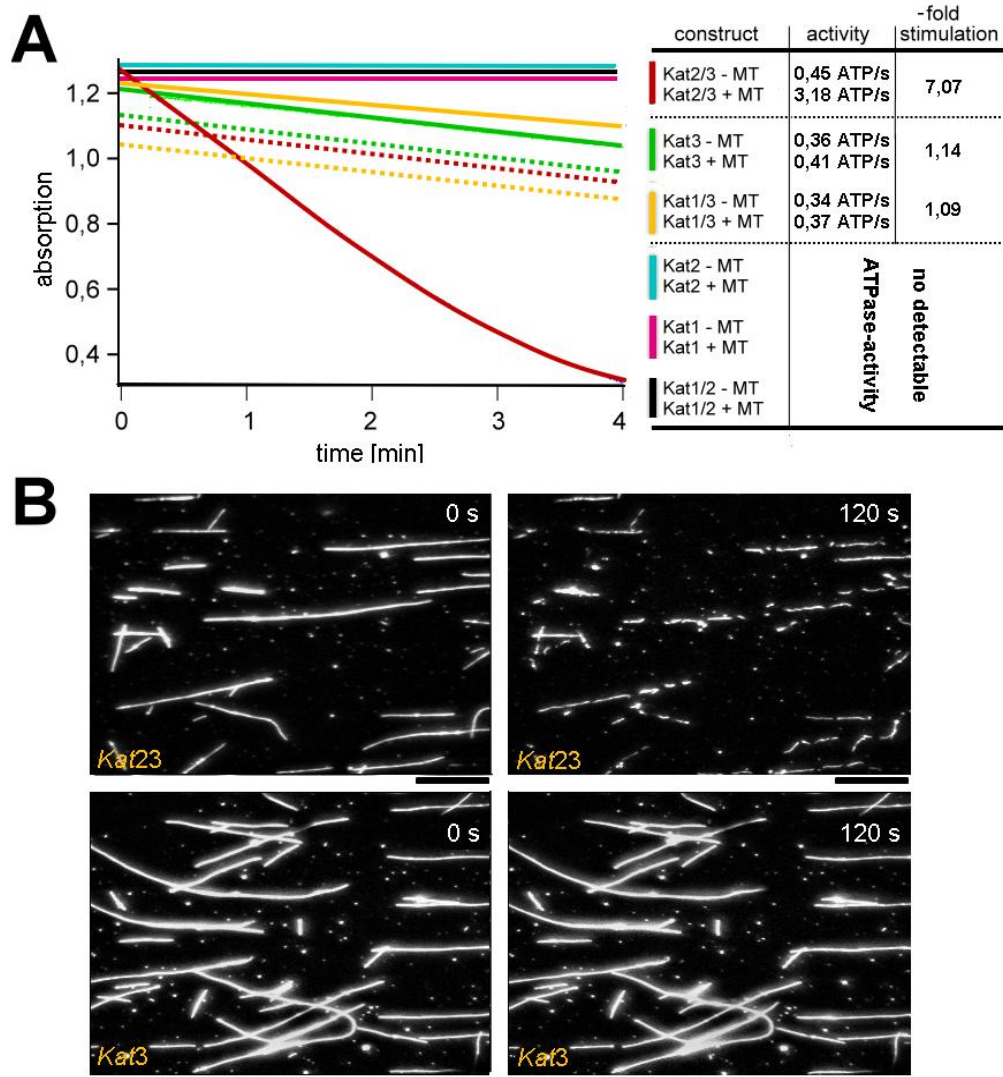


Abbildung IV. 12: ATPase-Raten und Mikrotubuli-Severing Aktivität der generierten Katanin-Konstrukte.

(A) ATPase-Aktivität von jeweils $0,2 \mu\text{M}$ *Kat1*, *Kat2*, *Kat3*, *Kat12*, *Kat23* und *Kat13* wurde über die Absorptionsabnahme bei 340 nm in Abwesenheit oder in Gegenwart von $2 \mu\text{M}$ Tubulin-Dimeren gemessen. *Kat23* weist eine basale Aktivität auf, die eine 7-fache Stimulierung durch Mikrotubuli erfährt. Die Konstrukte *Kat3* und *Kat13* zeigen jeweils eine geringe ATPase-Rate, die nicht durch Mikrotubuli stimuliert wird. Gestrichelte Linien zeigen Messungen ohne, durchgezogene Linien ATPase-Kurven in Gegenwart von Mikrotubuli.

(B) *Severing* von ALEXA555-markierten, mit Taxol stabilisierten Mikrotubuli durch *Kat23*. 2 Minuten nach dem Start der Reaktion (ATP-Zugabe) wurden die meisten Mikrotubuli geschnitten. Konstrukte, denen entweder *Kat2* oder *Kat3* fehlten, waren dagegen nicht in der Lage, *Severing* auszuüben. Maßstab = $5 \mu\text{m}$.

Diese Resultate zeigen, dass zwei Domänen für die Funktionalität von humanem Katanin essentiell sind:

- eine N-terminale Bindedomäne (AS 56-180), die zur Interaktion mit dem Mikrotubulus befähigt und eine Funktion im Oligomerisierungsprozess wahrnimmt
- eine C-terminale katalytische Domäne (AS 181-491), die für ATP-Bindung und Hydrolyse erforderlich ist.

Bis zu diesem Abschnitt wurden die hergestellten *Kat*-Proteine analysiert. Eine direkte mikroskopische Detektion der Proteine war aufgrund eines fehlenden Fluoreszenzmarkers jedoch nicht möglich. Um die Arbeitsweise von Katanin mikroskopisch studieren zu können, wurden mit Hilfe eines GFP-Katanin Fusionsproteins Analysen auf der Ebene von Einzelmolekülen durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden. Da ab dem kommenden Kapitel ausschließlich Vollängen-Katanin in Messreihen eingesetzt wurde, wird die bis dahin benutzte Bezeichnung „*Kat123*“ durch „Katanin“ ersetzt.

IV.3 Ergebnisse – Strukturelle Analyse

IV.3.1 Bewegung von GFP-Katanin am Mikrotubulus

Einzelmolekülmessungen wurden analog zu Punkt III.3.4 (siehe Spastin-Kapitel) durchgeführt.

Unter Einsatz geringer Proteinkonzentrationen konnten Katanin-Einzelmoleküle beobachtet werden, die nach Bindung an den Mikrotubulus eine Bewegung am Filament zeigten (Abbildung IV.13A). Wie bei Spastin wurde die Bewegung fluoreszierender Katanin-Moleküle mittels selbst geschriebener Software ermittelt (OpenBox, MatLab). Die MSD-Werte zeigten eine lineare Abhängigkeit von der Zeit, was für diffusive Prozesse charakteristisch ist. Analog zu Spastin konnte bei Katanin kein gerichteter Bewegungsprozess zu einem der beiden Mikrotubuli-Enden registriert werden. Zur Bestimmung des Diffusionskoeffizienten wurden Einzelmoleküle im GFP-Kanal mit einem Zeitintervall von 229 ms gemessen. Wie im Fall von Spastin zeigte nur eine geringe Anzahl an Molekülen längere Diffusionszeiten, die sich über mehrere Sekunden erstreckten. Die meisten Partikel verloren dagegen sehr schnell den Kontakt zum Filament. Das Histogramm in Abbildung IV.13B zeigt die berechneten Diffusionskoeffizienten der analysierten Einzelmoleküle. Ein exponentieller Fit der Datenpunkte führt zu einem gemittelten Diffusionskoeffizienten für Katanin von $0,0116 \pm 0,0014 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

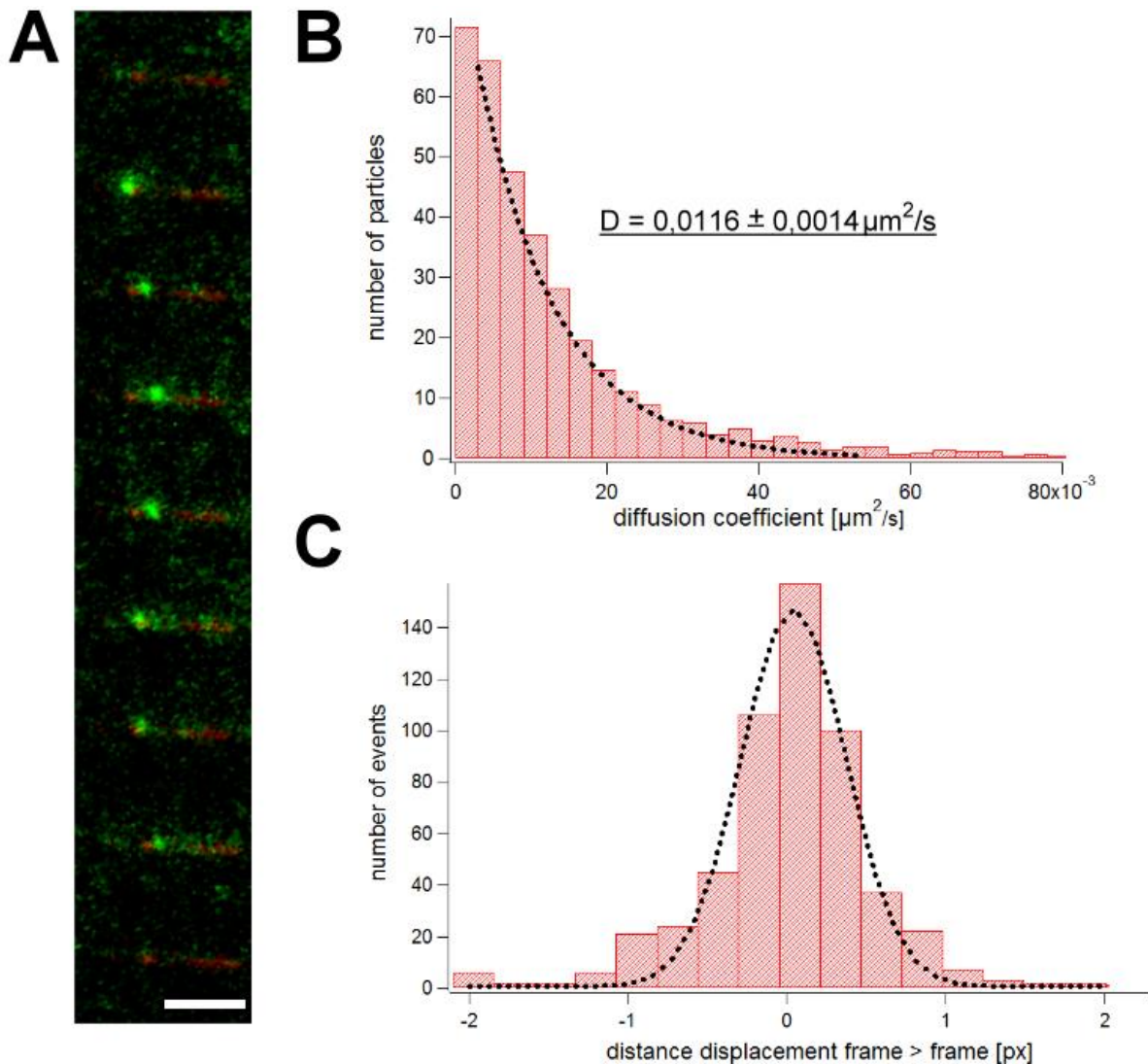


Abbildung IV. 13: GFP-Katanin diffundiert am Mikrotubulus entlang.

(A) Bilderfolge eines Videos mit GFP-Katanin (grün). Neun Bilder eines TIRF-Videos mit detektiertem GFP-Katanin wurden über einen Mikrotubulus (rot) gelegt. Das Zeitintervall zwischen zwei Bildern beträgt 1 s. Das Molekül bindet an das Mikrotubulus-Filament (Bild 2), diffundiert eindimensional am Mikrotubulus entlang (Bilder 3–8) und dissoziiert (Bild 9). Maßstab = 5 μm .

(B) Die ermittelten Diffusionskoeffizienten wurden in ein Histogramm importiert. Aus dem exponentiellen Kurven-Fit erhält man einen gemittelten Diffusionskoeffizienten, D , von $0,0116 \mu\text{m}^2/\text{s}$; $\langle x^2 \rangle = 2 \cdot D \cdot t$.

(C) GFP-Katanin zeigt eine ungerichtete Bewegung entlang des Mikrotubulus, ohne Präferenz für das Plus- oder Minus-Ende.

IV.3.2 Severing durch GFP-Katanin

In diesem Abschnitt wurden unterschiedlich hohe Konzentrationen an GFP-Katanin in die Flusskammern pipettiert und die Reaktionen durch 1 mM ATP gestartet. Unter Einsatz geringer Proteinkonzentrationen erschienen die fluoreszenzmarkierten Katanin-Moleküle als deutlich sichtbare Partikel, die spezifisch auf dem Mikrotubulus verteilt waren (Abbildung IV.14). Bei Einsatz von 20 nM GFP-Katanin wurde das komplette Mikrotubuli-Netzwerk nach 20 Minuten abgebaut. 10 Minuten nach Start der Reaktion wurden Brüche und Lücken

sichtbar (Abbildung IV.14B). Neben den Brüchen konnten auch Depolymerisationsereignisse am Ende der Mikrotubuli beobachtet werden. Da dieses Phänomen bei Spastin nicht auftrat, wurde dieser Vorgang näher untersucht (siehe Punkt IV.3.3).

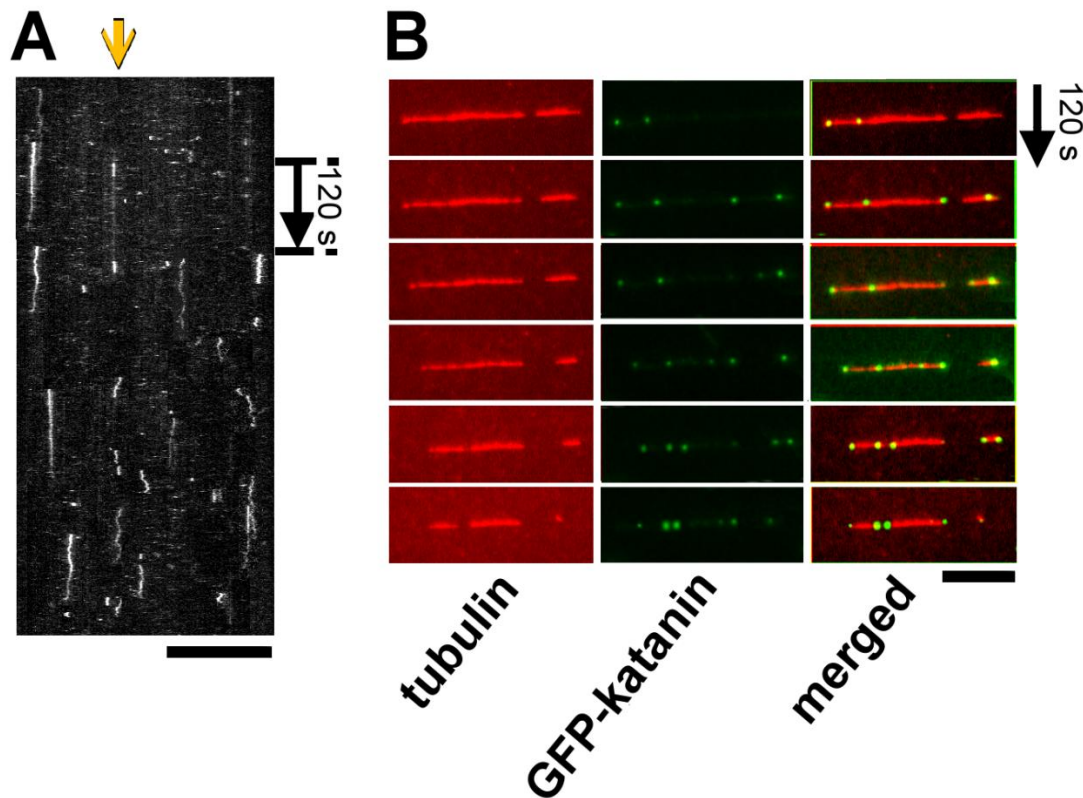


Abbildung IV. 14: Lokalisation von GFP-Katanin auf dem Mikrotubulus während des Schneideprozesses.

(A) Der Kymograph zeigt diffusive GFP-Einzelmoleküle auf dem Mikrotubulus. Es ist zu erkennen, dass Katanin frequentiert an spezifische Stellen bindet (gelber Pfeil). Maßstab = 5 µm.

(B) Der grüne Kanal (mittlerer Abschnitt) zeigt GFP-Katanin, der rote (linker Abschnitt) ALEXA555-gekoppelte Mikrotubuli. Der rechte Abschnitt zeigt eine Kombination beider Kanäle. GFP-Katanin bindet mit hoher Frequenz an Stellen, die im späteren Verlauf durch Schnitte oder Knicke gekennzeichnet sind. Zudem ist auffällig, dass Katanin häufig an MT-Enden bindet, wodurch Depolymerisation induziert wird. Maßstab = 5 µm.

Um die Auswirkung der Katanin-Konzentration auf den Schneidevorgang zu untersuchen, wurden TIRF-Messungen mit erhöhten Konzentrationen (0 nM, 25 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM und 200 nM) an GFP-Katanin durchgeführt (Abbildung IV.15A). In Abwesenheit von GFP-Katanin (0 nM) konnte kein Schneiden beobachtet werden. Die berechnete *Severing* Frequenz betrug bei 50 nM Protein $11,3 \cdot 10^{-3}$ Ereignisse / ($\mu\text{m} \cdot \text{s}$) und erreichte einen maximalen Wert von $23,2 \cdot 10^{-3}$ Ereignisse / ($\mu\text{m} \cdot \text{s}$) bei Einsatz von 100 nM Protein. Die maximal eingesetzte Konzentration von GFP-Katanin betrug 400 nM und resultierte überraschenderweise in einem Rückgang der *Severing* Rate (Abbildung IV.15A). Im Rahmen zahlreicher Kontrollmessungen konnten sowohl in Abwesenheit von GFP-Katanin als auch in Gegenwart der hydrolysedefizienten Mutante E309Q keine *Severing*-Ereignisse registriert werden (Abbildung IV.15B). Diese Resultate demonstrieren,

dass *Severing* spezifisch durch Katanin und nicht durch Proteinverunreinigungen oder Photoschäden induziert wurde. Ohne ATP und in Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren Analogons AMPPNP konnten im *Severing*-Test keine Schnitte mehr beobachtet werden.

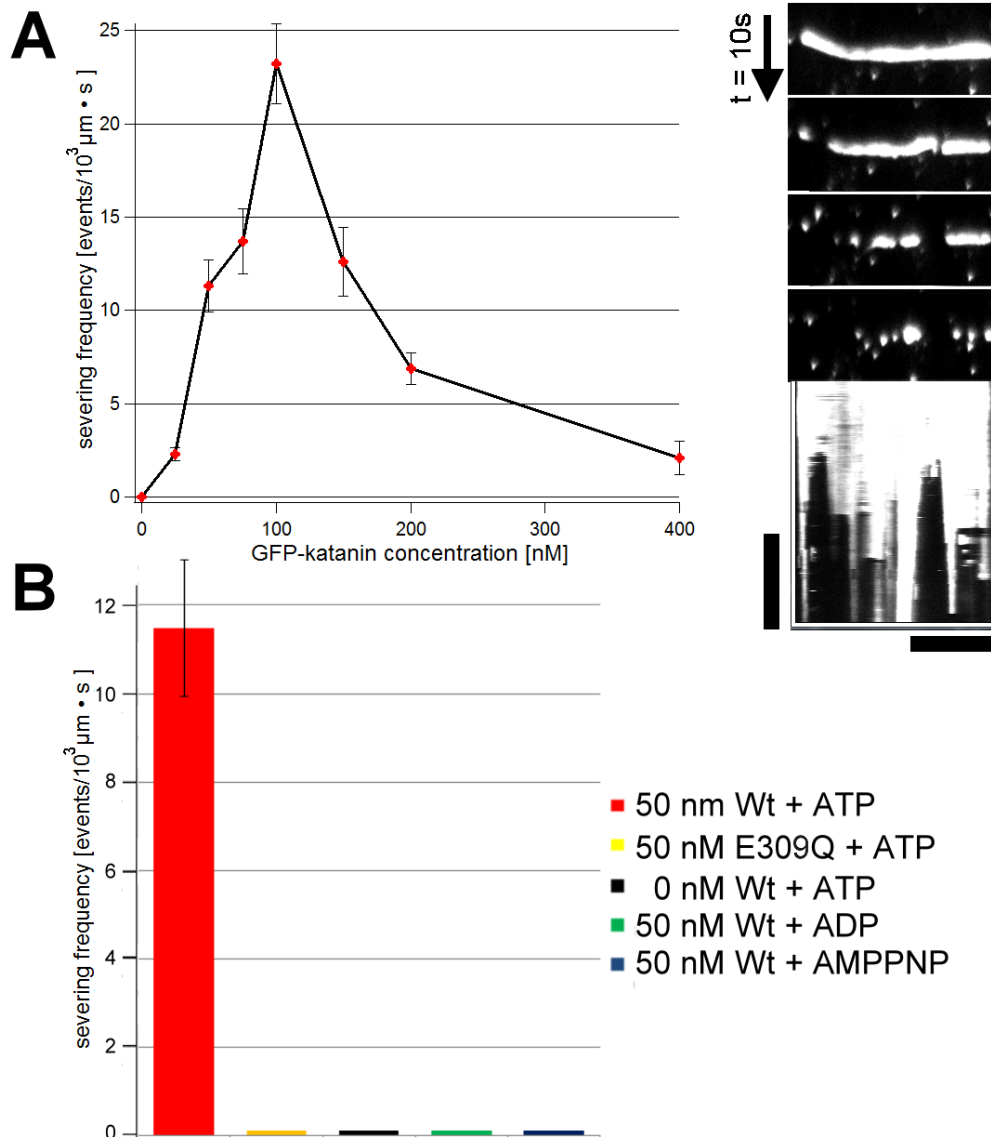


Abbildung IV. 15: Quantitative Analyse des Mikrotubuli-Severing Vorgangs.

(A) Linke Seite: Berechnung der *Severing* Frequenz von Katanin in Gegenwart von 1 mM ATP. Die Konzentration von GFP-Katanin variierte dabei von 0 bis 400 nM mit den Zwischenschritten 25, 50, 75, 100, 150 und 200 nM. Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die vertikalen Balken die Standardabweichungen. Rechte Seite: Zeitreihe von ALEXA555-markierten Mikrotubuli mit 100 nM GFP-Katanin. Die Zeit zwischen zwei Bildern beträgt 10 s. Der dargestellte Mikrotubulus-Kymograph zeigt zahlreiche *Severing*-Ereignisse. Vertikaler Maßstab = 40 s, horizontaler Maßstab = 2 μm .

(B) Kontrollexperimente zeigen, dass der Schneideprozess Katanin-spezifisch und unter Hydrolyse von ATP erfolgt. Analysiert wurde das Verhalten des Wildtyps in Gegenwart von 1 mM ADP (grün) und 1 mM AMPPNP (blau) sowie der Mutante E309Q in Anwesenheit von 1 mM ATP (gelb). Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die vertikalen Balken die Standardabweichungen.

Messungen in den Flusskammern lieferten Hinweise darauf, dass humanes Katanin in der Lage ist, Depolymerisation am Ende des Mikrotubulus zu induzieren. Dieses Phänomen wurde im folgenden Abschnitt näher beleuchtet.

IV.3.3 Mikrotubuli-Depolymerisation

Um analysieren zu können, ob das Plus- oder Minus-Ende des Mikrotubulus schneller abgebaut wird, wurden polaritätsmarkierte Mikrotubuli eingesetzt. Die Auswertung der Messungen ergab, dass der Abbauprozess am Plus-Ende wesentlich schneller erfolgte als am Minus-Ende (Abbildung IV.16A/B). Um den Effekt der Katanin-Konzentration auf die Depolymerisation von Mikrotubuli zu untersuchen, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen an GFP-Katanin (0, 25, 50, 75 und 100 nM) inkubiert. Die Depolymerisationsraten wurden mit Hilfe erstellter Kymographen bestimmt. In Abwesenheit von Katanin trat eine minimale, basale Depolymerisation mit einer Rate von $0,075 \pm 0,017$ nm/s auf. In Gegenwart von 50 nM GFP-Katanin konnte am Plus-Ende eine maximale Depolymerisationsrate von $1,82 \pm 0,29$ nm/s registriert werden. Zudem war auffällig, dass die Depolymerisationsrate am Minus-Ende stets geringer war als am dynamischen Plus-Ende. Bei 50 nM Katanin betrug die Rate am Minus-Ende $0,41 \pm 0,08$ nm/s. Überraschenderweise konnte unter Verwendung höherer Katanin-Konzentrationen eine Abnahme der Depolymerisationsrate beobachtet werden. Vergleicht man die *Pre-Severing* Frequenz mit der Depolymerisationsrate, so gibt es Unterschiede. Maximale Depolymerisation ist bei einer geringeren Konzentration (50 nM) zu beobachten als die maximal bestimmte *Pre-Severing* Frequenz (100 nM). Dies ist ein Indiz dafür, dass die Enden bei geringen Konzentrationen ein primäres Ziel für Katanin darstellen. Es scheint, als hätte Katanin unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Mikrotubuli-Enden und B-Gitter. Auch in dieser Studie wurden zahlreiche Kontrollexperimente durchgeführt, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Sowohl in Abwesenheit von GFP-Katanin als auch in Gegenwart der Mutante E309Q konnten lediglich basale Depolymerisationsraten bestimmt werden (Abbildung IV.16B). Die Messungen wurden zudem ohne ATP sowie in Anwesenheit von AMPPNP durchgeführt. Unter beiden Bedingungen lag die berechnete Depolymerisationsrate im Bereich der Negativkontrolle, in der ausschließlich Mikrotubuli eingesetzt wurden ($0,091 \pm 0,038$ nm/s ohne ATP und $0,103 \pm 0,049$ nm/s mit AMPPNP).

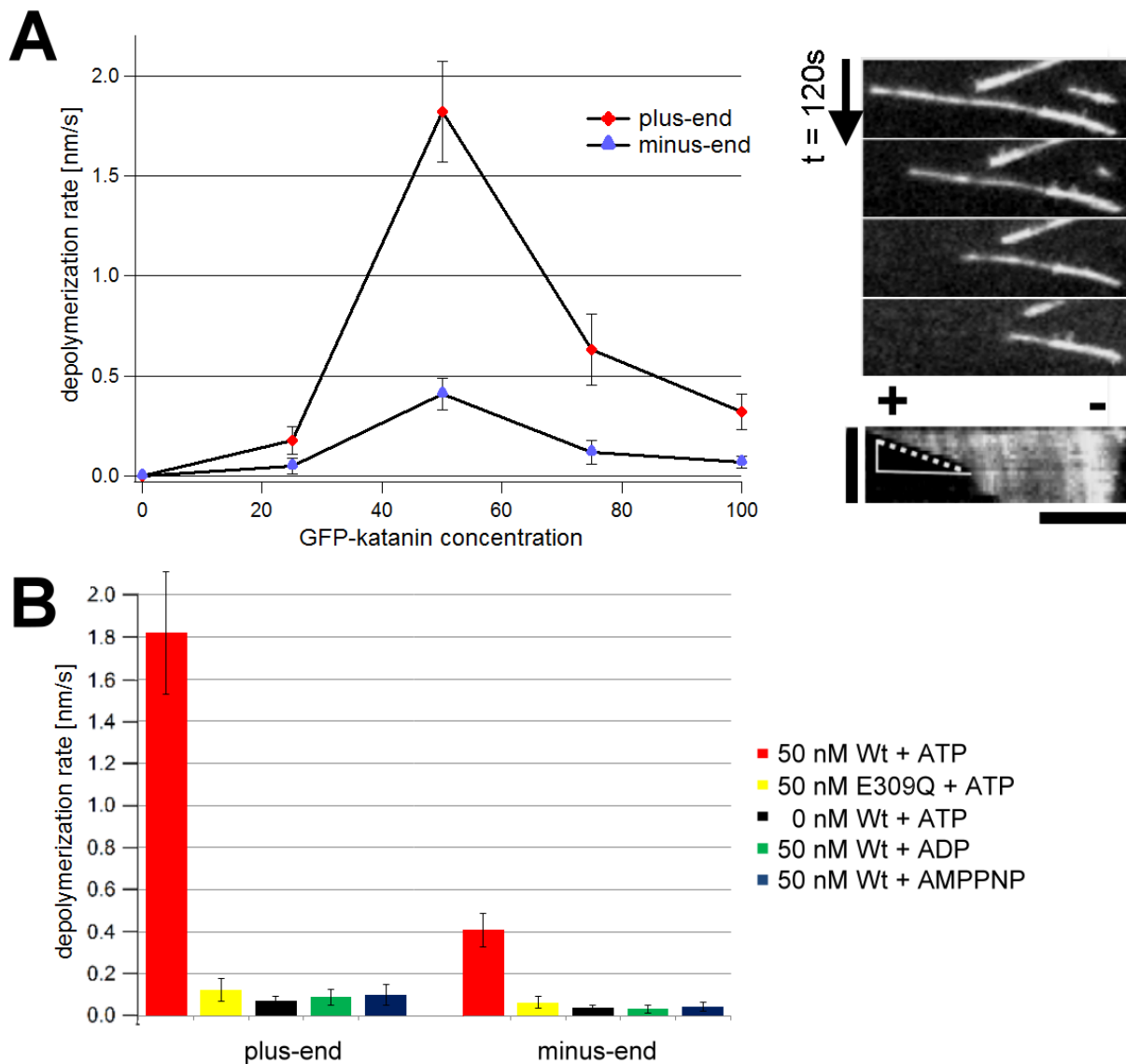


Abbildung IV. 16: GFP-Katanin depolymerisiert Mikrotubuli.

(A) Linke Seite: Die quantitative Analyse der Depolymerisation durch Katanin erfolgte über die Bestimmung der Depolymerisationsraten am Plus- (0, 25, 50, 75 und 100 nM; rote Punkte) und Minus-Ende (0, 25, 50, 75 und 100 nM; blaue Punkte). Die Messungen erfolgten in Anwesenheit von 1 mM ATP. Die Punkte im Graphen geben die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Messungen an, vertikale Balken zeigen die Standardabweichungen. Rechte Seite: Zeitreihe von ALEXA555-polaritätsmarkierten Mikrotubuli mit 50 nM GFP-Katanin. Das Symbol (+) zeigt das Plus-, (-) dagegen das Minus-Ende des Mikrotubulus. Die Zeit zwischen zwei Bildern beträgt 120 s. Der dargestellte Mikrotubulus-Kymograph zeigt, dass Depolymerisation am Plus-Ende schneller erfolgt als am Minus-Ende. Kymographen wurden herangezogen, um die Depolymerisationsraten zu bestimmen. Dabei wurde die Verkürzung des Mikrotubulus auf Δt bezogen.

Vertikaler Maßstab = 8 min, horizontaler Maßstab = 2 μm .

(B) Kontrollexperimente zeigen, dass Depolymerisation Katanin-spezifisch und unter Hydrolyse von ATP erfolgt. Analysiert wurde das Verhalten des Wildtyps in Gegenwart von 1 mM ADP (grün) und 1 mM AMPPNP (blau) sowie der Mutante E309Q in Anwesenheit von 1 mM ATP (gelb). Die Datenpunkte zeigen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen, die vertikalen Balken die Standardabweichungen.

IV.3.4 Elektrostatische Interaktionsstudien

Um den Effekt des negativ geladenen *E-Hooks* von Tubulin auf die Interaktion mit Katanin zu studieren, wurde eine Bindestudie mit interner Kontrolle entwickelt. Dafür wurden Hybrid-Mikrotubuli hergestellt, die sowohl aus nativem als auch aus *E-Hook* freiem Tubulin bestanden. Um eine Unterscheidung der beiden Segmente herbeiführen zu können, wurde der mit Subtilisin verdaute Anteil an Tubulin – im Vergleich zum nativen Teil – mit einer größeren Menge an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt (Abbildung IV.17A). Bei einem niedrigen molaren Verhältnis von Katanin zu Tubulin (1:32) dekorierte das Protein hauptsächlich native Bereiche am Filament, während verdaute Segmente kaum gebunden wurden (Abbildung IV.17B). Nach deutlicher Erhöhung der Konzentration an GFP-Katanin (molares Verhältnis Tubulin/Katanin 2:1) band das Protein gleichmäßig an beide Regionen der Hybrid-Mikrotubuli, so dass eine vollständige Dekoration auftrat. Dies ist zugleich ein Indiz dafür, dass der Mikrotubulus trotz Abkopplung des negativ geladenen *E-Hooks* weiterhin als Plattform für Katanin fungieren kann. Um den Effekt des *E-Hooks* auf die Bindung von Katanin quantifizieren zu können, wurden Cosedimentationsanalysen durchgeführt. Bei einem stöchiometrischen Verhältnis Katanin/Tubulin von 1:2 war die Bindung des Enzyms an die unterschiedlichen MT-Segmente vergleichbar. Es ist gut vorstellbar, dass unter dieser Bedingung die Bindepräferenz für natives-Tubulin „überdeckt“ wird. Wurden niedrigere Katanin-Konzentrationen eingesetzt, so veränderte sich dieses Auswertungsbild analog zu den durchgeführten TIRF-Messungen. Im Vergleich zur nativen Version interagierte wesentlich weniger Protein mit Subtilisin-verdaulichem Tubulin. Für die Bestimmung der Dissoziationskonstanten wurde der Anteil des an Mikrotubuli-gebundenen Katanins gegen die eingesetzten Tubulin-Konzentrationen aufgetragen. Der Fit der Bindungskurven lieferte einen K_D von $0,4 \mu\text{M}$ für natives Tubulin, im Fall von verdaulichem Tubulin lag der K_D mit $\approx 10 \mu\text{M}$ um den Faktor 22,5 höher. Die erhaltenen Resultate zeigen, dass Katanin bei der Bindung eine Präferenz für natives Tubulin hat. Zugleich ist jedoch zu erwähnen, dass der *E-Hook* für die Bindung nicht absolut essentiell ist, da bei Einsatz größerer Mengen an Katanin eine nahezu gleichmäßige Dekoration der beiden unterschiedlichen Segmente in Hybrid-Mikrotubuli registriert werden konnte.

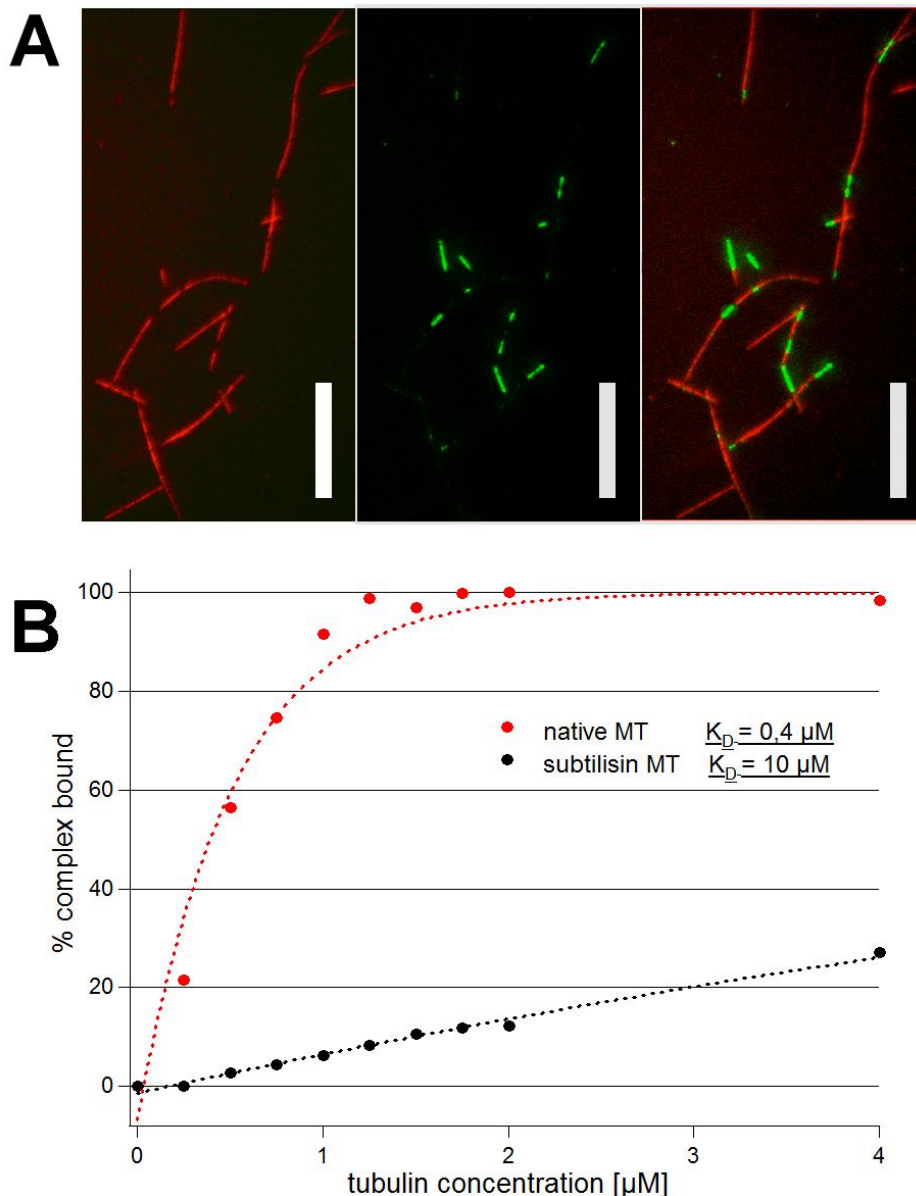


Abbildung IV. 17: Bindung von Katanin an Hybrid-Mikrotubuli.

Die mit Subtilisin behandelten Mikrotubuli (ohne *E-Hook*) sind mit ALEXA555 markiert.

(A) TIRF-Bild von GFP-Katanin Molekülen, die an Hybrid-Mikrotubuli gebunden sind. Dabei interagiert Katanin bevorzugt mit nativen Tubulin-Segmenten. Der rote Kanal zeigt verdautes Tubulin (ohne *E-Hook*), die Lücken in den Filamenten stellen natives Tubulin dar. Im grünen Kanal wurde GFP-Katanin detektiert. Molares Verhältnis GFP-Katanin/Tubulin = 1:32.

(B) Bindekurven, die mit Hilfe von Cosedimentationsmessungen erhalten wurden. Dabei wurde GFP-Katanin entweder mit nativem Tubulin (rot) oder mit Subtilisin-behandeltem Tubulin (schwarz) inkubiert. Die Entfernung des *E-Hooks* reduziert die Bindeaffinität mindestens um den Faktor 22,5. Molares Verhältnis GFP-Katanin/Tubulin = 1:32.

IV.3.5 Einfluss von Salzen auf den Bindevorgang

Um den Interaktionsprozess zwischen Katanin und Mikrotubuli weiter analysieren zu können, wurden Bindungsanalysen in Puffern mit variablen Salzgehalten durchgeführt. Mit Hilfe von TIRF-Messungen und anschließender Analyse erstellter Kymographen konnte gezeigt werden, dass hohe Salzkonzentrationen

die Katanin/MT-Bindung beeinflussen. Bei einer Salzkonzentration von 80 mM NaCl ist die ermittelte Binfrequenz maximal und beträgt $15,77 \pm 2,18$ Ereignisse/(10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$), während in Gegenwart von 300 mM NaCl nur noch marginale Bindung stattfindet ($1,93 \pm 0,62$ Ereignisse/(10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$)) (Abbildung IV.18A). Neben der Binfrequenz wurde auch die Bindedauer der Partikel auf dem Mikrotubulus studiert (Abbildung IV.18B). Hinsichtlich dieses Parameters hat eine erhöhte Salzkonzentration keinen derartig drastischen Einfluss, jedoch ist auch hier eine eindeutige Tendenz zu geringeren Diffusionszeiten bei höheren NaCl-Konzentrationen zu erkennen.

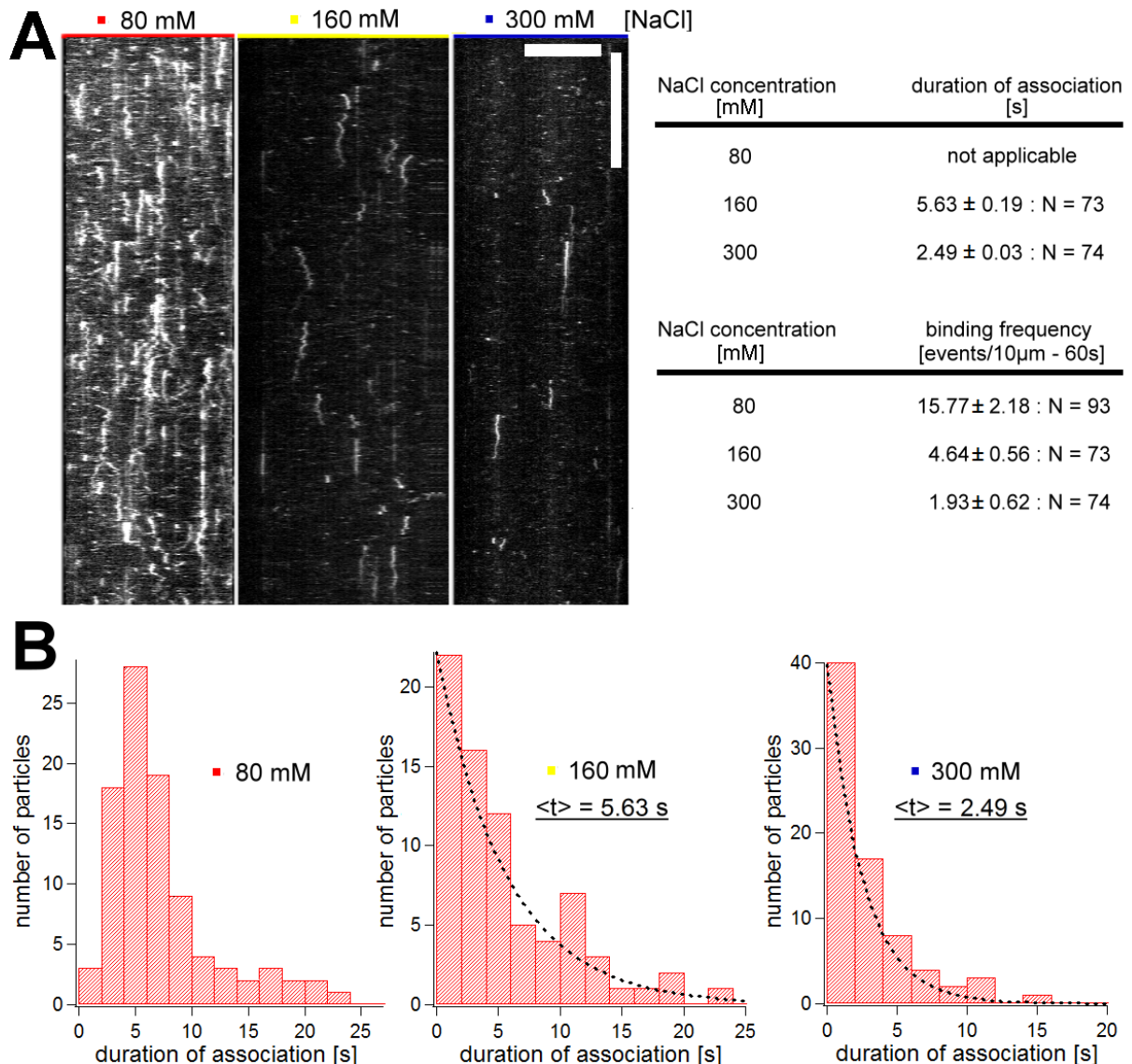


Abbildung IV. 18: Salze beeinflussen die Bindung von Katanin an Mikrotubuli.

(A) Linke Seite: Kymographen zeigen den Einfluss erhöhter NaCl-Konzentrationen auf die Interaktion zwischen Katanin und Mikrotubuli. Die Konzentration von GFP-Katanin betrug 50 nM. Die horizontale Achse entspricht der Distanz, die vertikale Achse der Zeit. Horizontaler Maßstab = 3 μm , vertikaler Maßstab = 10 s. Rechte Seite: Tabelle mit den errechneten Werten für die Binfrequenzen sowie Interaktionsdauern unter den angegebenen Salzbedingungen.

(B) Histogramme zeigen die Verteilung der analysierten Partikel nach ihrer Bindedauer. Aus dem exponentiellen Fit konnte die durchschnittliche Dauer, $\langle t \rangle$, der Partikelinteraktion ermittelt werden.

IV.3.6 Katanin hat eine Präferenz für GTP-Tubulin

In diesem Abschnitt soll untersucht werden, ob Katanin Nukleotid-Zustände auf dem Mikrotubulus unterscheiden kann. Da bei geringen Proteinkonzentrationen eine Präferenz für die MT-Enden, primär dem Plus-Ende nachgewiesen werden konnte würde man erwarten, dass GTP-Tubulin für Katanin ein bevorzugtes Bindeziel darstellt. Für die Analysen wurden segmentierte Mikrotubuli eingesetzt, die aus ALEXA555-markierten GMPCPP-Nukleationskeimen bestanden, die durch unmarkiertes GTP-Tubulin verlängert wurden. Daraus resultierend entstanden Mikrotubuli mit stark fluoreszierenden GMPCPP- und „dunklen“ GDP-Tubulin-Abschnitten. Diese segmentierten Mikrotubuli wurden mit geringen Konzentrationen an GFP-Katanin versetzt und mittels TIRF-Messungen analysiert. Sehr auffällig war die Beobachtung, dass GMPCPP-Tubulin wesentlich stärker dekoriert wurde als GDP-Tubulin Regionen (Abbildung IV.19A). Die hergestellten Intensitätsspektren verdeutlichen die Verteilung der GFP-Katanin Moleküle auf dem segmentierten Mikrotubulus (Abbildung IV.19B). Die Quantifizierung der Dekoration ergab, dass in den meisten Fällen ($\approx 80\%$ der untersuchten Mikrotubuli) ausschließlich das GMPCPP-Segment dekoriert war. In den restlichen Fällen konnte auch im Bereich von GDP-Tubulin eine Bindung von GFP-Katanin registriert werden (Abbildung IV.19C). Die erhaltenen Daten deuten darauf hin, dass GTP-Tubulin ein bevorzugter Bindepartner für GFP-Katanin ist.

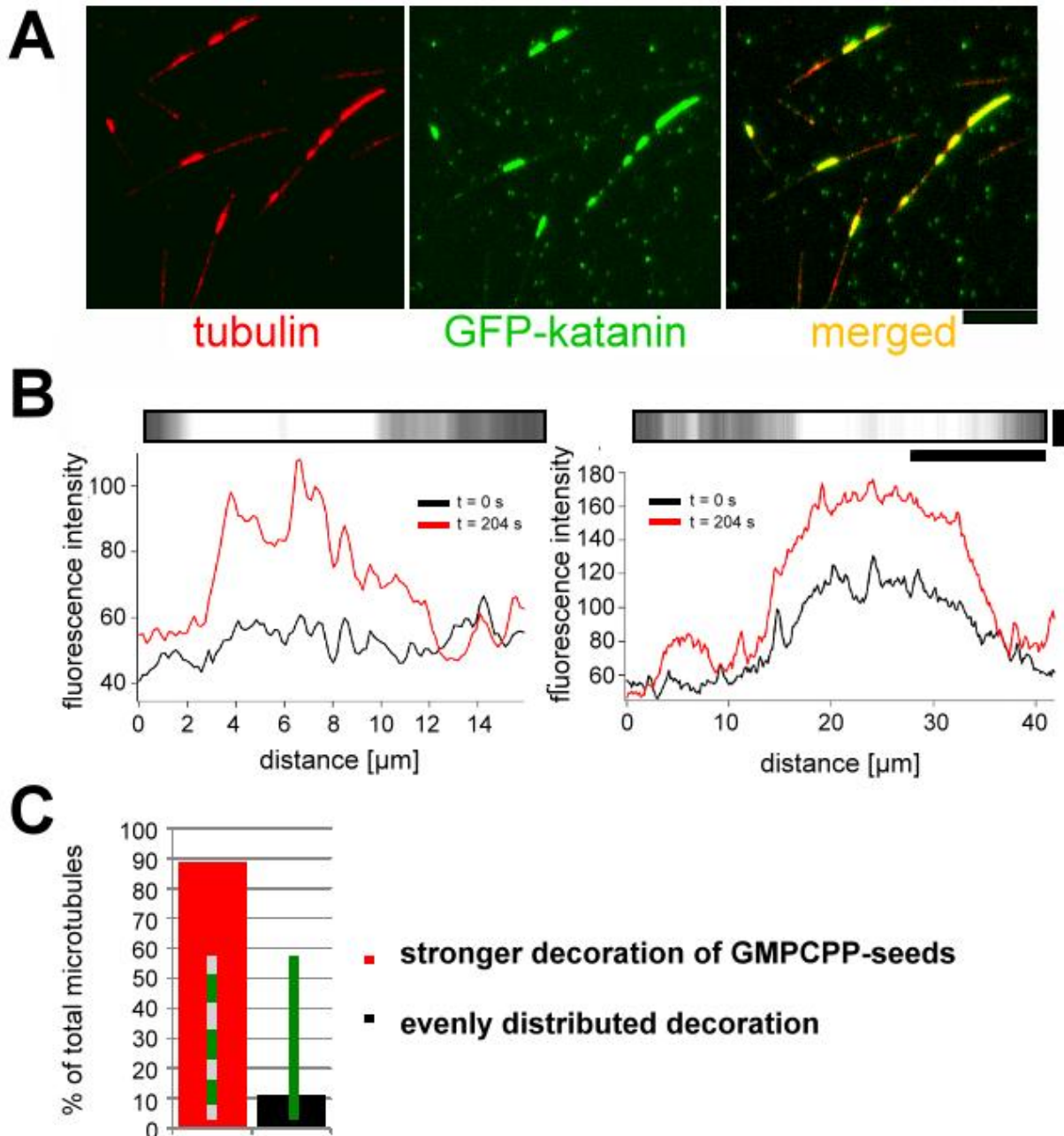


Abbildung IV. 19: Dekoration segmentierter GMPCPP/GDP-Mikrotubuli mit GFP-Katanin.

(A) Der rote Kanal zeigt Mikrotubuli, die sich aus ALEXA555-markierten GMPCPP- sowie aus unmarkierten GDP-Tubulin Segmenten zusammensetzen. Im grünen Kanal ist zu erkennen, dass GFP-Katanin bevorzugt an GMPCPP-Segmente bindet. Die Kombination beider Kanäle zeigt, dass Katanin eine wesentlich höhere Affinität für GMPCPP-Tubulin aufweist (überlappende Bereiche erscheinen gelb). Maßstab = 5 μm .

(B) Intensitätsprofile segmentierter Mikrotubuli zeigen eine wesentlich stärkere Dekoration an GMPCPP-Nukleationskeimen. Die GFP-Fluoreszenz wurde dabei kurz nach dem Pipettieren des Enzyms in die Flusskammer (schwarz) und 204 s danach gemessen (rot). Oberhalb der Spektren ist der entsprechende segmentierte Mikrotubulus dargestellt. Helle Abschnitte entsprechen GTP-Tubulin, während dunkle Segmente GDP-Tubulin repräsentieren.

(C) Quantifizierung der Dekoration segmentierter Mikrotubuli. 100 eindeutig segmentierte Mikrotubuli wurden in die Analyse aufgenommen und in 2 Kategorien eingeteilt: (1) Mikrotubuli mit einer wesentlich stärkeren Bindung an GMPCPP-Segmenten, (2) Mikrotubuli mit einer vergleichbaren Bindung an GMPCPP- und GDP-Tubulin Abschnitten.

IV.3.7 Morphologie geschnittener und depolymerisierter Mikrotubuli

Innerhalb der Gruppe der AAA-Proteine gibt es mehrere Vertreter, die ebenfalls Depolymerisationsvorgänge an MT zeigen (Desai, Verma et al. 1999; Westermann, Wang et al. 2006; Rath, Rogers et al. 2009). Ein sehr gut analysiertes Protein stellt dabei Kinesin-13 dar, das am Ende der Mikrotubuli ein signifikantes Depolymerisationsmuster aufweist (Rath, Rogers et al. 2009). Um zu überprüfen, ob Katanin einen ähnlichen Abbaumechanismus benutzt, wurde die Morphologie der durch *Severing* und Depolymerisation entstandenen Mikrotubuli-Enden studiert. Die Analyse fand auf der Stufe der Elektronenmikroskopie statt. Mikrotubuli wurden dabei entweder mit ATP und Katanin oder mit Protein unter Ausschluss von Nukleotiden eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle (Mikrotubuli in Abwesenheit von Enzym) mikroskopisch untersucht. Die Proben wurden auf ein Karbongitter pipettiert und durch Uranylformiat fixiert. Die Auswertung ergab, dass Mikrotubuli im ATP-Ansatz eine 4,7-fach höhere Anzahl an Enden pro Längeneinheit aufwiesen als die beiden Kontrollansätze. Interessanterweise gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Morphologie der untersuchten Mikrotubuli-Enden. Unter allen getesteten Bedingungen waren die Enden gerade. Vergleicht man dieses Ergebnis mit dem Depolymerisationsmuster von Kinesin-13 (KLP59D), so treten große Unterschiede auf (siehe Punkt V.3.3, Abbildung V.1). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass Katanin und KLP59D über unterschiedliche Mechanismen Depolymerisation am Mikrotubulus herbeiführen können.

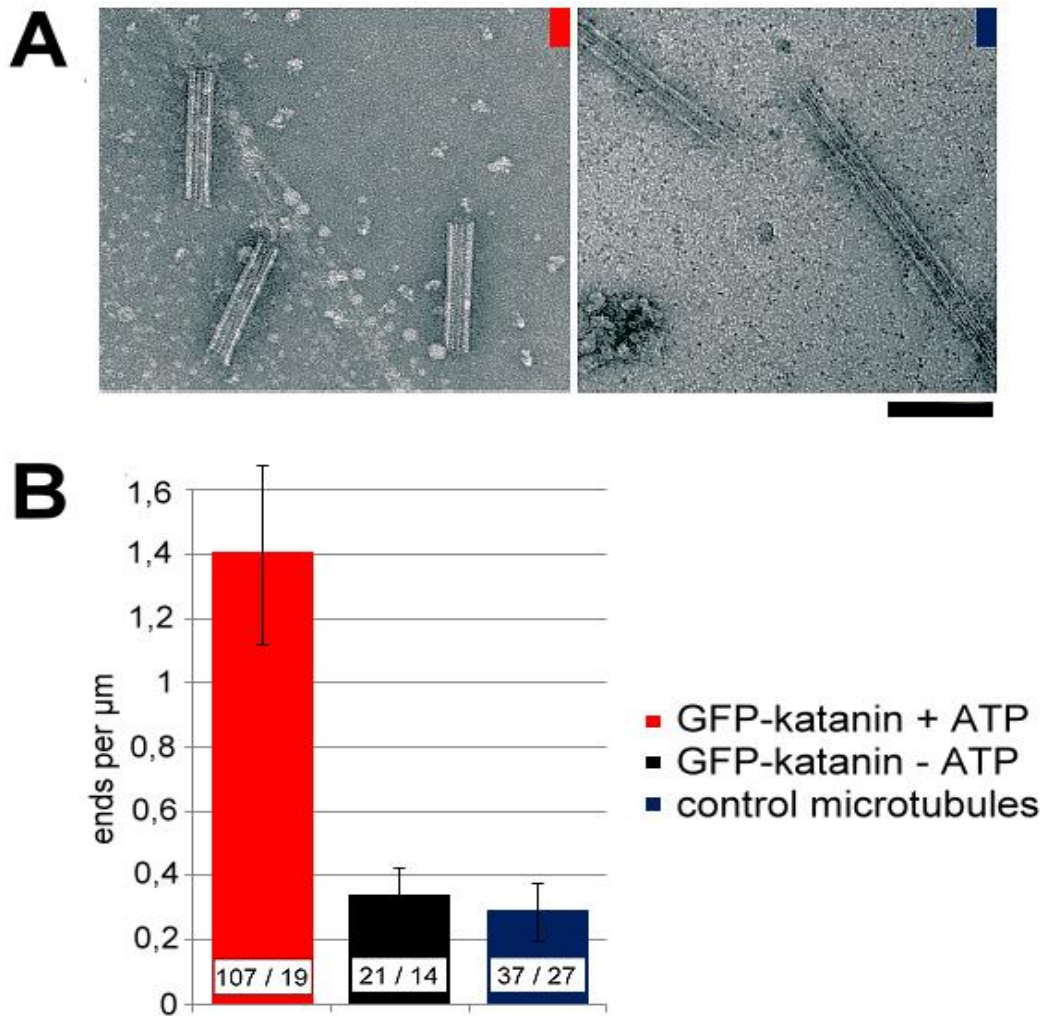


Abbildung IV. 20: Katanin erzeugt stumpfe Enden an Mikrotubuli.

(A) Das EM-Bild zeigt Enden von negativ gefärbten Mikrotubuli nach Inkubation mit: (rot) 50 nM Katanin in Kombination mit 1 mM ATP, (blau) kein Katanin (Kontrolle). Die durch Katanin geschnittenen Mikrotubuli weisen hauptsächlich stumpfe Enden auf.

(B) Quantifizierung der Mikrotubuli-Enden pro Längeneinheit. Vergleicht man das Ergebnis des Ansatzes Katanin + 1 mM ATP mit dem von Katanin - ATP oder der Negativkontrolle (nur Mikrotubuli), so ist die Anzahl an Enden um den Faktor 4,7 erhöht. Nummern in den Balken geben die Anzahl an ausgewerteten Mikrotubuli sowie die Anzahl an studierten Mikrotubuli-Feldern an. Datenpunkte stellen Mittelwerte aus drei unabhängigen Messungen dar, vertikale Balken sind Fehlerindikatoren. Maßstab = 25 nm.

IV.3.8 Einfluss von Nukleotiden auf Bindung, Bewegung und Hexamerisierung von Katanin

Um Bindung, Diffusion und Oligomerisierung näher untersuchen zu können, wurde GFP-Katanin in unterschiedlichen Nukleotid-Zuständen (ATP, ATP- γ S und AMPPNP) analysiert. Zudem wurden in Gegenwart der oben genannten Nukleotide *Photobleaching*-Messungen durchgeführt, um bevorzugte Oligomerstrukturen registrieren zu können. Um Bindung und Diffusion genauer analysieren zu können, wurden Kymographen von Mikrotubuli erstellt und Bindungsorte sowie Interaktionsdauern von Katanin-Molekülen studiert. In

Gegenwart von ATP dissoziierte GFP-Katanin nach Bindung sehr schnell vom Mikrotubulus (Abbildung IV.21A). Nur sehr wenige Moleküle zeigten längere Diffusionszeiten, die sich über mehr als 10 Sekunden erstreckten. Die meisten Partikel verließen das Filament sehr zügig, so dass eine gemittelte MT-Interaktionszeit von 3,99 s bestimmt werden konnte. In Gegenwart von AMPPNP zeigte GFP-Katanin sehr starke Bindung und nur vereinzelt Diffusionsbewegungen. Die meisten Moleküle waren statisch und blieben für die gesamte Aufnahmezeit (5 min) am Mikrotubulus gekoppelt. Daraus resultierend war die ermittelte Interaktionszeit unter den analysierten Nukleotiden maximal, mit einem Wert von 259,22 s. Dabei handelt es sich um einen Minimalwert, da die Aufnahmen nach 300 s beendet wurden. Da AMPPNP als ATP-Analogen nicht hydrolysiert werden kann, erfolgten unter Einfluss dieses Nukleotids erwartungsgemäß keine *Severing*-Ereignisse. Unter Einfluss von ATP- γ S trat analog zu ATP Diffusion auf und die analysierte Bindedauer nimmt mit 5,65 s eine Position zwischen der von ATP und AMPPNP ein. Auch in Bezug auf potentielle Oligomerformen sind die erstellten Kymographen aussagekräftig. In Gegenwart von AMPPNP ist eindeutig zu erkennen, dass die Fluoreszenzintensität der registrierten Partikel stark zunimmt. Dies ist ein Indikator für die Existenz höherer Oligomerformen. Dadurch könnte man sich auch erklären, warum die berechnete Binfrequenz unter Einfluss von AMPPNP mit 2,16 Ereignissen/(10 μ m · 60s) sehr gering ausfiel, während der Wert bei ATP und ATP- γ S um den Faktor von ≈ 7 erhöht war.

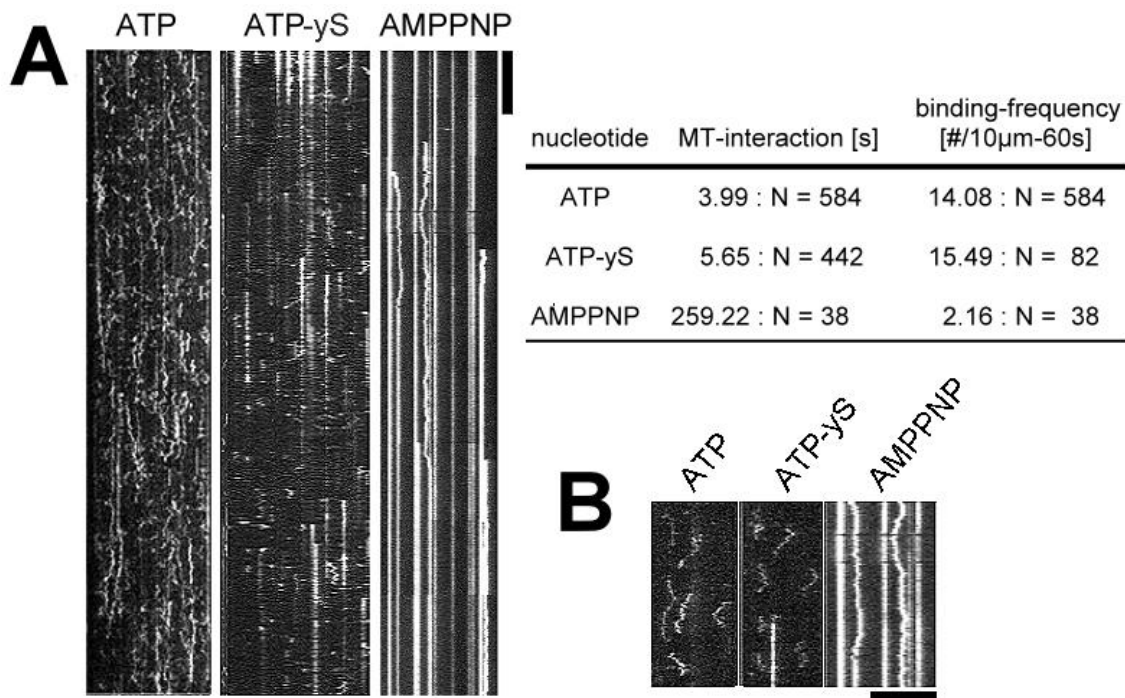


Abbildung IV. 21: Die Dynamik von GFP-Katanin hängt vom Nukleotid-Status ab.

(A) Kymographen von 50 nM Katanin in Gegenwart von 1 mM ATP, 1 mM AMPPNP und 1 mM ATP- γ S. Vertikaler Maßstab = 30 s, horizontaler Maßstab = 5 μ m. Die Tabelle zeigt die errechneten Werte für die Binfrequenz sowie Interaktionsdauer unter den angegebenen Nukleotidbedingungen an. **(B)** Kymographen zeigen Diffusion von GFP-Katanin Einzelmolekülen entlang Taxol-stabilisierter Mikrotubuli (1 mM ATP / 1 mM ATP- γ S / 1 mM AMPPNP). Vertikaler Maßstab = 10 s, horizontaler Maßstab = 1 μ m.

Um den Einfluss von Nukleotiden auf die Oligomerisierung von GFP-Katanin studieren zu können wurden *Photobleaching*-Experimente durchgeführt. In Gegenwart von 2 mM ATP sind klare Ausbleichstufen zu erkennen, die manuell gezählt werden konnten (Abbildung IV.22A). Abbildung IV.22B zeigt Histogramme, in denen die analysierten Einzelmoleküle den diversen Ausbleichstufen zugeordnet wurden. *Photobleaching* wurde zudem in Anwesenheit von AMPPNP und ATP- γ S durchgeführt. Auch unter Einfluss von ATP- γ S konnten eindeutige Schritte registriert werden. Beim Einsatz von AMPPNP war es sehr schwierig, alle Ausbleichstufen registrieren zu können, da wesentlich mehr GFP-Moleküle aneinander gekoppelt waren. Um trotzdem aussagekräftige Daten zu erhalten, wurde die letzte GFP-Ausbleichstufe herangezogen und nach oben skaliert, bis das Fluoreszenzmaximum erreicht wurde. Die Analyse im Histogramm ergab, dass in Anwesenheit von ATP Monomere, hinsichtlich ATP- γ S Trimere und in Gegenwart von AMPPNP Hexamere die dominanten Oligomer-Formen widerspiegeln.

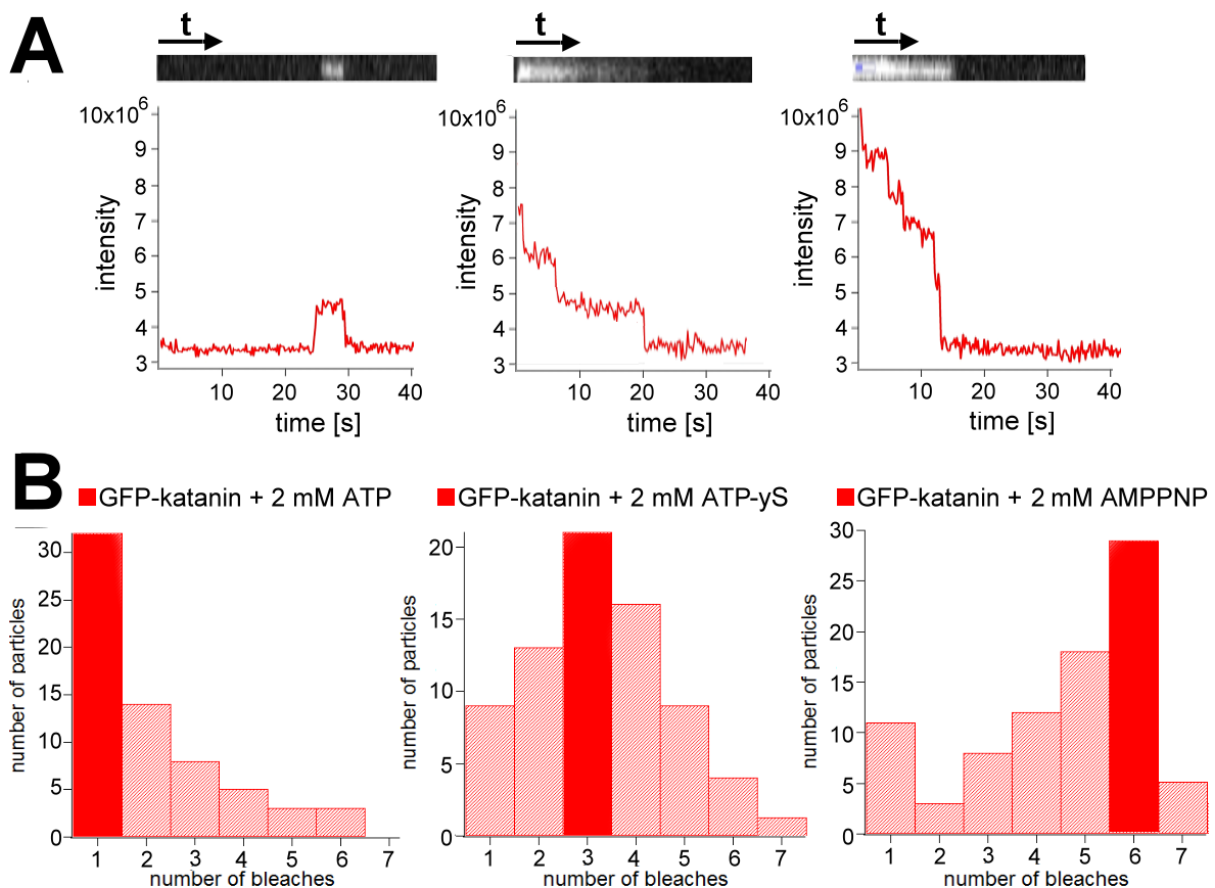


Abbildung IV. 22: *Photobleaching* und Analyse der Fluoreszenzintensitäten von GFP-Katanin.

(A) Beispiel für einstufiges Ausbleichen in Anwesenheit von 2 mM ATP, einem Dreistufen-Ausbleichen unter 2 mM ATP- γ S und einem Sechsstufen-Ausbleichen in Gegenwart von 2 mM AMPPNP. Über den Spektren sind die entsprechenden Kymographen der untersuchten Mikrotubuli dargestellt. **(B)** Verteilung der Ausbleichereignisse pro Katanin-Komplex in Anwesenheit von 2 mM ATP, 2 mM ATP- γ S und 2 mM AMPPNP. Die durchschnittliche Anzahl an ermittelten Ausbleichstufen entspricht 1/Komplex für ATP, 3/Komplex für ATP- γ S und 6/Komplex für AMPPNP. Die dunkelroten Balken heben die dominanten Spezies hervor.

Photobleaching und *Cross-Linking* Experimente lieferten wichtige Hinweise auf den Oligomerisierungsgrad von Katanin unter Einfluss verschiedener Nukleotide und variabler Proteinkonzentrationen. Da die Experimente ohne Mikrotubuli durchgeführt wurden, konnte damit noch keine Aussage über den Einfluss verschiedener Nukleotide auf den Katanin/MT-Bindegrad getroffen werden.

Um die Interaktion zwischen Katanin und Mikrotubuli genau untersuchen zu können, wurden Cosedimentationsmessungen in Kombination mit ADP, ATP und ATP- γ S durchgeführt. Dabei kam sowohl der Wildtyp als auch die mutierte Version E309Q zum Einsatz. Für die durchgeführten Läufe wurde Katanin mit variablen Konzentrationen von 0 bis 10 μ M eingesetzt. Die Tubulin-Konzentration blieb dabei konstant und belief sich auf 2 μ M. Abbildung IV.23A zeigt ein typisches SDS-Gel eines Cosedimentationslaufs mit Katanin. In Gegenwart von 1 mM ADP beträgt das molare Bindeverhältnis von Wildtyp-Katanin zu Tubulin 1,12:1. Das Resultat zeigt, dass unter dieser Bedingung hauptsächlich Katanin-Monomere an Tubulin-Dimere binden. Wird die Reaktion dagegen mit dem langsam hydrolysierbaren ATP-Analogon ATP- γ S durchgeführt, so bindet jeweils ein Katanin-Trimer an eine Tubulin-Einheit. Dementsprechend liegt das molare Verhältnis zwischen Wildtyp und Tubulin bei 2,82:1. Neben Katanin-Wildtyp wurde auch die hydrolysedefiziente Mutante E309Q in die Messungen miteinbezogen. Während in Anwesenheit von ADP primär Monomere an Mikrotubuli binden, liegt in Gegenwart von ATP- γ S das molare Verhältnis von Enzym zu Tubulin bei 2,78:1. Wurde die Mutante unter Einfluss von ATP mit Mikrotubuli inkubiert, so resultierte dies in einer marginal erhöhten Menge an gebundenem Enzym. Unter dieser Bedingung konnte ein molares Verhältnis Katanin zu Tubulin von \approx 3:1 registriert werden. Eine komprimierte Zusammenfassung der Daten ist in Abbildung IV.24B gezeigt. Ausgehend von elektronenmikroskopischen Experimenten hätte man erwarten können, dass E309Q in Gegenwart von ATP hauptsächlich als Hexamer und nicht in Form eines Trimers an das Filament bindet. Diese Diskrepanz wird ausführlich unter Punkt V.3.7 diskutiert.

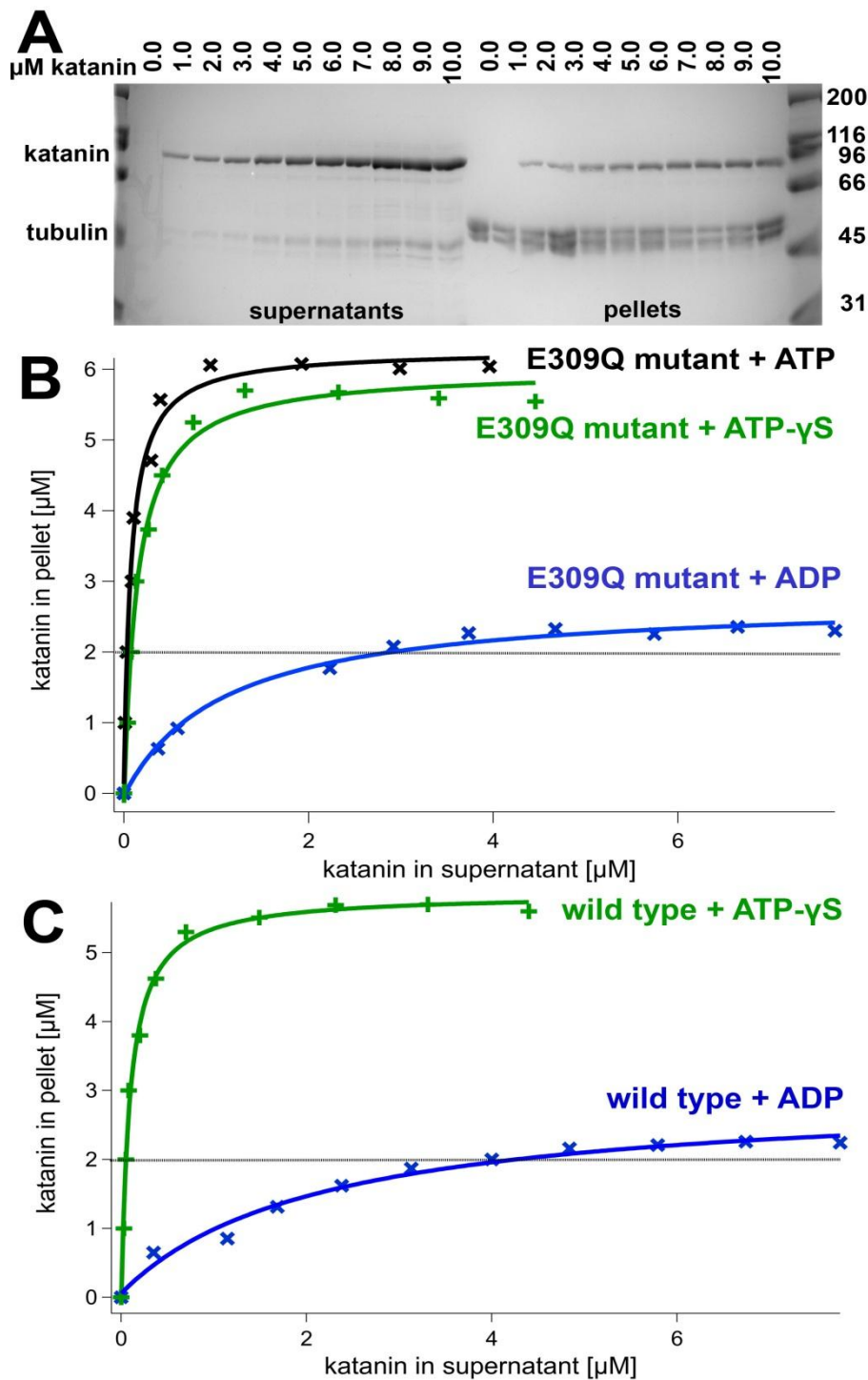


Abbildung IV. 23: Bestimmung der Katanin-Bindekapazität am Mikrotubulus unter Einfluss verschiedener Nukleotide.

Um den Bindegrad bestimmen zu können, wurden in Gegenwart von ADP, ATP oder ATP-γS steigende Katanin-Konzentrationen (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 und 10 µM) zu einer konstanten MT-Konzentration von 2 µM gemischt. Mit Mikrotubuli assoziiertes Protein wurde von ungebundenem Enzym durch Zentrifugation separiert.

(A) Repräsentatives SDS-Gel einer Cosedimentationsmessung mit Katanin.

(B+C) Die Proteinmengen in Pellet und Überstand wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und die Katanin-Konzentration im Pellet als Funktion gegen die detektierte Proteinmenge im Überstand dargestellt. Der Bindegrad der Mutante E309Q wurde in Gegenwart von ADP (blau), ATP (schwarz) und ATP-γS (grün) analysiert, während beim Wildtyp ADP (blau) und ATP-γS (grün) zum Einsatz kamen. Die Konzentration der verwendeten Nukleotide lag bei jeweils 1 mM.

E309Q

nucleotide	ADP	ATP-γS	ATP
tubulin [μM]	2	2	2
katanin in pellet [μM]	2,18	5,56	5,92
katanin subunits/tubulin-dimer	1,08/1	2,78/1	2,96/1
oligomer	monomer	trimer	trimer

wildtype

nucleotide	ADP	ATP-γS
tubulin [μM]	2	2
katanin in pellet [μM]	2,23	5,63
katanin subunits/tubulin-dimer	1,12/1	2,82/1
oligomer	monomer	trimer

Abbildung IV. 24: Zusammenfassung der durchgeführten Cosedimentationsmessungen.

Komprimierte Wiedergabe der aus den Cosedimentationsmessungen erhaltenen Daten für E309Q (oben) und Wildtyp-Katanin (unten).

IV.3.9 Detektion möglicher Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess von Katanin

Um herauszufinden, ob Katanin tatsächlich eine bevorzugte Zwischenstufe auf dem Weg zum aktiven Hexamer bildet, wurden *Cross-Linking* Experimente durchgeführt. In Kombination dazu erfolgten Strukturanalysen mittels TEM, um die aus den *Cross-Linking* Versuchen erhaltenen Daten auf optischer Ebene überprüfen zu können. Es wurden bei einer konstanten EDAC/NHS Konzentration von 20 μM steigende Mengen an Katanin eingesetzt. Die Inkubation sehr geringer Mengen an Katanin (25–100 nM) mit EDAC zeigt auf dem SDS-Gel eine Bande, die einem Monomer entspricht ($M_w \approx 57$ -kDa). Im Fall höherer Proteinkonzentrationen - im Bereich von 150 bis 200 nM - tritt eine zusätzliche Bande in Erscheinung, die ein Molekulargewicht von ≈ 150 -kDa aufweist, was zugleich ein Indikator für das Auftreten einer stabilen Trimer-Population ist. Wird die Proteinkonzentration weiter erhöht, so konnte eine starke Abnahme der Bandenintensität im Monomer- und Trimer-Bereich beobachtet werden. Gleichzeitig entstand eine dominante Spezies im hochmolekularen Bereich (Abbildung IV.25A). Die Ansätze wurden parallel auf mikroskopischer Ebene untersucht. In Abbildung IV.25B sind zahlreiche homogene Ringstrukturen mit einer zentralen Pore zu erkennen, die sich nach dem Partikel-Averaging als Hexamere herausstellten. Die Analyse der weiteren Ansätze mittels TEM konnten die Daten aus den *Cross-Linking* Experimenten bestätigen. So ist auf den elektronenmikroskopischen Bildern mit sehr geringer Katanin-Konzentration (0,2 μM)

hauptsächlich eine Monomer-Spezies, im Fall höherer Konzentrationen ($0,6 \mu\text{M}$) dagegen eine Zwischenstufe mit halbausgeprägtem Ring dominant. Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Resultate, dass Katanin in der Lage ist, auf dem Weg vom Monomer zum aktiven Hexamer eine Zwischenstufe in Form eines Trimers auszubilden.

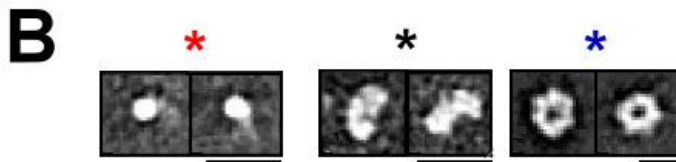
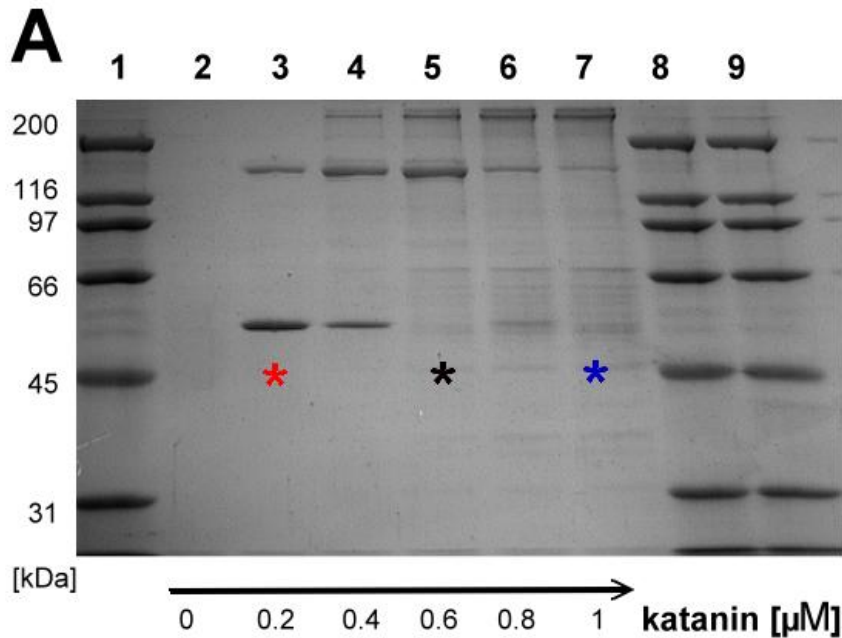


Abbildung IV. 25: Struktur und Oligomerisierung von Katanin.

(A) SDS-Gel mit quervernetzten Katanin-Untereinheiten bei unterschiedlichen Proteinkonzentrationen (von links nach rechts ansteigend). Das Gel zeigt mit steigenden Mengen an Katanin einen Übergang vom Monomer über ein Trimer zum aktiven Hexamer.

(B) Drei Ansätze mit $0,2$, $0,6$ und $1 \mu\text{M}$ Katanin wurden mittels TEM überprüft und ein Partikel-Averaging durchgeführt. Diese Mittelung brachte hervor, dass im Ansatz mit geringer Katanin-Konzentration eine Monomer-Spezies, im mittleren Konzentrationsbereich eine Zwischenstufe mit angedeuteter Ringstruktur und im hochkonzentrierten Bereich eine Hexamer-Population dominant ist. Maßstab = 10 nm .

IV.4 Methoden; Katanin-Projekt

IV.4.1 Primer für Amplifikationen

Folgende Formel wurde herangezogen, um die Schmelztemperatur zu bestimmen:

$$T_m = 64,9 + 41 \cdot [(y \cdot G + z \cdot C - 16,4) / (w \cdot A + x \cdot T + y \cdot G + z \cdot C)]$$

(w, x, y und z spiegeln dabei die Anzahl der Basen A, T, C, G in der Basensequenz wider).

Forward-Primer für FL-Katanin (pFastBac™1-Vektor)

5'-AATAAT**GGATCC**AT**GGATTACAAGGATGACGACGAT**AAGAAGAAATGCAAGTCTTACTTATGATTCAGAAAACGTTAAATTAGCACGG-3'

$$T_m = 69,98^\circ\text{C}$$

Reverse-Primer für FL-Katanin (pFastBac™1-Vektor)

5'-AATAAT**GCGGCCG**C**T**ACAAGAACCGAATTCGAAAATCCATTTTTTCGTAACG-3'

$$T_m = 65,09^\circ\text{C}$$

Forward-Primer für GFP (pFastBac1™-Katanin Vektor)

5'-AATAAT**GGATCC**AT**GGT**GAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTC-3'

$$T_m = 69,77^\circ\text{C}$$

Reverse-Primer für GFP (pFastBac1™-Katanin Vektor)

5'-CCTGCG**GGATCC****GGGTGCTCCTGGTGCTCC**CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'

$$T_m = 69,51^\circ\text{C}$$

- NotI
- BamHI
- Stop-Codon
- GAPGAP-Linker
- Start-Codon
- Flag®-Tag

Primer für Domain-Mapping**Forward-Primer für Domäne 1 (AS 1-55)**

5'-AATAAT**GGATCC**AT**GGATTACAAGGATGACGACGAT**AAGAAGAAATGCAAGTCTT
TACTTATGATTCAGAAAACGTAAATTAGCACGG-3'

$T_m = 69,98^\circ\text{C}$

Reverse-Primer für Domäne 1 (AS 1-55)

5'-AATAAT**CGCCGGCGCTA**CACCTGCTGCCATTTCTGTTGCAAGTATGTATCCTTC-3'

$T_m = 68,79^\circ\text{C}$

Forward-Primer für Domäne 2 (AS 56-180)

5'-AATAAT**GGATCC**AT**GGATTACAAGGATGACGACGAT**TGGCAGGAGATAAATGTG
GAAGCCAAGCATGTCAAGGATATC-3'

$T_m = 70,80^\circ\text{C}$

Reverse-Primer für Domäne 2 (AS 56-180)

5'-AATAAT**CGCCGGCGCTA**GTTGGTTTCTGGTTCGGTTACCGCTGCAGGAGACTTG-3'

$T_m = 70,52^\circ\text{C}$

Forward-Primer für Domäne 3 (AS 181-491)

5'-AATAAT**GGATCC**AT**GGATTACAAGGATGACGACGAT**AAATTTCGATTCAACCGGTT
ATGATAAAGATCTTGAGGC-3'

$T_m = 66,01^\circ\text{C}$

Reverse-Primer für Domäne 3 (AS 181-491)

5'-AATAAT**GCGGCCGCCTA**ACAAGAACCGAATTTCGAAAATCCATTTTTTCGTAACG-3'

$T_m = 65,09^\circ\text{C}$

- *NotI*
- *BamHI*
- Stop-Codon
- Start-Codon
- Flag®-Tag

IV.4.2 *Primer* für die PCR Analyse der rekombinanten Bacmid-DNA

Die transponierten Bacmids wurden unter Einsatz des pUC/M13-*Primer*-Paars analysiert.

M13 Forward-Primer

5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'

M13 Reverse-Primer

5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

IV.4.3 Einführung von Punktmutationen

Für das spezifische Austauschen einzelner Basen kam das QuikChange® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) zum Einsatz. Folgende Empfehlungen wurden vom Hersteller ausgesprochen: die gewünschte Mutation sollte von 10-15 komplementären Basen flankiert sein. Der GC-Gehalt sollte mindestens 40% erreichen und der *Primer* entweder mit einer oder mehreren Basen G oder C enden. Dadurch wird eine effiziente Anlagerung des *Primers* an die Ausgang-DNA gewährleistet. *Primer* sollten idealerweise eine Schmelztemperatur (T_M) größer/gleich 78°C aufweisen. Folgende Formel wurde herangezogen, um die Schmelztemperatur zu bestimmen:

$T_m = 81,5 + 0,41(\%G \cdot C) - 675/N - \% \text{ nicht-komplementäre DNA}$ (N = Länge des Primers in Basen)

T_m der KataninE309Q Mutagenese-*Primer* lag bei 78,75°C.

Das erhaltene PCR-Produkt wurde sequenziert um sicher zu stellen, dass die gewünschte Mutation integriert wurde. Anschließend erfolgte die Transformation in *E.coli* DH5α-Zellen. Das Plasmid wurde mit Hilfe des QIAprep® *Spin Miniprep Kits* analog zu Punkt I.2.3 aufgereinigt. Das mutierte Gen wurde abschließend in den pFastBac1™-Vektor zurück kloniert.

Forward-Primer für Katanin E309Q

5'- GCCACAATATTCATTGACCAAATTGATTGATCTGC-3'

Reverse-Primer für Katanin E309Q

5'-GCAGATCGAATCAATCAATTTGGTCAATGAATATTGTGGC-3'

IV.4.3.1 PCR-Ansatz und verwendetes Zyklus-Programm

Austausch von Glutaminsäure (E) durch Glutamin (Q) an Aminosäureposition 309 (E309Q)

50 ng pFastBac1™-Katanin Plasmid (Miniprep)

125 ng *Forward-Primer*

125 ng *Reverse-Primer*

200 µM dNTP Mix

5 µl (10X) Reaktionspuffer

1 µl (2.5 U/µl) *Pfu* Turbo DNA-Polymerase (Invitrogen)

50 µl Gesamtvolumen

PCR Programm

Stufe	Zeit	Temperatur	Runden
Initiale Denaturierung	30 s	95°C	1X
Denaturierung	30 s	95°C	12X
Annealing	1 min	55°C	
Extension	6 min 30 s	68°C	
Finale Extension	5 min	68°C	1X

IV.4.4 Proteinexpression im Baculovirus-Expressionssystem

IV.4.4.1 Vorteile des Baculovirus Protein-Expressionssystems

Analog zu anderen eukaryotischen Expressionssystemen erlaubt das Baculovirus-System posttranslationale Modifikationen, korrekte Faltung sowie Oligomerisierung rekombinater Proteine. Folgerichtig verfügt das überexprimierte Protein über die korrekte biologische Aktivität, so dass seine spezifische Funktionalität gewährleistet ist. Ein bedeutender Vorteil des Baculovirus Expressionssystem besteht in der hohen Ausbeute des exprimierten Proteins. Baculoviren infizieren in erster Linie zwei eng miteinander verwandte Falterarten. Deshalb ist das Arbeiten mit dem Baculovirus für den Menschen unbedenklich. Der nukleäre Polyhedrosis-Virus von *Autographa californica* ist der am häufigsten verwendete Baculovirus für die Proteinexpression im Insektenzellstamm

Spodoptera frugiperda. In den Insektenzellen erlaubt die zytoplasmatische Umgebung richtige Faltung sowie Ausbildung von Disulfidbrücken. Diese beiden Vorgänge können, aufgrund der reduzierten Umgebung im Cytoplasma, in *E.coli* nicht realisiert werden. Katanin konnte aufgrund der nicht zur Verfügung stehenden posttranslationalen Modifikationen und den in *E.coli* Zellen fehlenden Faltungshelfern nicht funktional erhalten werden. Deshalb wurde das Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystem für die Expression von Vollängen-Katanin und seiner Mutante E309Q eingesetzt. Alle in diesem Abschnitt angegebenen Spezifikationen betreffen ausschließlich die Expression von Katanin und *Coiled-Coil* Spastin. Für andere Proteine kann eine erhebliche Modifikation des Protokolls erforderlich sein.

IV.4.4.2 Das Baculovirus-Expressionssystem

Die in dieser Doktorarbeit analysierten Proteinvarianten von Katanin und *Coiled-Coil* Spastin wurden mit Hilfe des Bac-to-Bac® Baculovirus-Expressionssystems (Invitrogen) hergestellt. Das folgende Schema illustriert die wichtigsten Schritte im Bereich der Proteinexpression.

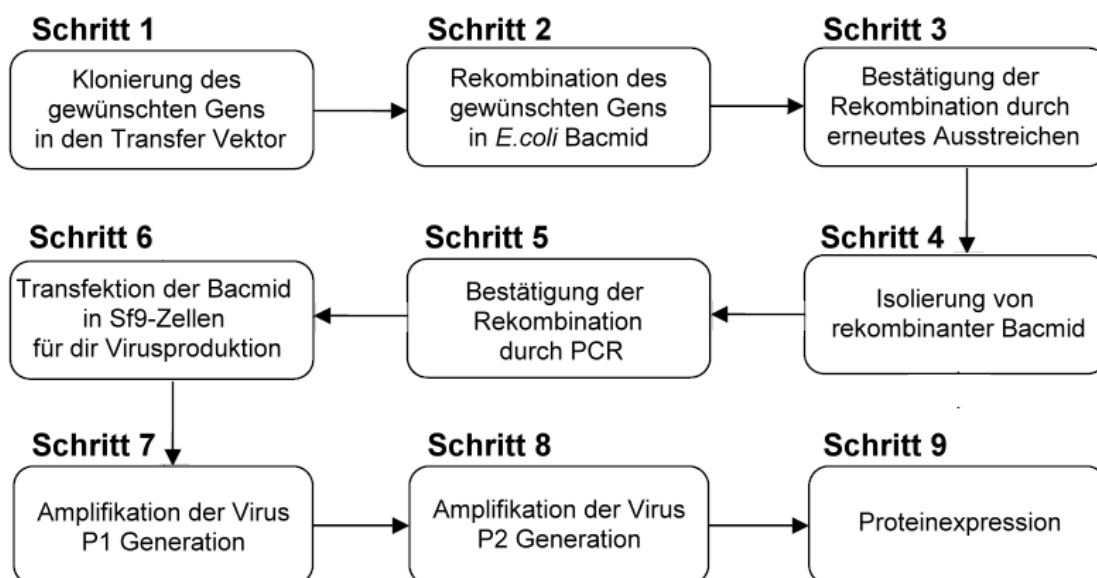


Abbildung IV. 26: Überblick über die Schritte, die in das Bac-to-Bac® Baculovirus Protein-Expressionssystem involviert sind.

Konstruktion des rekombinanten Transfervektors für die Proteinexpression – Schritt 1

Der pFastBac™1 Vektor wurde für die Expression von Katanin und *Coiled-Coil* Spastin herangezogen (Abbildung IV.27). Die Abschreibung der Sequenzen steht dabei unter der Kontrolle eines starken Polyhedrin-Promotors. Der Transfervektor enthält Transpositionstellen, die für die Rekombination in die Bacmid-Komponente essentiell sind (Schritt 2).

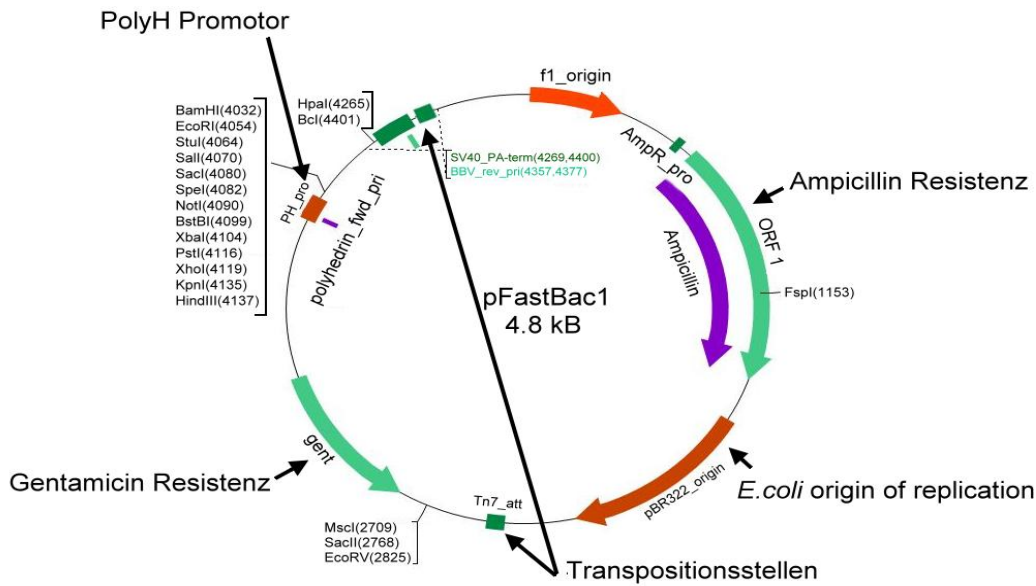


Abbildung IV. 27: Karte des pFastBac™ 1 Donor-Plasmids (Invitrogen).

Die multiplen Klonierungsstellen in Kombination mit dem PolyH-Promotor ermöglichen die Insertion von Katanin und *Coiled-Coil* Spastin in den Vektor.

Herstellung von rekombinanter Bacmid – Schritte 2/3

Die Rekombination des Transfer-Vektors mit dem Baculovirus *Shuttle*-Vektor (Bacmid) wird durch eine spezifisch lokalisierte Transposition gewährleistet (Abbildung IV.28). Die Bacmid-DNA wurde in DH10Bac™ *E.coli*-Zellen (Invitrogen) transferiert. DH10Bac™ sind kompetente Zellen, welche die Bacmid-Komponente mit einer mini-*att*Tn7 Zielstelle und Helferplasmid enthalten. Das auf dem pFastBac™-Donorplasmid lokalisierte mini-Tn7 Element kann mit der mini-*att*Tn7 Zielstelle auf dem Bacmid austauschen. Dafür sind die vom Helferplasmid bereitgestellten Transpositionsproteine erforderlich. Eine erfolgreiche Rekombination konnte durch Blau/Weiß-Selektion in Gegenwart von X-Gal (Sigma-Aldrich) und IPTG nachgewiesen werden. Weiße Kolonien wurden ausgestrichen, um den Phänotyp zu bestätigen.

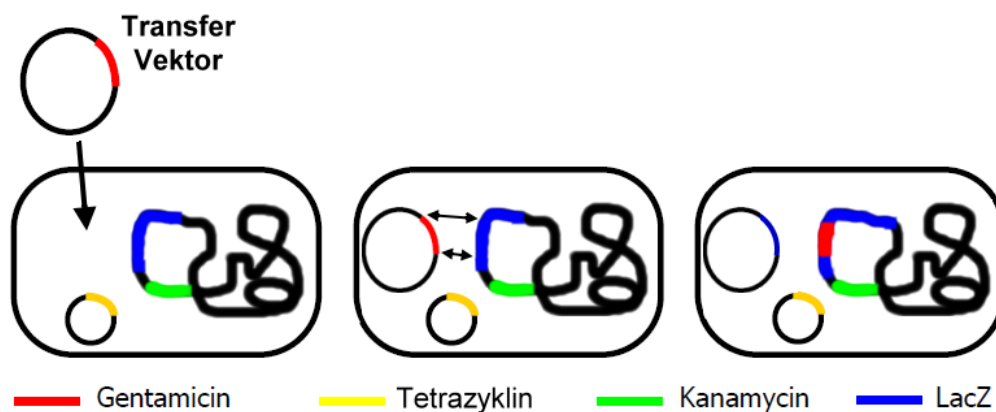


Abbildung IV. 28: Herstellung von rekombinantem Baculovirus.

Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA und Bestätigung der Rekombination mittels PCR – Schritte 4/5

Die positiven Kolonien wurden über Nacht in selektivem LB^{Kana,Genta,Tetra}-Medium inkubiert. Daraufhin wurde die entsprechende Bacmid-DNA aus den Zellen isoliert. Die Insertion des gewünschten Gens wurde durch PCR-Amplifikation mit pUC/M13-Primer bestätigt. Diese *Primer* binden an Stellen, die an den Enden der Rekombinationsstelle lokalisiert sind.

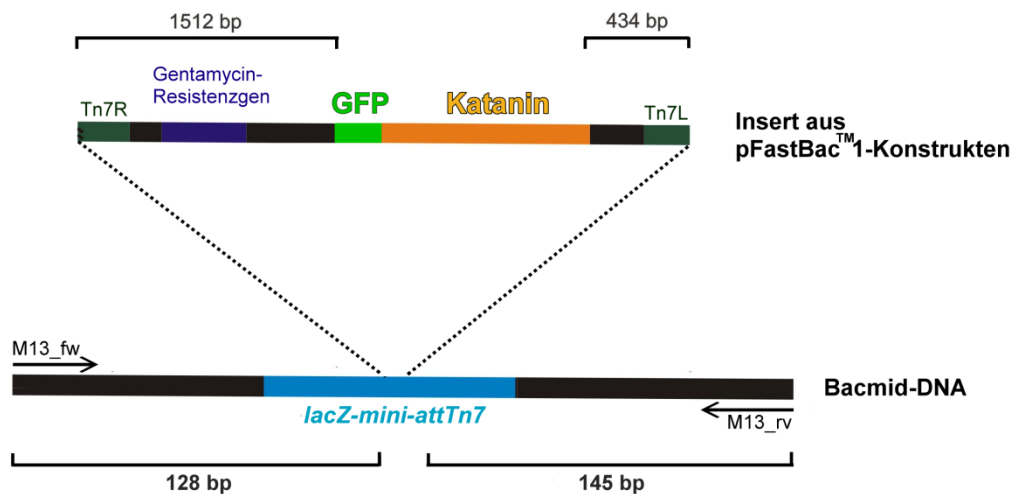


Abbildung IV. 29: Bestätigung der Rekombination via PCR.

Wie aus Abbildung IV.29 zu entnehmen ist, beträgt die zu erwartende Größe des PCR-Produkts bei Einsatz des *Primer*-Paares M13_fw/M13_rv: Länge des Konstrukts + ca. 2300 Basenpaare.

Transfektion der SF9-Zellen mit Bacmid-DNA – Schritt 6

Die rekombinante Bacmid-DNA wurde mit positiv geladenem Lipid Cellfectin®-Reagent (Invitrogen) gemischt, das die negativ geladene DNA maskiert um die Transfektion realisieren zu können. Das Cellfectin®-Reagent ist ein (1:1,5) (M/M) Liposomengemisch und enthält das kationische Lipid N,N',N'',N'''-Tetramethyl-N,N',N'',N'''-Tetrapalmitylspermin sowie Dioleoylphosphatidylethanolamin. Die mit Lipid bedeckte Bacmid-DNA infiltrierte die Sf-9 Zellen nach 5-stündiger Inkubation bei 27°C. Nach 72 Stunden wurde das amplifizierte Virus aus dem Medium abgeerntet. Die erste Virusgeneration wird als P₀ bezeichnet.

Amplifikation zum Erhalt der P₁ und P₂ Generation – Schritte 7/8

Zur Amplifikation des Virus wurden Sf9-Zellen (Lebendrate > 97%) bei einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml infiziert. Für die P₁-Amplifikation wurde ein Volumen von 100 µl P₀ Virus zu 100 ml Sf9-Zellen ($5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) hinzugefügt. Um die P₂-Amplifikationsstufe zu erhalten, kam es zum Einsatz von 25 µl P₁-Virus zu 100 ml Sf9-Zellen. Nachdem die Lebendrate der Sf9-Zellen unter 10% gesunken ist, wurde das amplifizierte Virus geerntet. Die virale Amplifikation nimmt einen

Zeitraum von etwa 7 Tagen in Anspruch. Das erhaltene Virus kann aufgrund seiner Stabilität mehrere Monate unter Lichtschutz und 4°C gelagert werden. Die erhaltene P₂-Amplifikationsstufe wurde für die Expression eingesetzt.

Proteinexpression – Schritt 9

Für die Proteinexpression wurden Sf9-Zellen (Lebendrate > 97%) mit einer Dichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml infiziert. Zu 250 ml Sf9-Zellen wurden 250 µl des P₂-Virus hinzugegeben. Die Proteinexpression dauerte 72 Stunden an.

IV.4.4.3 Transposition

Herstellung des Bacmid-Plasmids in DH10bac™-Zellen

Die chemisch kompetenten *E.coli* DH10Bac™-Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Für jede Transformation wurden 100 µl Zellen in ein steriles, 15 ml fassendes Falcon-Gefäß überführt. Die pFastBac™1-Plasmide (1 ng) wurden in einem finalen Volumen von 5 µl zu den kompetenten Zellen pipettiert und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach 45-sekündigem Hitzeschock im 42°C warmen Wasserbad wurden die Falcon-Gefäße für 2 weitere Minuten auf Eis inkubiert. 900 µl S.O.C. Medium wurden zu jedem Transpositionsansatz pipettiert und danach für 4 Stunden in einen 37°C warmen Schüttelinkubator (Edmund Bühler GmbH) platziert. Von den Zellen wurden unter Verwendung von S.O.C. Medium 3 Verdünnungsstufen (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 100 µl für das Ausstreichen auf LB^{Kana,Genta,Tetra}-Agarplatten benutzt, die bei der Herstellung mit 50 µg/ml Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin, 10 µg/ml Tetrazyclin, 100 µg/ml X-Gal und 40 µg/ml IPTG versetzt wurden. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurden Kolonien sichtbar, die allerdings noch keine Separation zwischen positiven und negativen Klonen zuließen. Für eine deutliche Ausprägung der blauen respektive weißen Farben wurden die Platten für weitere 48 Stunden im Brutschrank (VWR) inkubiert. Um den Phänotyp bestätigen zu können, wurden die positiven weißen Kolonien erneut auf selektiven Platten ausgestrichen. Bestätigte positive Kolonien wurden gepickt und bei 37°C über Nacht in selektivem LB^{Kana,Genta,Tetra}-Medium inkubiert.

Lösungen

1L S.O.C. Medium (pH 7,0)

20 g Bacto™ Trypton

5 g Bacto™ Hefeextrakt

0,5 g NaCl

250 mM KCl

10 mM MgCl₂

20 mM Glucose

Isolierung der rekombinanten Bacmid-DNA

Einzelne Kolonien, die nach der DH10Bac™-Transposition gewachsen sind, wurden gepickt und in selektives Medium gegeben. Die Zellen wurden in 6 ml LB^{Kana,Genta,Tetra}-Medium inklusive 50 µg Kanamycin, 7 µg/ml Gentamicin und 10 µg/ml Tetrazyclin über Nacht bis zur Sättigung gezüchtet. Die Zellen wurden durch 15-minütige Zentrifugation (Rotanta 460 R, Beckman Coulter) bei 1000 x *g* pelletiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 500 µl Pufferlösung aufgenommen, welche aus 15 mM Tris (pH 8,0), 10 mM EDTA (pH 8,0) und 5 µg RNase bestand. Die resuspendierten Zellen wurden durch Hinzufügen von 500 µl Lysepuffer aufgebrochen, welcher 0,2 M NaOH und 1% (w/v) SDS enthielt. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden vorsichtig 500 µl einer eiskalten 3 M Kaliumacetat-Lösung (pH 5,5) hinzupipettiert und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Der trübe Ansatz wurde in einer Tischzentrifuge (PerfectSpin 24 R, PEQLAB) für 10 Minuten bei 10000 x *g* behandelt. Der klare Überstand mit der Bacmid-DNA wurde in ein 15 ml Falcon-Gefäß transferiert, das vorher mit 1,6 ml eiskaltem Isopropanol befüllt wurde. Der Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und die präzipitierte DNA für 15 Minuten bei 10000 x *g* sedimentiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde mit 1 ml einer 70% Ethanol-Lösung gewaschen und durch erneute Zentrifugation für 5 Minuten bei 10000 x *g* repelletiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 30 µl H₂O gelöst. Die Plasmide wurden lichtgeschützt bei -20°C gelagert.

IV.4.4.4 Transfektion der SF9-Zellen mit der rekombinanten Plasmid-DNA

Präparation der SF9-Zellen für die Transfektion

Für jeden Transfektionsansatz wurden 2 ml Zellen mit einer Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml in eine Vertiefung einer 6-Well Zellkulturplatte (Sarstedt) pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Vorbereitung der Bacmid-DNA für den Transfektionsprozess

Für jede Transfektion wurden in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß 5 µg Bacmid-DNA mit 100 µl Sf-900™ II SFM-Medium (Invitrogen) gemischt (Ansatz 1). In einem weiteren Reaktionsgefäß wurden 100 µl Sf-900™ II SFM-Medium mit 6 µl Cellfectin® (Invitrogen) versetzt (Ansatz 2). Ansatz 2 wurde zu Ansatz 1 gegeben und für 45 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Inkubationszeit konnten die Sf9-Zellen an den Boden der Zellkulturplatte anbinden. Das Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Zellen konnten danach mit 2 ml des Sf-900™ II SFM-Mediums gewaschen werden. Nach der Abnahme des Waschmediums erfolgte die sofortige Zugabe der DNA-Lösung zu den adhärenierten Zellen. Die 6-Well Platte wurde für 5 Stunden bei 27°C in den Zellkultur-Inkubator (Mettler) gestellt. Nach Ablauf der Zeit wurde der Transfektionsansatz entfernt und die Zellen konnten mit 2 ml Sf-900™ II SFM-Medium inklusive 0,5 mg/ml Gentamicin und 5% fötalem Bovin-Serum (FBS, PAA) beschichtet werden. Das Abtrennen des Virus erfolgte nach 72-stündiger Inkubation bei 27°C. Das Virus wurde mit Hilfe eines 0,22 µm Spritzenfilters sterilfiltriert und anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Virale Amplifikation

Sf-900™ II SFM-Medium, das mit 0,5 mg/ml Gentamicin, 0.1% Fungizone® (Invitrogen) und 5% FBS versetzt worden ist, wurde für alle beschriebenen Amplifikationsschritte sowie für die Proteinexpression eingesetzt.

Zählen der SF9-Zellen und Bestimmung der Lebendzellrate

Die Rate wurde durch das Auszählen der Sf9-Zellen in einer Neubauer-Kammer (Paul Marienfeld GmbH) unter dem Mikroskop bestimmt. Zur Unterscheidung zwischen vitalen und toten Zellen erfolgte eine 10-fache Verdünnung der Zellen in einer 1:1 Mischung, bestehend aus PBS-Puffer und Trypan-Blau. Während gesunde Zellen den Farbstoff absondern können und deshalb als farblose, runde Strukturen mit dunklem Rand auftreten, erscheinen tote Zellen deformiert und dunkelblau gefärbt. Die Viabilität wird bestimmt, indem die Anzahl der toten Zellen durch die Gesamtanzahl an gesunden und toten Zellen dividiert wird.

Lösungen

1L (10X) PBS, pH 7,2

10,9 g Na₂HPO₄

3,2 g NaH₂PO₄

90 g NaCl

Virale Amplifikationsstufe P₁

Für die P₁-Amplifikation wurden 100 ml SF9-Zellen (Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) mit 100 µl P₀ Virus gemischt und in einen autoklavierten 500 ml Kolben transferiert. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 27°C in einem Schüttelinkubator (CERTOMAT® IS, Sartorius) gezüchtet. Nachdem die Viabilität der Sf9-Zellen unter 10% gefallen ist, erfolgte das Abernten des P₁-Virus. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 1000 x g pelletiert. Der Überstand wurde durch eine 0,22 µm Filtrationseinheit sterilfiltriert und das Virus anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Virale Amplifikationsstufe P₂

Für die P₂-Amplifikation wurden 100 ml SF9-Zellen (Dichte von $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml) mit 25 µl P₁ Virus gemischt und in einen autoklavierten 500 ml Kolben transferiert. Die Zellen wurden für 7 Tage bei 27°C in einem Schüttelinkubator gezüchtet. Das Abernten des P₂-Virus erfolgte, nachdem die Viabilität der Sf9-Zellen erneut unter 10% gefallen ist. Die Zellen wurden für 20 Minuten bei 1000 x g pelletiert. Der Überstand wurde durch eine 0,22 µm Filtrationseinheit sterilfiltriert und das Virus anschließend lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

IV.4.4.5 Proteinaufreinigung

Das folgende Protokoll bezieht sich auf die Extraktion von Katanin und *Coiled-Coil* Spastin aus Baculovirus-infizierten Sf9-Zellen in einem Kulturvolumen von 250 ml. Alle Vorgänge inklusive Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Sf9-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000 x g für 20 Minuten abgeerntet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 30 ml Puffer 1 resuspendiert. Die Zell-Lyse erfolgte mit Hilfe einer vorgekühlten *French® Pressure* Druckzelle (Fisher Scientific). Zur Abtrennung der Zelltrümmer vom Proteinüberstand wurde der Ansatz bei 50000 x g und 4°C für 40 Minuten zentrifugiert (Optima™ L-90K, Beckman Coulter). Während des Zentrifugationslaufs wurden 500 µl Anti-FLAG® M2 Säulenmaterial (Sigma-Aldrich) gewaschen und mit Puffer 1 äquilibriert. Der Proteinüberstand aus der Ultrazentrifuge wurde mit einem 0,2 µm Filtropur Spritzenfilter sterilfiltriert und in Kombination mit dem Säulenmaterial für 1 Stunde auf einem Überkopfröller im Kühlraum inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Ansatz gewaschen. Dazu wurde die Probe bei 4°C mit 1000 x g für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert. Der Ansatz wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und das in 1 ml Puffer 1 resuspendierte Säulenmaterial in ein steriles 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Der Waschvorgang mit Puffer 1 wurde so lange wiederholt bis der Überstand im Bradford-Test keine Blaufärbung mehr aufwies. Damit konnte sichergestellt werden, dass keine unspezifischen Proteine co-eluiert werden. Für den Elutionsvorgang wurden 0,2 mg/ml FLAG® Peptid (Invitrogen) in Puffer 1 verwendet.

Das Säulenmaterial wurde in 500 µl Puffer 2 resuspendiert, für 2 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert. Nach dem zweiten Elutionsschritt wurde vom Säulenmaterial kein Protein mehr eluiert. Das erhaltene Protein wurde aliquotiert, mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und im -80°C-Schrank gelagert. Zur Analyse der Reinheit wurde 1 Aliquot auf einem SDS-Gel analysiert.

Lösungen

Puffer 1

50 mM HEPES (pH 7,4)

300 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5% Glyzerin (v/v)

1 mM DTT

Puffer 2

50 mM HEPES (pH 7,4)

300 mM NaCl

5 mM MgCl₂

5% Glyzerin (v/v)

1 mM DTT

0,2 mg/ml Flag®-Peptid

IV.4.5 Analytische Gelfiltration

Mit Hilfe der analytischen Gelfiltration kann das Molekulargewicht von Proteinen bestimmt und damit eine Aussage über den Oligomerisierungszustand der Probe gemacht werden. Bei globulären Proteinen ist zwischen dem Logarithmus des Molekulargewichts und dem Elutionsvolumen ein linearer Zusammenhang gegeben. Deshalb kann das apparente Molekulargewicht eines Proteins durch Vergleich des Elutionsvolumens mit den Elutionsvolumina von Standardproteinen bestimmt werden. Zur Erstellung einer Kalibrierungsgeraden wurde eine analytische Superdex 200 HL 16/60 Säule (GE Healthcare, Volumen 120 ml) mit 1 Säulenvolumen Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine des LMW- und HMW-Gelfiltrations-Kalibrierungskits (GE Healthcare) nach Anweisung des Herstellers auf die Säule appliziert. Die Kalibrierungsgerade wurde durch Auftragung des Logarithmus des theoretischen Molekulargewichts gegen die Elutionszeit erstellt. Nach dem Eichvorgang wurden die Proteinproben über den Proben-Loop mit einem Volumen von jeweils 200 µl auf die Säule gebracht und bei identischer Flussrate wie die Standardproteine

(0,5 ml/min, max. Rückdruck 0,5 MPa) eluiert. Die Proteindetektion erfolgte durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch das Heranziehen der Kalibrierungsgeraden konnte das apparente Molekulargewicht der entsprechenden Proteinproben ermittelt werden.

Lösungen

Gelfiltrationspuffer

50 mM HEPES (pH 7,4)

300 mM NaCl

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

IV.4.6 Western-Blot

Mit der Methode des *Western-Blots* können Proteine in komplexen Proteingemischen spezifisch identifiziert und quantifiziert werden. Nach der Separation der Proteine in der SDS-PAGE werden diese auf eine Membran transferiert. Nach der Immobilisierung erfolgt die Inkubation mit einem spezifischen Antikörper. Die Detektion erfolgt durch einen zweiten Antikörper, der entweder an ein Enzym (Peroxidase, Phosphatase) gekoppelt oder radioaktiv markiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Volllängen-Protein Katanin mittels *Western-Blot* nachgewiesen. Als erster Antikörper kam Anti-FLAG® (Sigma-Aldrich) zum Einsatz. Als zweiter Antikörper diente Anti-Kaninchen IgG gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase (Thermo Scientific). Nach Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-PAGE erfolgte der Transfer auf eine PVDF Membran (Millipore) bei 2,5 mA/cm² für 60 Minuten in Transfer-Puffer im *Semi-Dry* Verfahren. Um die Membran zu aktivieren, wurde sie vor dem Einsatz für wenige Sekunden in 100% Methanol inkubiert. Um den Transfer der Proteine überprüfen und die Banden des Proteinstandards markieren zu können, wurde die Membran nach Beendigung des *Blot*-Vorgangs reversibel mit Ponceau-S Lösung (Sigma-Aldrich) angefärbt. Nach dem Entfärben der Membran mit Wasser erfolgte das Blockieren freier Bindestellen. Dies geschah durch Inkubation der Membran in 50 ml Blockpuffer für 1 Stunde. Nach anschließender Inkubation in 50 ml Blockpuffer mit dem ersten Antikörper in einer 1:8000 Verdünnung wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten in jeweils 50 ml PBST gewaschen. Die Inkubation mit dem zweiten Antikörper erfolgte ebenfalls in 50 ml PBST in einer 1:4000 Verdünnung für 1 Stunde. Abschließend wurde die Membran erneut 3-mal für 10 Minuten in jeweils 50 ml PBST gewaschen. Die Anfärbung wurde durch kurzes Schwenken in 5 ml TMB-Membran-Peroxidase Substrat (KPL) realisiert. Sobald Banden auftraten wurde die Reaktion mit H₂O abgestoppt. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Lösungen**1x PBS****PBST**

1x PBS

0,1 % Tween (v/v)

Blockpuffer

PBST

5 % Magermilchpulver (w/v)

Transferpuffer

20 mM Tris

200 mM Glycin

20 % Methanol

IV.5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung IV. 1: Modell für den <i>Severing</i> -Vorgang durch Katanin.	133
Abbildung IV. 2: Konstruktion der pFastBac™1-Plasmide.....	138
Abbildung IV. 3: Überprüfung der PCR-Produkte.	139
Abbildung IV. 4: PCR-Analyse der Bacmid-DNA.	140
Abbildung IV. 5: Aufreinigung von Katanin.....	141
Abbildung IV. 6: Vergleich der Aminosäuren bekannter Katanin- <i>p60</i> Konstrukte.	142
Abbildung IV. 7: Verwendete Katanin-Konstrukte.....	143
Abbildung IV. 8: Cosedimentationsanalysen mit den hergestellten <i>Kat</i> - Konstrukten.....	144
Abbildung IV. 9: Struktur von humanem Katanin E309Q.	145
Abbildung IV. 10: Überprüfung der Oligomerisierung durch analytische Gelfiltration.	146
Abbildung IV. 11: Oligomerisierung der <i>Kat</i> -Konstrukte.	147
Abbildung IV. 12: ATPase-Raten und Mikrotubuli- <i>Severing</i> Aktivität der generierten Katanin-Konstrukte.	148
Abbildung IV. 13: GFP-Katanin diffundiert am Mikrotubulus entlang.	150
Abbildung IV. 14: Lokalisation von GFP-Katanin auf dem Mikrotubulus während des Schneideprozesses.	151
Abbildung IV. 15: Quantitative Analyse des Mikrotubuli- <i>Severing</i> Vorgangs....	152
Abbildung IV. 16: GFP-Katanin depolymerisiert Mikrotubuli.....	154
Abbildung IV. 17: Bindung von Katanin an Hybrid-Mikrotubuli.....	156
Abbildung IV. 18: Salze beeinflussen die Bindung von Katanin an Mikrotubuli.	157
Abbildung IV. 19: Dekoration segmentierter GMPCPP/GDP-Mikrotubuli mit GFP- Katanin.	159
Abbildung IV. 20: Katanin erzeugt stumpfe Enden an Mikrotubuli.	161
Abbildung IV. 21: Die Dynamik von GFP-Katanin hängt vom Nukleotid-Status ab.	162
Abbildung IV. 22: <i>Photobleaching</i> und Analyse der Fluoreszenzintensitäten von GFP-Katanin.	163
Abbildung IV. 23: Bestimmung der Katanin-Bindekapazität am Mikrotubulus unter Einfluss verschiedener Nukleotide.	165
Abbildung IV. 24: Zusammenfassung der durchgeführten Cosedimentationsmessungen.....	166
Abbildung IV. 25: Struktur und Oligomerisierung von Katanin.....	167
Abbildung IV. 26: Überblick über die Schritte, die in das Bac-to-Bac® Baculovirus Protein-Expressionssystem involviert sind.	172
Abbildung IV. 27: Karte des pFastBac™1 Donor-Plasmids (Invitrogen).	173
Abbildung IV. 28: Herstellung von rekombinantem Baculovirus	173
Abbildung IV. 29: Bestätigung der Rekombination via PCR	174

IV.6 Literaturverzeichnis

- Abal, M., M. Piel, et al. (2002). "Microtubule release from the centrosome in migrating cells." *J Cell Biol* **159**(5): 731-737.
- Ahmad, F. J., W. Yu, et al. (1999). "An essential role for katanin in severing microtubules in the neuron." *J Cell Biol* **145**(2): 305-315.
- Baas, P. W., A. Karabay, et al. (2005). "Microtubules cut and run." *Trends Cell Biol* **15**(10): 518-524.
- Best, A., S. Ahmed, et al. (1996). "The Ras-related GTPase Rac1 binds tubulin." *J Biol Chem* **271**(7): 3756-3762.
- Burk, D. H., B. Liu, et al. (2001). "A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation." *Plant Cell* **13**(4): 807-827.
- Buster, D. W., D. Zhang, et al. (2007). "Poleward tubulin flux in spindles: regulation and function in mitotic cells." *Mol Biol Cell* **18**(8): 3094-3104.
- Chan, J., G. M. Calder, et al. (2003). "EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis." *Nat Cell Biol* **5**(11): 967-971.
- Clandinin, T. R. and P. E. Mains (1993). "Genetic studies of mei-1 gene activity during the transition from meiosis to mitosis in *Caenorhabditis elegans*." *Genetics* **134**(1): 199-210.
- Clark-Maguire, S. and P. E. Mains (1994). "Localization of the mei-1 gene product of *Caenorhabditis elegans*, a meiotic-specific spindle component." *J Cell Biol* **126**(1): 199-209.
- Clark-Maguire, S. and P. E. Mains (1994). "mei-1, a gene required for meiotic spindle formation in *Caenorhabditis elegans*, is a member of a family of ATPases." *Genetics* **136**(2): 533-546.
- Davis, L. J., D. J. Odde, et al. (2002). "The importance of lattice defects in katanin-mediated microtubule severing in vitro." *Biophys J* **82**(6): 2916-2927.
- Desai, A., S. Verma, et al. (1999). "Kin I kinesins are microtubule-destabilizing enzymes." *Cell* **96**(1): 69-78.
- Gieseke, A. (2008). Molekulare Grundlagen der Hereditären Spastischen Paraplegie. *Fakultät für Biologie München*, Ludwigs-Maximilian-Universität. **Diplomarbeit: 83.**
- Hartman, J. J., J. Mahr, et al. (1998). "Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit." *Cell* **93**(2): 277-287.
- Hartman, J. J. and R. D. Vale (1999). "Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin." *Science* **286**(5440): 782-785.
- Karabay, A., W. Yu, et al. (2004). "Axonal growth is sensitive to the levels of katanin, a protein that severs microtubules." *J Neurosci* **24**(25): 5778-5788.
- Lu, C. and P. E. Mains (2007). "The *C. elegans* anaphase promoting complex and MBK-2/DYRK kinase act redundantly with CUL-3/MEL-26 ubiquitin ligase to degrade MEI-1 microtubule-severing activity after meiosis." *Dev Biol* **302**(2): 438-447.
- Mains, P. E., K. J. Kemphues, et al. (1990). "Mutations affecting the meiotic and mitotic divisions of the early *Caenorhabditis elegans* embryo." *Genetics* **126**(3): 593-605.
- McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). "Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules." *Cell* **75**(3): 419-429.

- McNally, K., A. Audhya, et al. (2006). "Katanin controls mitotic and meiotic spindle length." *J Cell Biol* **175**(6): 881-891.
- McNally, K. P., D. Buster, et al. (2002). "Katanin-mediated microtubule severing can be regulated by multiple mechanisms." *Cell Motil Cytoskeleton* **53**(4): 337-349.
- McNally, K. P. and F. J. McNally (2011). "The spindle assembly function of *Caenorhabditis elegans* katanin does not require microtubule-severing activity." *Mol Biol Cell* **22**(9): 1550-1560.
- Mennella, V., G. C. Rogers, et al. (2005). "Functionally distinct kinesin-13 family members cooperate to regulate microtubule dynamics during interphase." *Nat Cell Biol* **7**(3): 235-245.
- Murata, T., S. Sonobe, et al. (2005). "Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants." *Nat Cell Biol* **7**(10): 961-968.
- Nakamura, M., D. W. Ehrhardt, et al. (2010). "Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array." *Nat Cell Biol* **12**(11): 1064-1070.
- Qiang, L., W. Yu, et al. (2006). "Tau protects microtubules in the axon from severing by katanin." *J Neurosci* **26**(12): 3120-3129.
- Qiang, L., W. Yu, et al. (2010). "Basic fibroblast growth factor elicits formation of interstitial axonal branches via enhanced severing of microtubules." *Mol Biol Cell* **21**(2): 334-344.
- Rath, U., G. C. Rogers, et al. (2009). "The *Drosophila* kinesin-13, KLP59D, impacts Pacman- and Flux-based chromosome movement." *Mol Biol Cell* **20**(22): 4696-4705.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2006). "Making more microtubules by severing: a common theme of noncentrosomal microtubule arrays?" *J Cell Biol* **175**(6): 849-851.
- Shaw, S. L., R. Kamyar, et al. (2003). "Sustained microtubule treadmill in *Arabidopsis* cortical arrays." *Science* **300**(5626): 1715-1718.
- Sonbuchner, T. M., U. Rath, et al. (2010). "KL1 is a novel microtubule severing enzyme that regulates mitotic spindle architecture." *Cell Cycle* **9**(12): 2403-2411.
- Srayko, M., D. W. Buster, et al. (2000). "MEI-1/MEI-2 katanin-like microtubule severing activity is required for *Caenorhabditis elegans* meiosis." *Genes Dev* **14**(9): 1072-1084.
- Srayko, M., T. O'Toole E, et al. (2006). "Katanin disrupts the microtubule lattice and increases polymer number in *C. elegans* meiosis." *Curr Biol* **16**(19): 1944-1949.
- Stoppin-Mellet, V., J. Gaillard, et al. (2003). "Plant katanin, a microtubule severing protein." *Cell Biol Int* **27**(3): 279.
- Sudo, H. and P. W. Baas (2010). "Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts." *J Neurosci* **30**(21): 7215-7226.
- Sudo, H. and P. W. Baas (2011). "Strategies for diminishing katanin-based loss of microtubules in tauopathic neurodegenerative diseases." *Hum Mol Genet* **20**(4): 763-778.
- Sudo, H. and Y. Maru (2008). "LAPSER1/LZTS2: a pluripotent tumor suppressor linked to the inhibition of katanin-mediated microtubule severing." *Hum Mol Genet* **17**(16): 2524-2540.
- Toyo-Oka, K., S. Sasaki, et al. (2005). "Recruitment of katanin p60 by phosphorylated NDEL1, an LIS1 interacting protein, is essential for mitotic cell division and neuronal migration." *Hum Mol Genet* **14**(21): 3113-3128.

- Waterman-Storer, C. M., R. A. Worthylake, et al. (1999). "Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts." Nat Cell Biol **1**(1): 45-50.
- Westermann, S., H. W. Wang, et al. (2006). "The Dam1 kinetochore ring complex moves processively on depolymerizing microtubule ends." Nature **440**(7083): 565-569.
- Ye, X., Y. C. Lee, et al. (2012). "Aberrant expression of katanin p60 in prostate cancer bone metastasis." Prostate **72**(3): 291-300.
- Zhang, D., K. D. Gode, et al. (2011). "Drosophila katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration." Nat Cell Biol **13**(4): 361-370.

V Gekoppelte Diskussion

V.1 Kinetik

Viele Aspekte deuten darauf hin, dass das Mikrotubuli-schneidende AAA-Protein Spastin seine Aktivität in Form eines Hexamers ausübt. Der zentralen Pore wird dabei eine Schlüsselrolle im *Severing*-Prozess zugeordnet (White, Evans et al. 2007; Roll-Mecak und Vale 2008). Nach dem postulierten Modell transferiert Spastin die aus der ATP-Hydrolyse entstandene freie Enthalpie in die zentrale Pore, welche die mechanische Arbeit ausübt. Diese Prozedur benötigt mit hoher Wahrscheinlichkeit einen adäquaten Grad an Koordination und erfordert zugleich eine entsprechende Interaktionsfähigkeit der einzelnen Spastin-Untereinheiten. Diese wichtigen Themen wurden in bisherigen Analysen nicht explizit beleuchtet. Für den Oligomerisierungsprozess können unterschiedliche Modelle in Frage kommen. Zum einen könnte man sich vorstellen, dass alle sechs Untereinheiten ihren kinetischen Zyklus synchronisieren müssen, damit mechanische Arbeit auf den Mikrotubulus ausgeübt werden kann. Andererseits könnten die Untereinheiten unabhängig voneinander ATP hydrolysieren, so dass keine kinetische Kopplung erforderlich ist. Die Schwierigkeit von Spastin liegt in seinem komplexen Oligomerisierungsverhalten. Es konnte gezeigt werden, dass die katalytisch inaktive Form von Spastin, E442Q, in Gegenwart von ATP stabile Hexamere bildet (White, Evans et al. 2007; Roll-Mecak und Vale 2008). Umgekehrt ist jedoch unbekannt, ob die Hexamerisierung eine Voraussetzung für das Auslösen des katalytischen Zyklus ist. Es konnte gezeigt werden, dass Wildtyp-Spastin durch die mutierte Version in seiner ATPase-Rate inhibiert wird. Diese Beobachtung macht deutlich, dass mindestens zwei Untereinheiten für das Erreichen der maximalen ATP-Umsatzrate benötigt werden. Diese Aussage wird von durchgeführten ATPase-Studien gestützt, welche zeigten, dass die Aktivität von Spastin mit steigenden Mikrotubuli-Konzentrationen in einen Sättigungsbereich übergeht. Diese Befunde sind Indikatoren dafür, dass Oligomerisierung eine Voraussetzung für den katalytischen Zyklus darstellt. Es bleibt allerdings unklar, ob dafür alle sechs Untereinheiten miteinander interagieren müssen, oder ob bereits ein geringer Anteil an Untereinheiten ausreichend ist. Aus den durchgeführten quantitativen Analysen kann die minimale Anzahl an interagierenden Einheiten abgeleitet werden. Mehrere Ergebnisse deuten darauf hin, dass zwei interagierenden Untereinheiten eine besonders wichtige Rolle zukommt. Erstens zeigen kinetische Experimente eine Kooperativität der ATP- und der Mikrotubuli-abhängigen ATPase-Raten mit einem Hill-Koeffizienten, der nicht signifikant höher ist als 2. Obwohl das Hill-Modell eine Vereinfachung darstellt, ist es für die Interpretation adäquat, weil es bei der Analyse ein geringeres Limit hinsichtlich der Anzahl an kooperativen Untereinheiten akzeptiert. Zudem ist erwähnenswert, dass sowohl die ATP- als auch die Mikrotubuli-Abhängigkeit nicht mit Hilfe des Michaelis-Menten Modells erklärt werden kann. Daraus folgt, dass ATP- und Mikrotubuli-Interaktion für einen

Liganden über mindestens zwei Untereinheiten realisiert wird. Das zweite starke Argument, welches für Nachbar-Interaktion spricht, ist der durch das ATP-Analogon ATP- γ S beobachtete inhibitorische Effekt auf die maximale ATP-Umsatzrate. Dieses Phänomen kann ebenfalls am besten mit dem Modell zweier interagierender Untereinheiten erklärt werden. Ein drittes Argument, welches das vorgeschlagene Nachbar-Modell unterstützt, lieferten die durchgeführten Inhibitionsmessungen. Die Abhängigkeit der ATP-Umsatzrate von der Konzentration an hinzugegebener Mutante deutet auf einen allosterischen Effekt einer Untereinheit auf eine seiner Nachbar-Untereinheiten hin. Alternative Modelle, die davon ausgehen, dass eine oder mehrere defekte Untereinheiten die komplette Aktivität des hexameren Rings inhibieren, sind mit den erhaltenen Daten nicht vereinbar (Abbildung III.8).

Die Interpretation der erhaltenen Daten zielt in folgende Richtung: der ATP-Umsatz in einer Untereinheit ist Voraussetzung für die Aktivierung des katalytischen Umsatzes in einer der Nachbar-Untereinheiten mit der Rate $k_{\text{cat,WT}}$. Wie sich die einzelnen Untereinheiten in einem Ringkomplex verhalten, ist noch unklar. Man kann sich im Extremfall eine wiederkehrende Abfolge von Hydrolysevorgängen entlang des Rings oder einen gleichzeitigen, synchronisierten Zyklus aller vorhandenen Untereinheiten vorstellen. Alternativ dazu könnte der katalytische Vorgang während der Assemblierung der Hexamere eingeleitet werden, wobei das Hinzukommen einzelner Untereinheiten das Enzym auf die nächste kinetische Stufe überführen könnte. Eine sehr auffällige Beobachtung bestand darin, dass Wildtyp-Spastin eine hohe Sensitivität gegenüber mutierten Untereinheiten aufwies. Bereits ein Anteil von 15 bis 30% inaktiver Untereinheiten führte zur halbmaximalen Inhibition der Wildtyp ATPase-Rate. In der *Severing*-Studie war der Effekt der mutierten Version auf den Wildtyp noch deutlicher. So konnte bereits ein E442Q-Anteil von unter 5% die maximal detektierte *Pre-Severing* Rate um die Hälfte reduzieren. Möglicherweise beeinträchtigt die Mutante den Mikrotubuli-Interaktionsprozess. Andererseits könnte die chemo-mechanische Kopplung sehr schwach ausgeprägt sein, was mit der Beobachtung konsistent ist, dass für das Auftreten eines *Severing*-Ereignisses eine große Anzahl an ATP-Hydrolyseschritten erforderlich ist. Es ist unklar, warum dieser extreme Inhibitionseffekt auftritt. Er zeigt jedoch, warum HSP-Patienten mit hydrolysedefizientem Spastin auf derartig eklatante Weise betroffen sind: aufgrund der festeren Kopplung zwischen mutierten- und Wildtyp-Untereinheiten beeinträchtigen bereits substöchiometrische Mengen an Mutante den Wildtyp auf dramatische Weise. Im Hinblick auf klinische Behandlungsformen könnte man versuchen Bindungspartner zu suchen, welche die erhöhte Affinität ausnutzen um die pathogene Form zu inaktivieren. Die präsentierten Folgerungen zeigen sowohl Ähnlichkeiten als auch Unterschiede zu anderen AAA-ATPasen. Zu den gut charakterisierten AAA-Proteinen gehören die SV40-Helikase sowie ClpX, eine Proteinentfaltungs-ATPase. Aus der Kristallstruktur kann abgeleitet werden, dass die sechs Untereinheiten der SV40-Helikase in einem konzertierten Vorgang arbeiten. So kann die ATP-Hydrolyse erst nach Bestückung aller Untereinheiten mit einem Liganden ausgelöst werden (Gai, Zhao et al. 2004). Für

ClpX wird dagegen ein Mechanismus beschrieben, der auf einer unkoordinierten Aktivierung zufälliger Untereinheiten basiert (Martin, Baker et al. 2005). Martin et al. konnten durch die kovalente Verknüpfung von sechs Monomeren ATP-Hydrolyse im Hexamer untersuchen. Sie zeigten, dass ClpX für die Translokationsaktivität lediglich eine Untereinheit mit ATPase-Aktivität erfordert. Für den Fall, dass mehrere aktive Monomere zur Verfügung standen, konnten diese für die Ausführung der Funktion eine beliebige Stelle innerhalb des Rings einnehmen. Dies ist ein Indikator dafür, dass ClpX hinsichtlich der ATP-Hydrolyse weniger eine organisierte als vielmehr eine zufällig geordnete Abfolge favorisiert. Die beobachtete Kooperativität zweier Spastin-Untereinheiten ist mit keinem dieser beiden Beobachtungen (SV40, ClpX) in Einklang zu bringen. Das durch inaktive Untereinheiten erhaltene Inhibitions muster deutet auf keinen dominant-negativen Einfluss einer mutierten Untereinheit auf den kompletten Ring hin. Diese Auswirkung könnte man im Fall der SV40-Helikase erwarten, da bei dieser AAA-ATPase alle Liganden parallel hydrolysiert werden. Auch der ClpX-Mechanismus weicht vom beschriebenen Kooperativitätsmodell zweier Untereinheiten im Spastin-Hexamer ab.

V.2 Analyse der generierten Katanin-Domänen

Anhand eines Aminosäuresequenzvergleichs zwischen Katanin-Versionen unterschiedlicher Organismen wurde *p60* in drei signifikante Domänen unterteilt. Dabei wurden die hergestellten Einzel- und Kombinationsdomänen in Studien eingesetzt, die sich hauptsächlich auf die Mikrotubuli-Interaktion und die Fähigkeit zur Bildung von Oligomeren bezogen. Die Daten zeigten, dass für Mikrotubuli-Bindung eine am N-Terminus lokalisierte Domäne ausreichend ist, die sich aus den Aminosäuren 56-181 (*Kat2*) zusammensetzt. Dieser Befund entspricht Ergebnissen, die in früheren Publikationen unter Verwendung von Katanin aus dem Seeigel und *A. thaliana* beschrieben wurden (McNally und Vale 1993; Stoppin-Mellet, Gaillard et al. 2007). Um den Oligomerisierungsgrad der generierten Domänen analysieren zu können, wurden Gelfiltrationsstudien und *Cross-Linking* Experimente durchgeführt. Anhand dieser Methoden konnte gezeigt werden, dass Konstrukte, welche die identifizierte MT-Bindedomäne *Kat2* enthalten, zur Ausbildung von Multimeren fähig sind. Die Ergebnisse ergaben somit, dass der N-Terminus neben der Interaktion mit Mikrotubuli auch intramolekulare Interaktionen eingehen kann. Tatsächlich ist die Mikrotubulus-Bindedomäne von Katanin in der Lage Trimere zu formen, während die hydrolysedefiziente E309Q-Mutante in Anwesenheit von ATP Ringstrukturen mit einer zentralen Pore ausbildet. Die beobachteten Ringe sind in Form und Größe zu Seeigel Katanin sehr ähnlich und haben einen Durchmesser zwischen 12 und 15 nm (Hartman, Mahr et al. 1998). Diese Resultate deuten stark darauf hin, dass die identifizierte Mikrotubuli-Bindedomäne in den Oligomerisierungsvorgang von humanem Katanin involviert ist. Es konnte gezeigt werden, dass die *Severing-*

Rate von tierischem Katanin mit der Ausbildung von hexameren Ringstrukturen korreliert (Hartman und Vale 1999). Unter der Annahme, dass die aktive Form von humanem Katanin ebenfalls ein Hexamer darstellt, kann man sich vorstellen, dass die Oligomerisierung der katalytischen Untereinheit in mindestens zwei Schritten erfolgt: (i) die Bildung eines Trimers und (ii) anschließende Kopplung zweier Trimer-Untereinheiten zu einem aktiven Hexamer. *Cross-Linking* Experimente mit EDAC unterstützen dieses Modell und zeigten ebenfalls eine stabile Zwischenstufe. Unter den analysierten Domänen scheint ausschließlich die N-terminale Domäne *Kat1* keine spezifische Funktion zu übernehmen. Diese Domäne bindet weder Mikrotubuli, noch beeinflusst sie die Interaktion der Bindedomäne mit Mikrotubuli. Dies kann von den erhaltenen K_D -Werten abgeleitet werden, die bei den Konstrukten *Kat12* und *Kat2* keine großen Unterschiede aufweisen (Abbildung IV.8). Domäne *Kat1* scheint auch für die Oligomerisierung nicht essentiell zu sein, da das Konstrukt *Kat23* in der Lage ist, Mikrotubuli effizient abzubauen. Es ist vorstellbar, dass humanes *Kat1* - obwohl die Domäne auf die *Severing*-Aktivität keinen Einfluss hat - eine respektive mehrere Stufen im Mikrotubuli-Binde-, Oligomerisierungs- oder ATP-Hydrolyse-Zyklus begünstigt. Die verwendeten Methoden könnten für die Detektion einer derartigen Feinregulierung allerdings nicht sensitiv genug gewesen sein. Die N-terminale Domäne *Kat1* könnte auch in den Rekrutierungsprozess anderer Katanin-regulierender Proteine involviert sein, wie für tierisches Katanin bereits berichtet wurde (McNally, Bazirgan et al. 2000) oder für die Stabilität höherer Strukturen eine Bedeutung haben. Dieses Phänomen konnte für p97/VPC gezeigt werden, bei dem das N-terminal lokalisierte *Linker*-Motiv für die Hexamerisierung eine essentielle Funktion ausübt (Wang, Song et al. 2003). Zusammenfassend haben die durchgeführten Analysen demonstriert, dass zwei Domänen für die Funktionalität von humanem Katanin essentiell sind: (i) eine N-terminale Bindedomäne (AS 56-180), die zur Interaktion mit dem Mikrotubulus befähigt und eine Funktion im Oligomerisierungsprozess wahrnimmt sowie (ii) eine C-terminale katalytische Domäne (AS 181-491), die für ATP-Bindung und Hydrolyse erforderlich ist.

V.3 Einzelmolekülmessungen mit GFP-Spastin und GFP-Katanin

Die Etablierung von Einzelmolekülmessungen ermöglichte es, wichtige Informationen hinsichtlich der Bindung, Mobilität und des *Severing*-Verhaltens von GFP-Spastin und GFP-Katanin zu erhalten. Das N-terminal lokalisierte Fluoreszenzprotein GFP scheint dabei keinen negativen Einfluss auf die Funktionsweise der beiden Proteine zu haben, da *Severing*-Raten und Eintritt von *Severing*-Ereignissen in mikroskopischen Experimenten sehr ähnlich zu denen von unmarkiertem Enzym waren. Trotz dieser Ähnlichkeit gab es deutliche Unterschiede zwischen Katanin und Spastin. Wie bereits zuvor publiziert, hängen die *Severing*- und Depolymerisationsraten bei Katanin von der Konzentration an

eingesetztem Protein sowie vom Nukleotid ab (Diaz-Valencia, Morelli et al. 2011). Die Ergebnisse zeigen, dass bei Katanin die berechnete Hydrolyserate bei hohen Konzentrationen (200 nM) eine Inhibition erfährt. Die Daten könnten aber trügen, weil es Hinweise auf Proteinaggregation gibt. Vor Einsatz des Proteins in *Severing*-Experimente wurden die Proben zentrifugiert, um störende Aggregate aus dem Ansatz zu entfernen. Nach diesem Schritt konnten in den Zentrifugenröhrchen grün-leuchtende Pellets wahrgenommen werden, welche mit erhöhter Proteinkonzentration verstärkt auftraten. GFP-Katanin scheint somit bei höheren Konzentrationen zu verstärkter Aggregation zu tendieren. Bei Spastin konnte mit erhöhten Konzentrationen ein sukzessiver Anstieg der berechneten ATP-Umsatzrate registriert werden. Die höchste gemessene Mikrotubuli-*Severing*-Aktivität lag bei 1000 nM Spastin mit $78,9 \cdot 10^{-3}$ Ereignissen/ $(\mu\text{m} \cdot \text{s})$. Im Gegensatz zu Katanin konnten für Spastin keine Bedingungen gefunden werden, unter denen Depolymerisation an den Mikrotubuli-Enden erfolgte. Dies ist ein Indikator dafür, dass Spastin keine besondere Interaktion mit einem der beiden Mikrotubulus-Enden eingeht, sondern eine Präferenz für das B-Gitter hat. Ein Aggregationsverhalten, wie für GFP-Katanin bei hohen Konzentrationen beschrieben wurde, konnte im Fall von Spastin nicht beobachtet werden.

V.3.1 Bewegung von Spastin und Katanin am Mikrotubulus

Ein wichtiger Befund der Einzelmolekülmessungen bestand darin, dass Spastin und Katanin-Untereinheiten mit Mikrotubuli interagieren und nach der Bindung an MT-Filamente 1D Diffusion zeigen. Der Diffusionskoeffizient der beiden Enzyme war sehr ähnlich und lag für Spastin bei $0,0126 \mu\text{m}^2/\text{s}$, während Katanin einen Koeffizienten von $0,0116 \mu\text{m}^2/\text{s}$ aufwies. Die ermittelten Diffusionskoeffizienten sind damit um den Faktor ≈ 5 höher als der für p150^{Glued} Dynactin bestimmte Wert (Culver-Hanlon, Lex et al. 2006). Im Vergleich dazu zeigt zytoplasmatisches Dynein - ebenfalls ein Vertreter der Mikrotubuli-assoziierten AAA-Enzyme - eine zu Spastin und Katanin sehr ähnliche Diffusionsgeschwindigkeit (Wang und Sheetz 1999). Schnellere Diffusion weisen dagegen KIF1A (Okada und Hirokawa 1999) mit $0,044 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und die Mikrotubuli-Depolymerase MCAK (Helenius, Brouhard et al. 2006) mit einem Diffusionskoeffizienten von $0,38 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf. Möglicherweise besitzt MCAK eine größere Anzahl an basischen Aminosäuren, wodurch die sehr schnelle Bewegung am Mikrotubulus erklärt werden könnte. Die Analyse zahlreicher Partikel machte deutlich, dass sich Spastin und Katanin nicht gerichtet bewegen. Daraus resultierend verändern beide Proteine häufig die Richtung, so dass beide Seiten des Mikrotubulus erreicht werden können. Warum sollten Spastin und Katanin eindimensionale Diffusion gegenüber einen durch Motoren angetriebenen, gerichteten Bewegungsprozess bevorzugen? Ein Vorteil besteht darin, dass durch die ungerichtete Bewegung beide Hälften des Mikrotubulus erreicht werden können. Somit können Defekte auf dem kompletten Filament gefunden und durch das Entfernen von Tubulin-Dimeren ausgeweitet werden. Weiterhin ist möglich, dass

durch den ungerichteten Prozess Oligomerisierungsvorgänge am Mikrotubulus begünstigt werden (siehe Abbildung V.7). Durch die diffusive Bewegung können zudem kürzere Distanzen wesentlich schneller überbrückt werden, als das über den gerichteten Bewegungsprozess möglich wäre. Diffusion erfordert keine Energie, so dass diese Art der Bewegung einen sehr effizienten Vorgang darstellt (Wang und Sheetz 1999; Walker, Burgess et al. 2000; Blainey, van Oijen et al. 2006; Culver-Hanlon, Lex et al. 2006; Cooper und Wordeman 2009).

V.3.2 Spastin erkennt Defekte im Mikrotubulus

Auffällig war die Beobachtung, dass Spastin und Katanin den Mikrotubulus nicht gleichmäßig gebunden haben. Selbst bei hohen Proteinkonzentrationen gab es bevorzugte Binderegionen, so dass im TIRF an spezifischen Stellen stark fluoreszierende Ansammlungen von GFP-Protein wahrgenommen werden konnten. Diese Beobachtung legt nahe, dass spezifische Stellen, welche Defekte oder posttranslational modifizierte Tubulin-Dimere aufweisen, bevorzugt gebunden werden. In den durchgeführten Messungen wurde Tubulin verwendet, das aus Schweinehirnen extrahiert wurde. Es ist gut vorstellbar, dass posttranslationale Modifikationen die Aktivität von GFP-Spastin und GFP-Katanin regulieren. Dieser Ansatz wird durch zelluläre Studien unterstützt die zeigen, dass Katanin eine Präferenz für acetylierte Mikrotubuli hat (Sudo und Baas 2010). Zukünftige Versuche mit einheitlich modifizierten Mikrotubuli könnten zeigen, welchen Einfluss posttranslationale Modifikationen tatsächlich auf Spastin und Katanin haben. Um herauszufinden, ob Spastin an defekten Stellen im Mikrotubulus bevorzugt bindet, wurden GMPCPP-Elemente in das Filament eingebaut. Zu diesem Zweck wurden segmentierte Mikrotubuli mit hellen GMPCPP-Nukleationskeimen und schwach markiertem GDP-Tubulin eingesetzt. Studien haben gezeigt, dass 96% der erzeugten GMPCPP-Mikrotubuli bei der *in vitro* Polymerisation aus 14 Protofilamenten bestehen (Hyman, Chretien et al. 1995). Zudem führt die Polymerisation von Mikrotubuli unter Einfluss von Taxol zum Erhalt von 12 bis 13 Protofilamenten (Arnal und Wade 1995). Deshalb enthielten die hergestellten Segment-Mikrotubuli einen Protofilament-Übergang an den Grenzen zwischen GMPCPP- und GDP-Tubulin. Durchgeführte Messungen mit segmentierten Mikrotubuli zeigten, dass GFP-Spastin wesentlich häufiger an Grenzen bindet (Abbildung III.24). Dabei war auffällig, dass in diesen Regionen häufig *Cluster*-Bildung auftrat, was nahelegt, dass an den GTP/GDP-Tubulin Grenzen mehrere Spastin-Strukturen miteinander kooperieren. Eine interessante Form von Kooperativität konnten Varga et al. für die Kinesin-8 Depolymerasen zeigen. Die Zusammenarbeit zahlreicher Enzym-Moleküle am Mikrotubulus-Ende ist dabei Voraussetzung für einen schnellen MT-Abbauprozess (Varga, Leduc et al. 2009). Eine Ansammlung von Spastin-Molekülen an den GTP/GDP-Tubulin Grenzen könnte zu einem ähnlichen kooperativen Effekt innerhalb des Filaments führen. Dies würde erklären, warum die ermittelte Schnittrate an den Grenzen um den Faktor 4 höher lag als am Restfilament. Es kann jedoch nicht kategorisch ausgeschlossen werden, dass Spastin eine Präferenz für Segmente hat, die durch

einen Nukleotidwechsel von GTP zu GDP gekennzeichnet sind. Diese Art der Detektion wäre hochinteressant, da es sich um eine völlig neue Form von Lokalisation handeln würde.

V.3.3 Depolymerisationsverhalten von Katanin

Ein weiteres Augenmerk lag auf der Analyse der Morphologie von Mikrotubuli-Enden. Elektronenmikroskopische Bilder zeigten, dass die durch *Severing* oder Depolymerisation entstandenen Mikrotubuli-Enden stumpf sind und nur in seltenen Fällen einzelne Protofilamente herausragten. Die gleiche Beobachtung konnte mit Katanin aus *D. melanogaster* gemacht werden (Zhang, Grode et al. 2011). Diese Resultate implizieren, dass GFP-Katanin Tubulin-Dimere nicht vom Restfilament „abschält“, wie es für die gut studierte Depolymerase Kinesin-13 (KLP59D) beschrieben ist (Rath, Rogers et al. 2009) (Abbildung V.1).

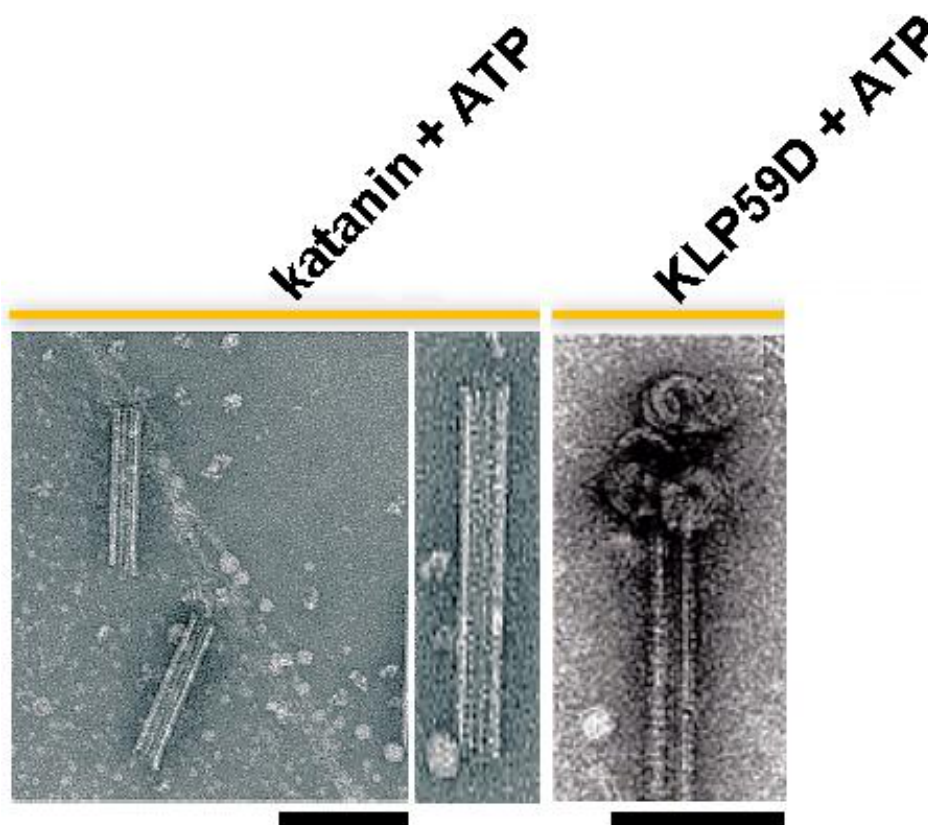


Abbildung V. 1: Depolymerisationsmuster von Katanin und Kinesin-13 (KLP59D).

Während Katanin stumpfe Enden am Mikrotubulus erzeugt (linkes Bild), werden im Fall von KLP59D Protofilamente aus dem Mikrotubulus „herausgeschält“. Dadurch entsteht ein signifikantes Muster am Ende des Mikrotubulus (rechtes Bild). Maßstab = 100 nm. Die Abbildung von KLP59D wurde entnommen aus (Zhang, Grode et al. 2011).

Zudem konnte keine selektive Entfernung einzelner Protofilamente aus dem Mikrotubulus-Filament beobachtet werden, wie es für das *Severing*-Enzym Fidgetin beobachtet wurde (Mukherjee, Valencia et al. 2012). Katanin realisiert somit einen spezifischen Depolymerisationsvorgang, der weder mit dem Mechanismus von KLP59D noch mit dem von Fidgetin vereinbar ist. Weiterhin ist die für

Katanin berechnete Depolymerisationsrate wesentlich geringer als für MCAK dokumentiert ist (Wordeman und Mitchison 1995). Bei einer Proteinkonzentration von 10 nM lag die maximale MCAK-Depolymerisationsrate bei 65 nm/s, was einer Abbaurate von 105 Tubulin-Dimeren pro Sekunde und Mikrotubulus entspricht (Helenius, Brouhard et al. 2006). Im Vergleich dazu lag die höchste gemessene Depolymerisationsrate von GFP-Katanin bei 1,82 nm/s, was umgerechnet 8 Tubulin-Dimere/s entspricht. Es ist anzunehmen, dass GFP-Katanin End-Depolymerisation und *Severing* über den gleichen Mechanismus herbeiführt. Diese Aussage kann daraus abgeleitet werden, dass an allen registrierten MT-Enden ein einheitliches Morphologie-Muster beobachtet werden konnte. Wären voneinander abweichende Arbeitsweisen eingesetzt worden, so hätte man unterschiedliche Abbaumuster erwarten können. Die geschnittenen Mikrotubuli zeigten zahlreiche kleine Bruchstücke. Neben den Schnitten konnten dabei kaum Zerstörungsmuster am Restfilament registriert werden. Dies unterstützt die These, dass Spastin und Katanin spezifische Stellen, möglicherweise Defekte, erkennen und dort *Severing* ausüben. Würden die Enzyme dagegen einen unspezifischen Bindevorgang bevorzugen, so hätte man zahlreiche Lücken in Mikrotubuli und stärker versetzte Enden erwarten können.

Die höchste Mikrotubuli-*Severing* Aktivität lag bei 100 nM Katanin, während maximale Depolymerisation bei einer finalen Katanin Konzentration von 50 nM auftrat. Es ist vorstellbar, dass bei höheren Proteinkonzentrationen die Depolymerisationsrate durch die verstärkte *Severing*-Rate maskiert wird. Aus den Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Enden bei niedrigen Proteinkonzentrationen ein primäres Ziel für Katanin darstellen. Aus den erhaltenen Resultaten drängt sich die Frage auf, warum GFP-Katanin selektiv Enden des Mikrotubulus angreifen sollte. Die Tubulin-Dimere am Ende des Filaments sind besser zugänglich und besitzen deshalb eine geringere Energiebarriere für die Entfernung von Tubulin-Einheiten, da sie eine reduzierte Anzahl an longitudinalen Bindungen aufweisen. Katanin könnte zudem bevorzugt an Enden binden, weil diese den größtmöglichen Defekt im Mikrotubulus darstellen. Vorausgegangene Berichte deuten darauf hin, dass Katanin bevorzugt Defekte aufsucht (Davis, Odde et al. 2002). Unter Einsatz polaritätsmarkierter Mikrotubuli konnte gezeigt werden, dass die Depolymerisationsrate am Plus-Ende signifikant höher ist als am Minus-Ende. Welche Gründe können angeführt werden, dass das Plus-Ende des Mikrotubulus bevorzugt gebunden und depolymerisiert wird? Das Plus-Ende stellt das labilere, dynamische Ende des Mikrotubulus dar. Daher könnte man sich gut vorstellen, dass die dort lokalisierten Tubulin-Dimere eine geringere Energiebarriere aufweisen. Dadurch würde der Abkopplungsvorgang von Tubulin-Einheiten vereinfacht erfolgen. Zudem könnte Katanin eine höhere Affinität zu GTP-Tubulin aufweisen, welches am Plus-Ende in der GTP-Kappe frequentiert auftritt.

Durch Verwendung modifizierter Mikrotubuli konnte demonstriert werden, dass GFP-Katanin in der Lage ist, zwischen den Nukleotidzuständen im Mikrotubulus-Filament zu unterscheiden. Während Katanin eine geringe Affinität für GDP-Tubulin Regionen aufwies, zeigte das Enzym eine wesentlich stärkere Interaktion

mit GMPCPP-Arealen. Da GMPCPP als GTP-Analogon die GTP-Kappe am dynamischen Plus-Ende des Mikrotubulus nachahmt, ist die Beobachtung konsistent mit der Analyse, dass Katanin Depolymerisation verstärkt am Plus-Ende ausübt. Die Fähigkeit zur Detektion des Nukleotidzustands könnte somit eine wichtige Rolle bei der Anlagerung von GFP-Katanin an das Mikrotubulus-Ende spielen, da das wachsende Ende die besagte GTP-Tubulin Kappe besitzt. Dagegen wurden GMPCPP stabilisierte Mikrotubuli von Katanin nicht bevorzugt an den Enden gebunden, da unter dieser Bedingung die entsprechende Nukleotid-Divergenz fehlte. Die letzte Beobachtung deckt sich mit Berichten, die zeigen, dass CLIP170 und EB1 in Anwesenheit von GMPCPP Mikrotubuli ihre Präferenz für Mikrotubuli-Enden verlieren (Dixit, Barnett et al. 2009; Zanic, Stear et al. 2009). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Katanin den Nukleotidzustand am Mikrotubulus-Filament erkennen und unterscheiden kann. Dadurch kann erklärt werden, warum Katanin am Plus-Ende der Mikrotubuli eine wesentlich höhere Depolymerisationsrate aufweist als am Minus-Ende.

In der Literatur gibt es diverse Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die ebenfalls den Nukleotid-Status am Mikrotubulus unterscheiden können (Westermann, Avila-Sakar et al. 2005; Zanic, Stear et al. 2009). Eine aktuelle Studie zeigt, dass der Dam1 Ringkomplex (*Budding Yeast*) GTP-Tubulin als bevorzugten Bindepartner spezifisch erkennt (Ramey, Wang et al. 2011). In diesem Kontext ist interessant, dass wiederhergestellte Kinetochoren, welche die *Passenger*-Proteine Bir1 und Sli15 für die Verknüpfung mit Mikrotubuli benötigen (Sandall, Severin et al. 2006), ebenfalls zwischen GTP- und GDP-Segmenten unterscheiden können (Severin, Sorger et al. 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass KIF5C eine 3,7-fach höhere Bindeaffinität für GTP-Mikrotubuli gegenüber GDP-Filamenten hat (Nakata et al. 2011).

V.3.4 Bedeutung des E-Hooks für die Interaktion von Katanin mit Mikrotubuli

Es konnte gezeigt werden, dass *p60*/MT-Bindung stark vom negativ geladenen E-Hook am C-Terminus von Tubulin abhängt. Das ist eine sehr interessante Beobachtung, da die Tubulin GTP-Bindungsstelle innerhalb der Interdimer-Oberfläche verborgen ist, während der E-Hook ein unstrukturiertes Peptid darstellt, welches an der Oberfläche des Mikrotubulus exponiert ist. Eine Möglichkeit besteht darin, dass Katanin sowohl über den E-Hook als auch über GTP-Tubulin eine Präferenz für das wachsende Mikrotubulus-Ende hat. Alternativ könnte der GTP-Status aber auch die Zugänglichkeit des E-Hooks für die Katanin-Bindung modulieren.

Um eine Unterscheidung der beiden Segmente herbeiführen zu können, wurde der mit Subtilisin verdaute Anteil im Vergleich zu nativem Tubulin mit einer größeren Menge an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Bei einem niedrigen molaren Verhältnis von Katanin zu Tubulin dekorierte das Protein hauptsächlich native Bereiche am Filament, während verdaute Regionen (ohne E-Hook) kaum

gebunden wurden. Nach deutlicher Erhöhung der Konzentration an GFP-Katanin band das Protein nahezu gleichmäßig an beide Segmente im Hybrid-Mikrotubulus, so dass eine vollständige Dekoration eintrat. Dies war zugleich ein Indiz dafür, dass Mikrotubuli trotz des entfernten *E-Hooks* weiterhin als Plattform für Katanin dienen können. Es ist gut vorstellbar, dass neben der elektrostatischen Interaktion (*E-Hook*) nicht-ionische Kräfte (zum Beispiel van-der-Waals Interaktionen) im Zuge des Bindeprozesses zwischen Katanin und Mikrotubuli auftreten. So gibt es in der Literatur Berichte über Proteine, die über nicht-elektrostatische Kräfte mit Mikrotubuli interagieren und solche, die über eine Kombination aus elektrostatischen und nicht-ionischen Wechselwirkungen an das Substrat binden können. Zur ersten Gruppe gehört beispielsweise das Protein kip3, ein Vertreter der Kinesin-8 Familie (Bormuth, Varga et al. 2009), während Myosin V (Zimmermann, Abdel Motal et al. 2011) der zweiten Gruppe angehört.

Cosedimentationsexperimente ergaben, dass unter substöchiometrischen Verhältnissen die Dissoziationskonstante von Katanin für verdautes Tubulin um den Faktor 22,5 über der von nativem Tubulin liegt. Die erhaltenen Resultate drücken aus, dass Katanin bei der Bindung eine Präferenz für natives Tubulin hat. Es ist aber zugleich zu erwähnen, dass der *E-Hook* für die Bindung nicht absolut essentiell ist, da bei Einsatz größerer Mengen an Katanin sehr ähnlicher K_D -Werte bestimmt werden konnten. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für andere Mikrotubuli-assoziierte Proteine gemacht werden, die unter substöchiometrischen Verhältnissen ebenfalls eine stark verminderte Affinität für *E-Hook* lose Mikrotubuli zeigten (Helenius, Brouhard et al. 2006; Ramey, Wang et al. 2011).

V.3.5 Einfluss einer Lysin-Triade (MTBD-Domäne) auf die Spastin/MT-Bindung

Um den Effekt des negativ geladenen *E-Hooks* von Tubulin auf die Interaktion mit Spastin zu studieren, wurden Bindungs- sowie Bündelungsstudien durchgeführt. Dabei kam die mutierte Spastin-Version E442Q zum Einsatz, von der bekannt ist, dass sie Mikrotubuli bündeln kann (Salinas, Carazo-Salas et al. 2005). In TIRF-Experimenten war im Fall von nativem Tubulin eine starke Bündelung von Mikrotubuli-Filamenten zu erkennen. Wurden dagegen verdaute Mikrotubuli (ohne *E-Hook*) mit GFP-Spastin E442Q inkubiert, so hatte das Protein die Fähigkeit zur Interaktion mit seinem Substrat verloren (Abbildung III.21). Um die Vorgänge genauer analysieren zu können, wurden die für TIRF-Messungen hergestellten Proben mit Hilfe des Elektronenmikroskops untersucht. In Gegenwart nativer Mikrotubuli war eine starke Dekoration gebündelter Filamente mit Spastin-Ringstrukturen zu erkennen. Wurden dagegen Mikrotubuli ohne *E-Hook* eingesetzt, so lagen die Ringstrukturen neben den Mikrotubuli und der Bündel-effekt blieb aus (Abbildung III.21). Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass Spastin bevorzugt an natives Tubulin bindet. Dies ist ein klares Indiz dafür, dass der negativ geladene *E-Hook* für die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli essentiell ist.

Die MTBD-Domäne stellt eine für den Bindeprozess wichtige Region dar (White, Evans et al. 2007). Die Aminosäuresequenzanalyse der MTBD-Domäne ergab, dass in einem spezifischen Abschnitt eine signifikante Anhäufung basischer Aminosäuren auftrat, die für die Interaktion mit Mikrotubuli wichtig sein könnte. Dabei handelt es sich um eine Kombination aus drei Lysinresten. Um die Bedeutung dieser basischen Triade für den MT-Interaktionsprozess zu beleuchten, wurden TIRF- und Cosedimentationsmessungen mit der MTBD-Domäne durchgeführt. Während Wildtyp-MTBD mit Mikrotubuli interagieren konnte, ging diese Bindefähigkeit im Fall der Mutante MTBD-Q³¹⁰QQ vollständig verloren. TIRF-Studien bestätigten das Ergebnis. Während Mikrotubuli durch GFP-MTBD-K³¹⁰KK dekoriert wurden, konnten unter Einsatz der mutierten MTBD-Version nur noch einzelne Moleküle auf den Mikrotubuli registriert werden. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass für die Interaktion zwischen Spastin und Mikrotubuli eine Lysin-Triade innerhalb der MTBD-Domäne essentiell ist. Durch die positiv geladenen Lysinreste kann wahrscheinlich eine sehr effiziente ionische Wechselwirkung mit dem negativ geladenen C-Terminus von Tubulin (*E-Hook*) eingegangen werden. Zahlreiche Proteine binden über eine basische Domäne an Mikrotubuli. Durch Mutationsstudien konnten elektrostatische Interaktionen zwischen MCAK und Mikrotubuli nachgewiesen werden. Der elektrostatische Partner für den negativ geladenen *E-Hook* ist dabei die positiv geladene *Neck*-Domäne 22, die *in vivo* für Depolymerisationsaktivitäten essentiell ist (Maney, Wagenbach et al. 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ionische Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Regionen in Kinesin-1 (Thorn, Übersax et al. 2000; Wang und Sheetz 2000) und Kinesin-3 (Nitta, Kikkawa et al. 2004) mit dem *E-Hook* die Prozessivität für direkte Bewegungsprozesse erhöht.

V.3.6 Einfluss der Ionenstärke auf die Binderate und Bindefrequenz

Die Ionenstärke hatte einen erheblichen Einfluss auf die Bindedauern von Spastin und Katanin am Mikrotubulus-Filament. Eine Erhöhung der NaCl-Konzentration von 80 mM auf 300 mM führte zu einer signifikanten Verkürzung der Interaktionsdauer. Zudem zeigte die durchgeführte Studie, dass mit steigendem Salzgehalt ein wesentlich geringerer Anteil an Enzym Bindung realisierte. Die Affinität von Spastin zum Filament wurde dabei immens beeinflusst. Daraus resultierend sank die Anzahl an gebundenen Molekülen von 24,21 Ereignissen / (10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$) bei 80 mM NaCl auf 1,61 Ereignisse / (10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$) bei 300 mM NaCl. Auch bei Katanin konnte ein starker Affinitätsverlust für das Filament festgestellt werden. Bei 80 mM NaCl wurden 15,77 Ereignisse / (10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$) gezählt, während in Gegenwart von 300 mM NaCl lediglich 1,93 Ereignisse / (10 $\mu\text{m} \cdot 60 \text{ s}$) bestimmt werden konnten. Die hohe Ionenstärke schirmt wahrscheinlich die negative Ladung des *E-Hooks* am C-Terminus des Mikrotubulus-Filaments ab, wodurch nur noch verminderte elektrostatische Interaktionen zwischen Enzym/Mikrotubuli stattfinden können. Konsistent mit dieser Beobachtung konnten in TIRF-Messungen unter Einfluss hoher Ionenstärken nur

noch basale *Severing*- und Depolymerisationsaktivitäten registriert werden. Die Interaktion zahlreicher Mikrotubuli-bindender Proteine wird durch erhöhte Salzkonzentrationen beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass durch eine Erhöhung der KCl-Konzentration von 75 mM auf 125 mM die Depolymerisationsrate von MCAK um den Faktor 26 reduziert wird, was auf stark verminderte Substrat-Bindung zurückgeführt werden konnte (Helenius, Brouhard et al. 2006). Auch bei EB1 und Myosin V korrelieren sinkende Binderaten mit erhöhten Ionenkonzentrationen (Zanic, Stear et al. 2009; Zimmermann, Abdel Motaal et al. 2011). Interessanterweise gibt es Proteine, deren Oligomerisierungsgrade von der Ionenstärke beeinflusst werden. So konnte gezeigt werden, dass ClpB unter physiologischen Salzkonzentrationen reversible Oligomerisationsprozesse durchführt. Abhängig von der Proteinkonzentration wurden unterschiedliche Populationen, bestehend aus Monomeren, Heptameren und Zwischenstufen beobachtet. Wurde die Salzkonzentration dagegen reduziert, so stellte das Heptamer die dominante Spezies dar (Akoev, Gogol et al. 2004). Weder für Spastin noch für Katanin konnte ein vergleichbarer Einfluss von Ionen auf den Oligomerisierungsgrad beobachtet werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli-*Severing* Aktivitäten und Depolymerisationsraten von der Diffusion abhängig sind. Hohe Salzkonzentration und die Entfernung des negativ geladenen *E-Hooks* beeinträchtigen die diffusive Bewegung von Spastin- und Katanin-Molekülen. Daraus resultierend nahmen *Severing*-Frequenz und Depolymerisationsraten mit erhöhten Salzkonzentrationen sukzessive ab. Durch Mutationsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass bei humanem Spastin eine basische Triade in der MTBD-Domäne für den Interaktionsvorgang mit Mikrotubuli essentiell ist. Interessanterweise ist diese MTBD-Domäne bei *D. melanogaster* Spastin nicht ausreichend, um Interaktion mit MT-Filamenten eingehen zu können. Daraus kann abgeleitet werden, dass sich Spastin-Enzyme unterschiedlicher Organismen hinsichtlich der Bindung an ihr Substrat stark unterscheiden. Ein Sequenzvergleich bestätigt, dass es unter den Spastin-Proteinen am N-Terminus sehr große Unterschiede in der Aminosäuren-Komposition gibt.

V.3.7 Analyse der detektierten Zwischenstufen im Oligomerisierungsprozess

Durchgeführte Einzelmolekül-Messungen unter Einfluss verschiedener Nukleotide zeigten, dass Bindefrequenz und Bindedauer von Spastin und Katanin durch Nukleotide erheblich beeinflusst werden. So konnte in Gegenwart von AMPPNP nur bei sehr wenigen Molekülen diffusive Bewegung beobachtet werden. Nahezu alle analysierten GFP-Partikel blieben mit dem Filament assoziiert und verharrten somit an ihrer ursprünglichen Bindepotion. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Hydrolyse für die Dissoziation vom Mikrotubulus essentiell ist. AMPPNP kann als ATP-Analogon nicht hydrolysiert werden, weshalb die Bindung an Mikrotubuli irreversibel erfolgt. Diese Beobachtungen decken sich mit dem von

Hartman und Vale (1999) postulierten Interaktionsmodell. Die Autoren konnten mittels Cosedimentationsmessungen zeigen, dass ADP-Katanin eine wesentlich niedrigere Affinität für Mikrotubuli aufweist als im ATP-gebundenen Zustand. Sie schlossen daraus, dass die Hydrolyse von ATP zu ADP und Orthophosphat eine Voraussetzung für die Dissoziation des Ringkomplexes vom Mikrotubulus darstellt. Die schwach ausgeprägte Diffusion unter Einfluss von AMPPNP könnte man sich dadurch erklären, dass die stabilisierten Hexamere über mehrere Untereinheiten an MT-Filamente binden. Durch die verstärkten Bindungskräfte könnte die Bewegungsfähigkeit der Ringstrukturen stark beeinträchtigt sein. In Anwesenheit von ATP dissoziierten GFP-Spastin und GFP-Katanin nach Bindung dagegen sehr schnell vom Mikrotubulus. Nur sehr wenige Moleküle zeigten längere Diffusionszeiten, die meisten Partikel verließen die Filamente sehr zügig. Die Analyse der erstellten Kymographen machte deutlich, dass unter Einfluss verschiedener Nukleotide große Unterschiede hinsichtlich des Oligomerisierungsgrads auftraten. Anhand stark ausgeprägter Fluoreszenzsignale konnte abgeleitet werden, dass in Gegenwart von AMPPNP und ATP- γ S Multimere existent sind, während in Gegenwart von ATP Monomere dominieren. Biochemische Studien, unter anderem Gelfiltrationsanalysen und analytische Ultrazentrifugationsläufe, gaben bereits Hinweise darauf, dass die Oligomerisierung bei Spastin und Katanin vom Nukleotidzustand abhängt. So konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp von Spastin und Katanin in Gegenwart von ATP in Form von Monomeren vorliegt, während die Walker B-Mutanten unter Einfluss von ATP Ringstrukturen bilden können (Hartman und Vale 1999; Roll-Mecak und Vale 2008). Mögliche Zwischenstufen, die eine Aussage über den Oligomerisierungsvorgang erlauben, konnten die Autoren mit den eingesetzten Methoden jedoch nicht stabilisieren.

Durch *Photobleaching*-Experimente konnten Daten gesammelt werden, die auf bevorzugte Oligomer-Strukturen unter Einfluss bestimmter Nukleotide hinweisen. Die Ergebnisse zeigten, dass im Fall von Spastin in Gegenwart von ATP Monomere, unter Einfluss des langsam hydrolysierbaren Nukleotids ATP- γ S Dimere und in Gegenwart von AMPPNP hauptsächlich Hexamere formiert werden. Hinsichtlich der detektierten Zwischenstufe ergab sich bei Katanin ein leicht abgewandeltes Auswertungsbild. Während in Gegenwart von ATP und AMPPNP analog zu Spastin dominante Monomer- und Hexamer-Spezies beobachtet wurden, kam es unter Einfluss von ATP- γ S zur Stabilisierung von Trimeren. Parallel dazu konnten im AMPPNP-Ansatz jedoch auch höhere Komplexe registriert werden, welche aus 7 GFP-Protein Untereinheiten bestanden. Es besteht die Möglichkeit, dass teilweise zwei Hexamere aneinander gekoppelt wurden, wodurch das starke Fluoreszenzsignal ausgelöst wurde. Zudem gibt es einzelne Gruppen von AAA-Proteinen, die in der Lage sind, neben Hexameren auch Heptamere und Oktamere auszubilden (Hanson und Whiteheart 2005). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass dies auch für GFP-Spastin und GFP-Katanin zutrifft. Zur Überprüfung der Oligomerisierung wurden neben den beschriebenen *Photobleaching*-Experimenten auch *Cross-Linking* Studien durchgeführt. Bei moderater Proteinkonzentration konnten stabile Zwischenstufen registriert werden, die bei Spastin Dimere, im Fall von Katanin Trimere

darstellen. Eine weitere Erhöhung der Proteinkonzentration führte zu einer starken Abnahme der Monomer- und Zwischenstufen-Spezies, während gleichzeitig eine hochmolekulare Population beobachtet werden konnte. Die Analyse der Probe auf elektronenmikroskopischer Ebene zeigte zahlreiche homogene Ringstrukturen mit einer zentralen Pore, die sich nach dem Partikel-Averaging als Hexamere herausstellten (Abbildung III.28, Abbildung IV.25).

Um die Interaktion zwischen Spastin und Katanin mit Mikrotubuli präzise untersuchen zu können, wurden Cosedimentationsmessungen in Kombination mit diversen Nukleotiden (ADP, ATP und ATP- γ S) durchgeführt. Dabei kamen sowohl die Wildtyp-Proteine als auch die mutierten Versionen E442Q und E309Q zum Einsatz. Die nachfolgenden Interpretationen gehen davon aus, dass die Wechselwirkung zwischen Spastin/Katanin und MT über lediglich eine Untereinheit erfolgt. In Gegenwart von ADP lag das molare Bindeverhältnis von Wildtyp-Spastin zu Tubulin bei 1,37:1, im Fall von Katanin dagegen bei 1,12:1. Die Resultate zeigen, dass unter Einsatz des Nukleotids ADP hauptsächlich Monomere an Tubuline gebunden haben. Wurde die Reaktion dagegen mit ATP- γ S durchgeführt, so konnte jeweils ein Spastin-Dimer mit einer Tubulin-Einheit interagieren. Dementsprechend lag das molare Verhältnis zwischen Wildtyp-Spastin und Tubulin bei 2,09:1. Für Katanin ergab sich in Gegenwart von ATP- γ S ein abgewandeltes Bild, indem jeweils ein Trimer mit einem Tubulin-Dimer wechselwirken konnte (molares Verhältnis Katanin/Tubulin = 2,82:1). Neben den Wildtyp-Versionen wurden auch die inaktiven Mutanten E442Q und E309Q in die Messungen miteinbezogen. Während in Anwesenheit von ADP primär Monomere an Mikrotubuli gebunden haben, betrug in Gegenwart von ATP das molare Verhältnis von Spastin/Katanin zu Tubulin \approx 3:1.

spastin nucleotide	wildtype		E442Q		
	ADP	ATP- γ S	ADP	ATP- γ S	ATP
spastin subunits/tubulin-dimer	1,37/1	2,09/1	1,30/1	2,21/1	2,70/1
oligomer	monomer	dimer	monomer	dimer	trimer hexamer

katanin nucleotide	wildtype		E309Q		
	ADP	ATP- γ S	ADP	ATP- γ S	ATP
katanin subunits/tubulin-dimer	1,12/1	2,82/1	1,08/1	2,78/1	2,96/1
oligomer	monomer	trimer	monomer	trimer	trimer hexamer

Abbildung V. 2: Ergebnisse der durchgeführten Cosedimentationsmessungen.

Einfluss der Nukleotide ADP, ATP- γ S und AMPPNP auf das Oligomerisierungsverhalten von Spastin und Katanin.

Ausgehend von elektronenmikroskopischen Studien hätte man erwartet, dass E442Q sowie E309Q in Gegenwart von ATP hauptsächlich als Hexamere und nicht in Form von Trimeren an das Filament binden. Wie ist diese Diskrepanz zu erklären? Ein Ansatz zielt in die Richtung, dass Hexamere nicht nur über eine, sondern über zwei Untereinheiten Bindungen eingehen könnten, wodurch sich ein molares Verhältnis Enzym/Tubulin von 3:1 einstellen würde. Elektronenmikroskopische Bilder zeigten in Gegenwart von 1 mM ATP starke Dekorationen der Mikrotubuli mit E442Q und E309Q-Ringstrukturen (Abbildung V.3).

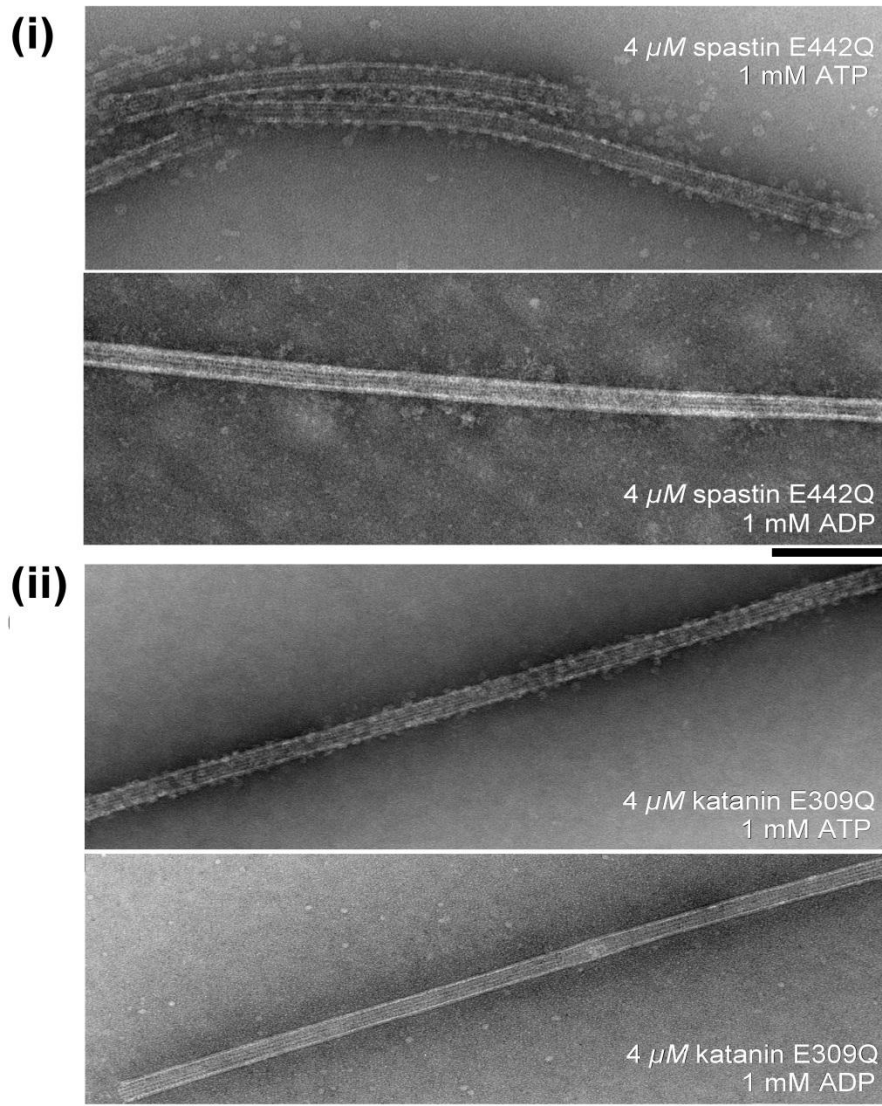


Abbildung V. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Walker B-Mutanten.

(i) E442Q-Spastin und (ii) E309Q-Katanin bilden auf Mikrotubuli in Gegenwart von 1 mM ATP Ringstrukturen. In Anwesenheit von ADP nahm die Menge an gebundenem Spastin/Katanin ab, so dass auf den Mikrotubuli nur noch sehr kleine Partikel zu sehen sind. Ringstrukturen sind unter dieser Bedingung dagegen kaum vorhanden. Die Spastin/Katanin-Konzentration lag bei 4 μM. Maßstab = 100 nm.

Dies ist ein Indiz dafür, dass die Mutante tatsächlich als Hexamer auf dem Mikrotubulus existiert und wahrscheinlich an mehrere Tubulin-Dimere andocken kann. Die molaren Enzym/Tubulin-Verhältnisse deuten zudem darauf hin, dass sich in Gegenwart von ATP-γS Dimere (Spastin) respektive Trimere (Katanin) auf

dem Mikrotubulus formieren könnten. Ein struktureller Nachweis dafür fehlt jedoch, da nur Hexamere aufgrund ihrer ausgeprägten Ringstruktur eindeutig erkannt und zugeordnet werden konnten. Monomere und Zwischenstufen waren dagegen für eine genaue Kategorisierung zu klein. Zudem konnte in dieser Studie kein Partikel-*Averaging* durchgeführt werden, da diese strukturelle Mittelung klar definierte Strukturen erfordert. Partikel, die an Filamente binden, konnten somit nicht analysiert werden.

Zusammenfassend deuten die erhaltenen Resultate darauf hin, dass Hexamer-Strukturen von Spastin und Katanin über mehrere Untereinheiten (vorzugsweise zwei) an Tubulin-Dimere binden könnten. Dies würde auch die Funktion von Spastin-Hexameren als MT-Quervernetzer unterstützen. Es ist gut möglich, dass in diesem Modell (Abbildung V.4ii) eine Spastin-Ringstruktur (i) über eine Untereinheit an ein Tubulin bindet und dadurch wie ein Rad auf dem Filament zum Stehen kommt. (ii) Eine zweite Untereinheit im gleichen Hexamer ermöglicht die Bindung mit einem benachbarten MT-Filament, wodurch eine Verknüpfung zweier Filamente erreicht wird. Das Zusammenwirken zahlreicher Hexamere könnte zu dem in Abbildung V.4i gezeigten MT-Bündelungseffekt führen.

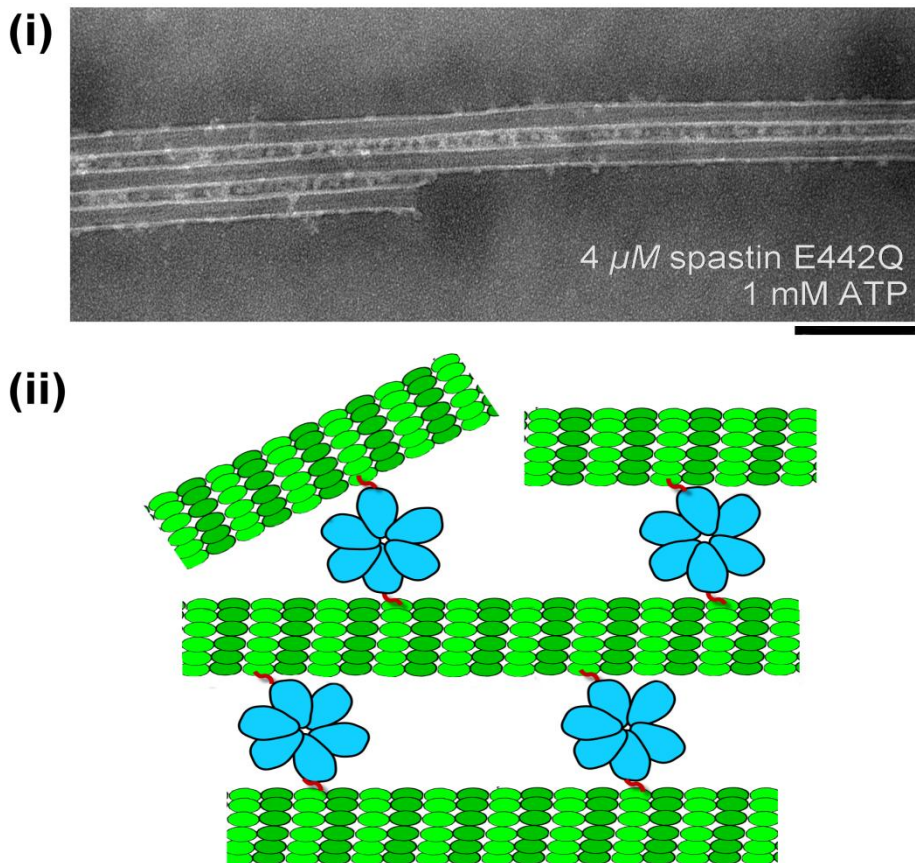


Abbildung V. 4: Spastin-Hexamere fungieren als Vernetzer.

(i) Das dargestellte elektronenmikroskopische Bild zeigt mehrere Mikrotubuli-Filamente, die durch Spastin-Ringstrukturen miteinander verbunden werden. Daraus resultierend erfolgt der erkennbare Bündelungseffekt. (ii) Das Schema zeigt Ringe (blau), die aufrecht auf dem Mikrotubulus stehen und dadurch eine Verbindung zum Nachbarfilament herstellen können. In roter Farbe ist die Interaktion zwischen der MTBD-Domäne und dem E-Hook der Tubulin-Dimere dargestellt.

Kombiniert man *Photobleaching*, *Cross-Linker* und Cosedimentationsanalysen, so kann postuliert werden, dass im Fall von Spastin ein Gleichgewicht zwischen einer Monomer-, Dimer- und Hexamer-Spezies vorliegt. Bei Katanin herrscht dagegen ein Gleichgewichtszustand zwischen Monomeren, Trimeren und aktiven Hexamer-Strukturen. Die Bindung von ATP zieht das Gleichgewicht jeweils stark in Richtung des hexameren Zustands. Eine durch Nukleotide induzierte Konformationsänderung einer intermediären Spezies zum Hexamer konnte bereits für ClpB gezeigt werden (Goloubinoff, Mogk et al. 1999; Motohashi, Watanabe et al. 1999; Zolkiewski, Kessel et al. 1999). Im nukleotidfreien Zustand kommt es bei ClpB zu reversiblen Oligomerisationsprozessen. Abhängig von der Proteinkonzentration entstehen Populationen aus Monomeren, Heptameren sowie Zwischenstufen. Im Gegensatz dazu führt die Bindung von ATP- γ S und ADP zur Stabilisierung der hexameren Struktur von ClpB (Akoev, Gogol et al. 2004). Interessanterweise treten auch AAA-Proteine auf, deren Oligomerisierung unabhängig von Nukleotiden realisiert werden kann. P97/VCP enthält eine N-terminal lokalisierte Substrat-Bindedomäne und zwei konservierte ATPase-Domänen (D1, D2), die durch ein *Linker*-Motiv voneinander getrennt sind. Die Nukleotid-unabhängige Hexamerisierung bei p97/VCP erfordert ausschließlich eine intakte Kombination aus D1 und *Linker*-Sequenz (Wang, Song et al. 2003; Wang, Song et al. 2003). Ein derartiges Phänomen – Hexamerisierung unter Ausschluss von Nukleotiden – konnte weder bei Spastin noch für Katanin beobachtet werden. Lediglich in Gegenwart von ATP respektive ATP-Analoga wurde Oligomerisierung induziert.

V.4 Interpretation der katalytischen Parameter für *Coiled-Coil* Spastin

Um den Einfluss des Dimers auf Hexamerisierung und Funktionalität von humanem Spastin zu untersuchen, wurde ein künstliches Dimer durch Fusion der *Neck Coiled-Coil* Komponente von Kinesin-1 (*D. melanogaster*) mit Spastin- Δ 227 und einem flexiblen *Linker* erzeugt. *DmK1cc* kann seine strukturelle Integrität selbst bei großer Krafteinwirkung aufrechterhalten. Durch diese spezielle Eigenschaft und aufgrund der Tatsache, dass das Faltungsverhalten von *DmK1cc* bereits über hochauflösende Kraftspektroskopie ausreichend untersucht worden ist, wurde dieses Konstrukt für die künstliche Kopplung zweier Spastin-Monomere gewählt (Bornschoegl, Woehlke et al. 2009).

Die Analysen der kinetischen Parameter für das fusionierte *Coiled-Coil* Dimer lassen folgende Schlussfolgerungen zu: aus der enzymgekoppelten ATPase-Studie unter Einfluss von Mikrotubuli geht hervor, dass die Filamente die ATPase-Rate des generierten Dimer-Konstrukts nicht stimulieren können. Dieser interessante Befund stellt einen signifikanten Unterschied zu Δ 227-Spastin dar. Dieses Konstrukt wird in Gegenwart von Mikrotubuli deutlich in seiner ATP-Umsatzrate stimuliert. Der Einsatz zweier Auswertungsmodelle (Hill- und

Michaelis-Menten) führte zur Erkenntnis, dass MT einen kooperativen Effekt auf delta227-Spastin ausüben. Dieses Phänomen könnte man dadurch erklären, dass Mikrotubuli eine stabilisierende Wirkung auf die Bildung von Dimer-Zwischenstufen haben. Da *Coiled-Coil* Spastin bereits in Form eines Dimers vorliegt, hat die Präsenz der MT keine Auswirkung mehr auf das Fusionsprotein, wodurch der stimulierende Effekt ausbleibt. ATP-Titrationsstudien mit delta227-Spastin haben gezeigt, dass nur in Anwesenheit von MT Kooperativität auftritt, während ohne Filamente die analysierten Messkurven dem Michaelis-Menten Modell gehorchen. Daraus ist abzuleiten, dass durch den alleinigen Einfluss von ATP keine vermehrte Ausbildung der Dimer-Spezies erfolgt. Steht dagegen eine Kombination aus ATP und Mikrotubuli zur Verfügung, so könnte für den Wildtyp folgender Mechanismus eine wichtige Rolle spielen: durch die Anwesenheit von MT bilden sich vermehrt Dimere aus, die durch ATP-Bindung stabilisiert werden, so dass ein effizienter Übergang zum aktiven Hexamer möglich ist (Abbildung V.5).

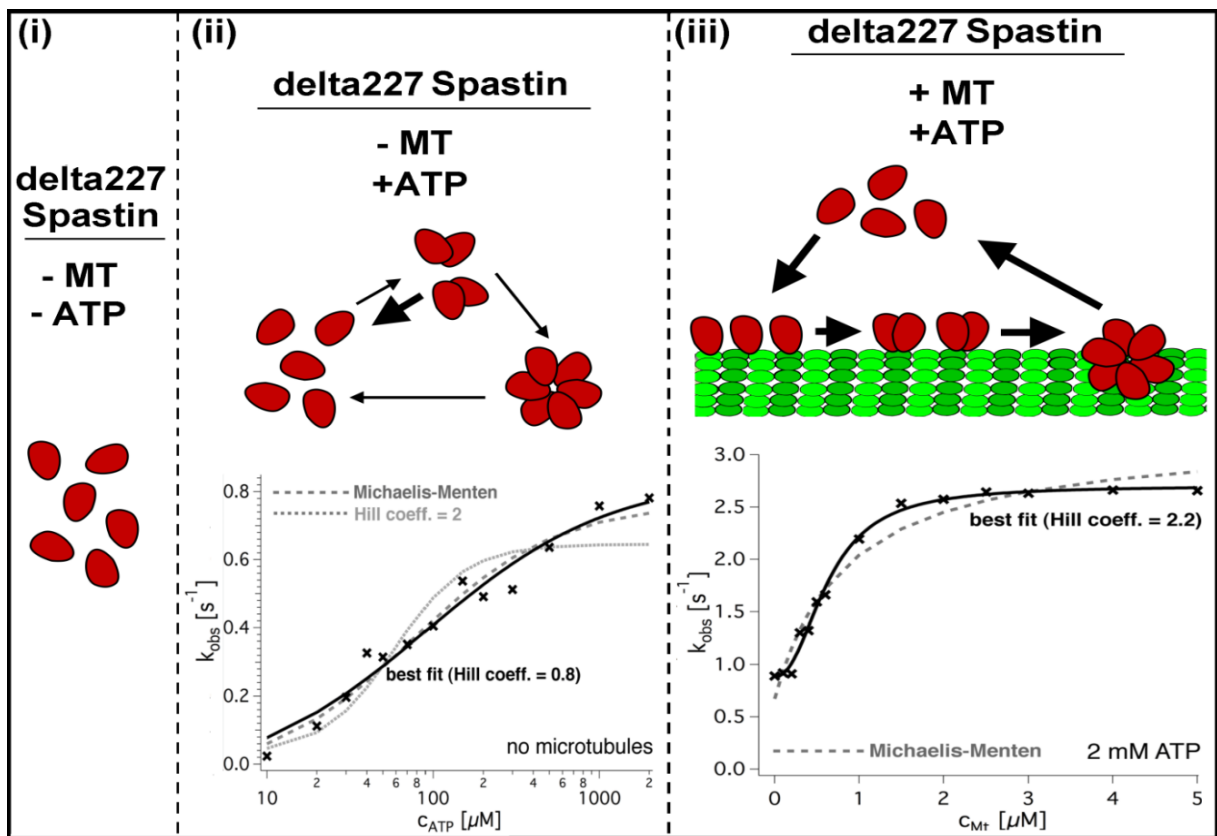


Abbildung V. 5: Oligomerisierungsmodell für delta227-Spastin.

(i) In Ansätzen ohne ATP/Mikrotubuli liegt Spastin in seiner monomeren Form vor.

(ii) Wird ATP hinzugegeben beginnt der Oligomerisierungsvorgang. Da das Dimer ohne Mikrotubuli nicht stabilisiert werden kann, zerfallen viele Dimere wieder zu Monomeren. Nur eine kleine Spezies von Dimeren ist deshalb in der Lage, aktive Hexamere auszubilden, welche zum ATP-Umsatz befähigt sind. Bei diesem Vorgang handelt es sich um einen Leerlauf, wodurch eine basale ATPase-Aktivität von ≈ 1 ATP/s registriert werden konnte. Die erhaltene Kurve ergibt einen Hill-Koeffizienten von 0,8, so dass unter dieser Bedingung keine Kooperativität auftritt.

(iii) In Anwesenheit von Mikrotubuli kann die Dimer-Population auf dem Filament stabilisiert werden, so dass ein effizienter Übergang zum Hexamer ermöglicht wird. Die mit dem Hill-Modell gefittete Kurve liefert einen Koeffizienten von 2,2. In Gegenwart von Mikrotubuli zeigen Spastin-Untereinheiten kooperatives Verhalten. Die maximal detektierte ATPase-Rate lag bei ≈ 4 ATP/s. Bei delta227-Spastin führen Mikrotubuli somit zu einer Stimulierung der ATP-Umsatzrate.

Für das fusionierte Dimer-Konstrukt könnte man sich folgendes modifizierte Szenario vorstellen: das Protein kann aufgrund der integrierten *Coiled-Coil* Struktur unabhängig von Mikrotubuli stabile Dimere ausbilden, die anschließend mit hoher Effizienz in hexamere Ringstrukturen übergehen und daraus resultierend maximale ATP-Hydrolyse betreiben können (Abbildung V.6).

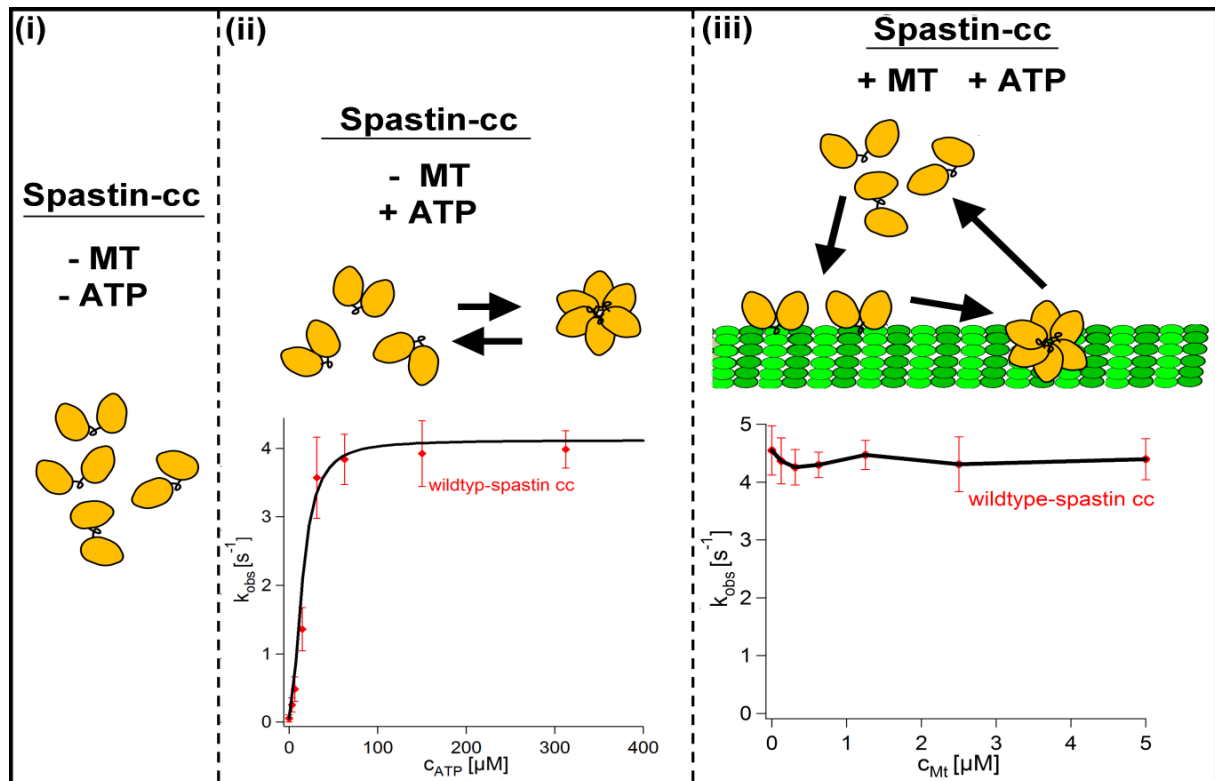


Abbildung V. 6: Oligomerisierungsmodell für *Coiled-Coil* Spastin.

(i) In Ansätzen ohne ATP/Mikrotubuli liegt Spastin in seiner künstlichen Dimer-Form vor. (ii) Wird ATP hinzugegeben beginnt der Oligomerisierungsvorgang. Da das Dimer durch die *Coiled-Coil* Struktur stabilisiert wird, erfolgt auch ohne Mikrotubuli ein effizienter Übergang zur aktiven Hexamer-Population. Deshalb konnte bereits auf dieser Stufe die maximale ATPase-Rate von ≈ 4 ATP/s registriert werden. Die Kurve konnte mit dem Hill-Modell gefittet werden und zeigt einen Koeffizienten von 1,9. Dies ist ein Indikator für kooperatives Verhalten der künstlichen Dimer-Spezies.

(iii) Da der Stabilisierungseffekt durch Mikrotubuli nicht mehr erforderlich ist, zeigt *Coiled-Coil* Spastin in Gegenwart von Mikrotubuli kaum Stimulierung seiner ATP-Umsatzrate. Die maximal detektierte ATPase-Rate lag bei 4,4 ATP/s. Mikrotubuli sind im Fall künstlicher Spastin-Dimere nicht mehr als Stabilisatoren erforderlich.

Auf welchem Weg zwei Monomere zu einem Dimer assoziieren ist noch unbekannt. Für diesen Prozess kann man sich folgende Möglichkeiten vorstellen: (i) Monomere binden an Mikrotubuli und diffundieren unabhängig voneinander am Filament entlang. Durch diesen ungerichteten Bewegungsprozess ist die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sich zwei Monomer-Einheiten treffen und daraus resultierend zu einem Dimer assoziieren können. (ii) Die zweite Option besteht darin, dass die an Mikrotubuli gebundenen Monomere eine Konformationsänderung eingehen könnten, wodurch die Bindung eines zweiten Monomers erleichtert würde. Auch eine Kombination aus beiden Optionen ist gut vorstellbar.

Einzelmolekülstudien mit dem Fluoreszenzmikroskop gaben Hinweise darauf, dass Partikel auf dem Mikrotubulus miteinander fusionieren können. Nach der Kopplung konnten höhere Strukturen anhand der Zunahme des Fluoreszenzsignals eindeutig identifiziert werden. Die aktive Bewegung am Filament scheint für die Assemblierung von Spastin-Untereinheiten zu höheren Formen essentiell zu sein (Abbildung V.7).

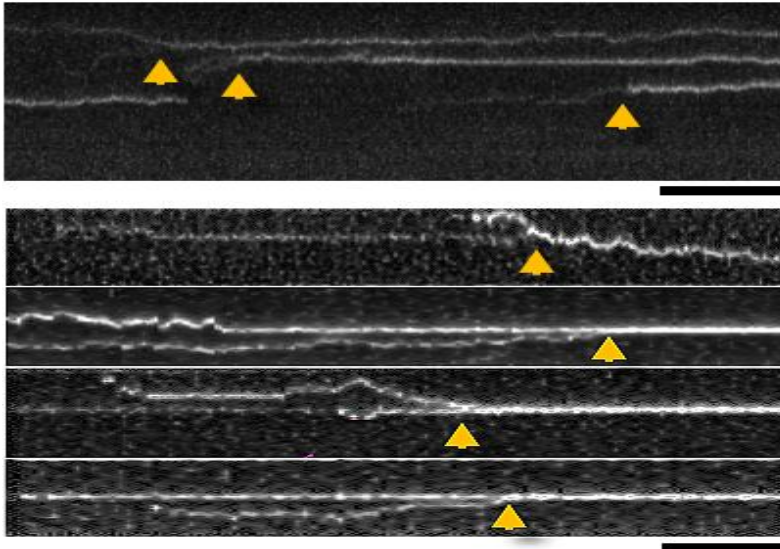


Abbildung V. 7: Interaktion von Spastin-Untereinheiten auf dem MT-Filament.

Kymographen zeigen Bewegungen von GFP-Spastin Molekülen. Nach der Fusion zweier Partikel ist eine Zunahme der Fluoreszenzintensität zu erkennen. Dies ist ein Indikator dafür, dass Spastin-Untereinheiten aneinander gekoppelt werden können. Maßstab = 1 s.

Zusammenfassend erlauben die erhaltenen Ergebnisse folgende Interpretationen: (i) die Bildung des Dimers stellt den limitierenden Faktor im Zuge der ATP-Hydrolyse dar. (ii) Durch die Anwesenheit von MT wird die Ausbildung aktiver Hexamere kontrolliert. In Kombination mit ATP wird eine für Oligomerisierung essentielle Dimer-Zwischenstufe stabilisiert, wodurch ein effizienter Übergang zum aktiven Hexamer ermöglicht wird. (iii) Mikrotubuli fungieren dabei als Stabilisatoren/Regulatoren, die den Übergang von Spastin-Untereinheiten zur aktiven Hexamer-Stufe kontrollieren. Diese Kontrollfunktion spielt eine wichtige Rolle, da dadurch unnötiger ATP-Verbrauch in Abwesenheit von Mikrotubuli vermieden wird. Nur in Anwesenheit der Filamente ist ein effizienter Übergang zum Hexamer mit nachfolgender ATP-Hydrolyse möglich.

Warum konnte sogar ohne Mikrotubuli eine basale ATPase-Rate bei Spastin registriert werden? Lichtstreu-Experimente haben gezeigt, dass der Wildtyp selbst in Abwesenheit von Mikrotubuli als Dimer-Spezies existent ist. Diese kleine Fraktion an Dimeren könnte unter Einfluss von ATP Hexamere bilden. Durch die Hydrolyse des Nukleotids in diesen Strukturen könnte die Hintergrundaktivität erzeugt werden. Diesen Prozess könnte man sich als eine Art Leerlauf vorstellen. Da Mikrotubuli nicht zur Verfügung stehen, hält sich der Anteil an Dimeren, aufgrund fehlender Stabilisierung, stark in Grenzen. Welche Funktion könnte diese Ausgangspopulation an Dimeren erfüllen? Da Vertreter dieser Gruppe

wahrscheinlich ohne Mikrotubuli hexamerisieren können, stünde jederzeit eine kleine Fraktion an aktiven Strukturen zu Verfügung. In Anwesenheit von Mikrotubuli könnten diese Ringkomplexe sofort ihre Funktion ausüben, um initiale Defekte in Filamenten zu erzeugen.

V.4.1 Interaktions- und Oligomerisierungsmodell für Spastin

Durch die Röntgenstrukturanalyse von Spastin konnte ein attraktives Modell für den *Severing*-Mechanismus erstellt werden (Roll-Mecak und Vale 2008; Roll-Mecak und McNally 2010). Allerdings gab es hinsichtlich der Oligomerisierung von Spastin-Untereinheiten und deren Interaktionsverhalten mit Mikrotubuli keine genauen Daten. Durch die erhaltenen Ergebnisse kann ein Teil der noch bestehenden Fragen beantwortet werden, so dass folgendes Interaktions- und Oligomerisierungsmodell für Spastin postuliert werden kann (Abbildung V.8): **(a)** Spastin-Untereinheiten binden über elektrostatische Interaktionen an Mikrotubuli-Filamente. Zwei Regionen spielen dabei eine essentielle Rolle: eine basische Lysin-Triade innerhalb der MTBD-Domäne von Spastin und der negativ geladene *E-Hook* am C-Terminus von Tubulin. Diese beiden Segmente interagieren miteinander und ermöglichen die Bindung. **(b)** Nach Bindung diffundiert Spastin über ionische Wechselwirkungen am Mikrotubulus entlang. Dabei handelt es sich um einen ungerichteten, eindimensionalen Bewegungsprozess. Spastin weist einen Diffusionskoeffizienten von $0,0126 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf. **(c)** In Gegenwart von ATP entstehen auf dem Filament stabile Dimere, die eine wichtige Zwischenstufe im Oligomerisierungsprozess darstellen. Dabei fungieren Mikrotubuli als Stabilisatoren und Regulatoren. Ohne Stabilisierung der Dimer-Population wäre kein effizienter Übergang zum Hexamer möglich. Diese Kontrollfunktion der Mikrotubuli spielt eine wichtige Rolle, da dadurch unnötiger ATP-Verbrauch in Abwesenheit von Mikrotubuli vermieden wird. Nachdem drei Dimere zu einem aktiven Hexamer assembliert sind, kommt es zur Stimulierung der ATPase-Aktivität. Nach der Hydrolyse von ATP und der anschließenden Freisetzung von Orthophosphat erfährt das Hexamer eine Konformationsänderung, die zur Destabilisierung von Tubulin-Tubulin-Kontakten innerhalb des Mikrotubulus-Fragments führen (Hartman und Vale 1999). Durch diesen Prozess können initiale Defekte in das Filament integriert werden. **(d)** Weitere Spastin-Untereinheiten erkennen defekte Stellen und binden bevorzugt an derartige Bereiche. Dadurch werden Spastin-Moleküle in diesen Regionen lokal konzentriert, wodurch die initialen Defekte ausgeweitet werden. Daraus resultierend entstehen stumpfe Enden, ein Beleg für selektive Angriffspunkte.

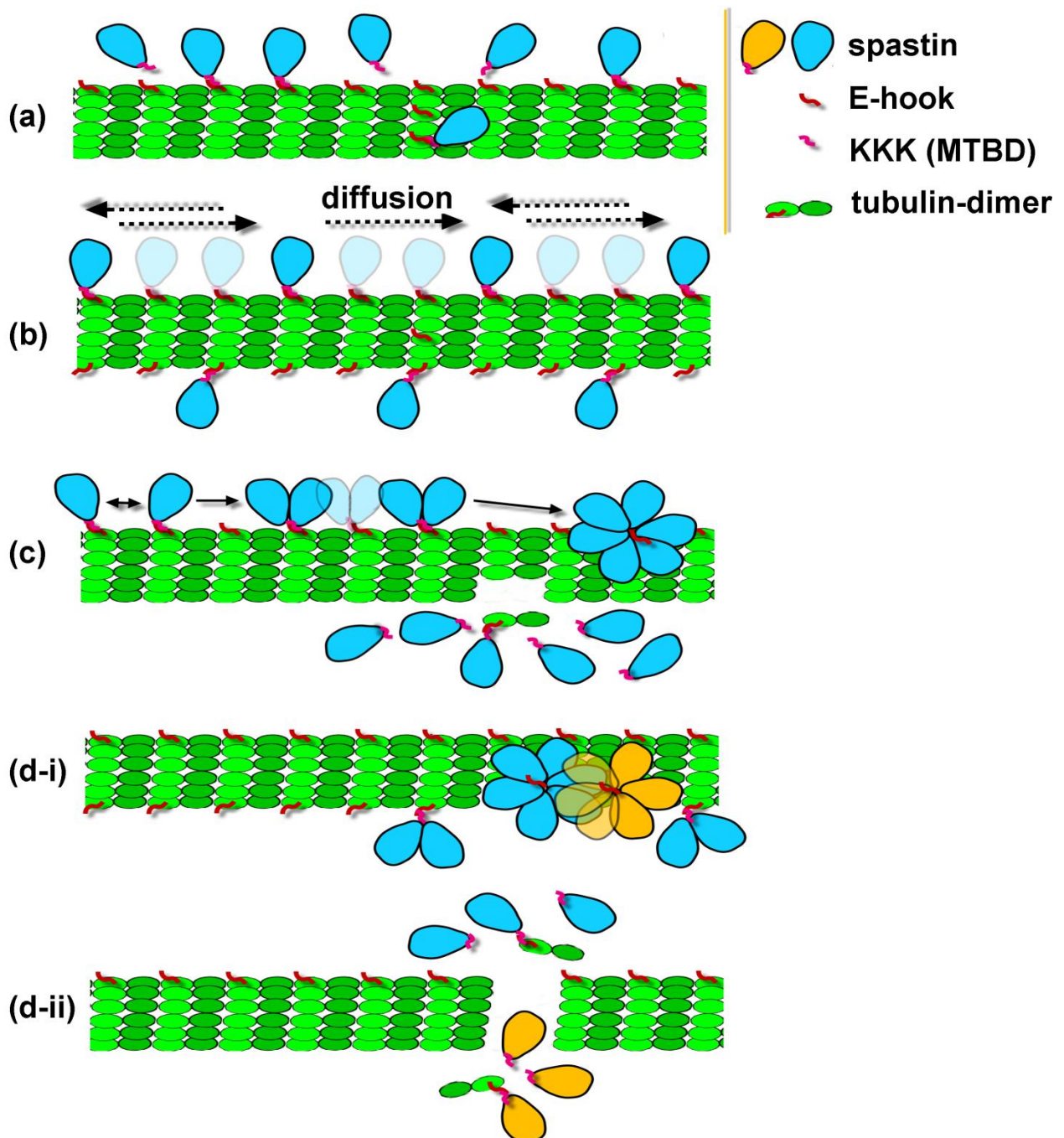


Abbildung V. 8: Oligomerisierungs- und Interaktionsmodell für $\Delta 227$ -Spastin.

(a) Spastin interagiert über ionische Wechselwirkungen mit Tubulin-Dimeren. Dabei bindet die positiv geladene Lysin-Triade (MTBD) an den negativ geladenen E-Hook. **(b)** Spastin diffundiert am Mikrotubulus entlang und zeigt einen ungerichteten Bewegungsprozess. **(c)** Monomere gehen auf dem Mikrotubulus in eine stabile Zwischenstufe (Dimere) über. Drei Dimere assoziieren zu einem aktiven Hexamer, das nach ATP-Hydrolyse Tubulin-Dimere destabilisieren kann. **(d-i)** Zahlreiche Spastin-Untereinheiten binden an defekte Bereiche, wodurch der *Severing*-Vorgang an spezifischen Stellen forciert wird. **(d-ii)** Daraus resultierend entstehen an selektiven Regionen rasch stumpfe Enden.

Für Katanin kann man sich ein sehr ähnliches Interaktions- und Oligomerisierungsmodell mit folgenden Modifikationen vorstellen: (i) Neben elektrostatischen Interaktionen zwischen der *Kat2*-Domäne und dem E-Hook der Tubulin-Dimere könnten zusätzlich nichtionische-Kräfte für den Interaktionsprozess erforder-

derlich sein (ii) Trimere stellen die essentielle Zwischenstufe auf dem Weg zum Hexamer dar. (iii) Katanin hat eine wesentlich höhere Bindeaffinität zu GTP-Tubulin, wodurch das positive Mikrotubulus-Ende einen bevorzugten Bindepartner für das Enzym darstellt. Daraus resultierend sind an den Filamenten Depolymerisationsereignisse möglich, welche bei Spastin nicht beobachtet werden konnten.

V.5 Vergleich zwischen Katanin- und Spastin-ATPase Aktivität

Katanin und Spastin zeigten in Mikrotubuli-Titrationsstudien sowohl ähnliche als auch signifikant unterschiedliche Verhaltensweisen. Bei beiden Proteinen wurde die basale ATP-Umsatzrate durch Mikrotubuli stimuliert. In enzymgekoppelten Messreihen konnte gezeigt werden, dass Spastin dem Michaelis-Menten Modell mit dem Auftreten eines Sättigungsbereichs gehorcht. Selbst bei einem Überschuss an Tubulin-Dimeren konnte die maximale ATPase-Rate erreicht werden. Im Gegensatz dazu scheint es bei Katanin zwei unterschiedliche Regime zu geben. Während in einem Tubulin-Konzentrationsbereich zwischen 0 und 2 μM die ATP-Umsatzrate von Katanin stimuliert wird, tritt bei Konzentrationen $> 2 \mu\text{M}$ Tubulin eine sukzessive Reduktion der Hydrolyserate auf (Abbildung V.9). Diese ungewöhnliche Verhaltensweise konnte bereits bei Katanin aus Seeigel-Eiern und *A. thaliana* beobachtet werden (Hartman und Vale 1999; Stoppin-Mellet, Gaillard et al. 2002).

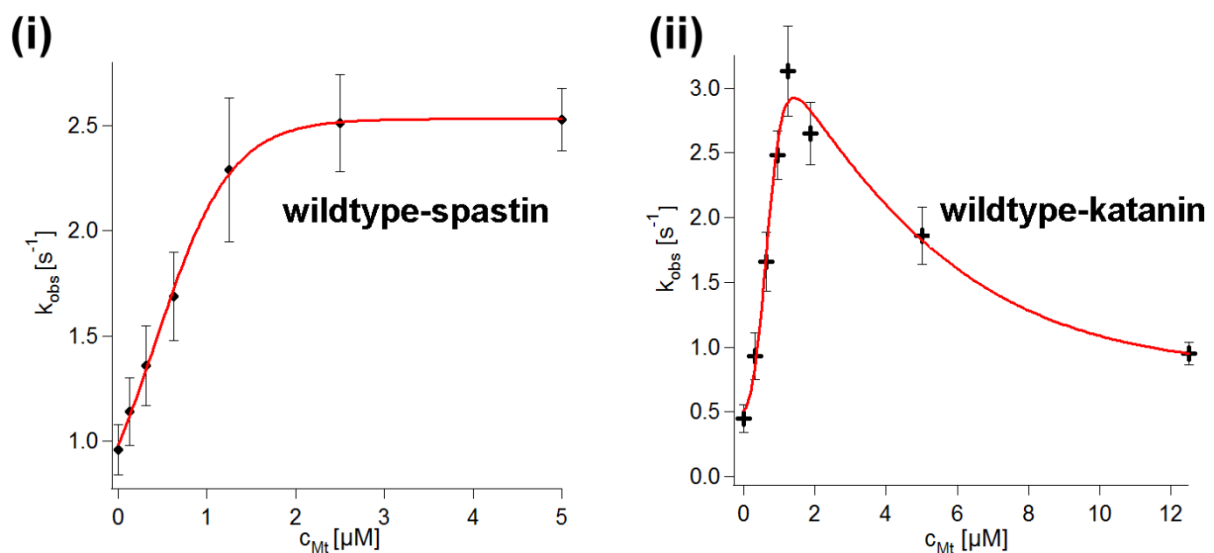


Abbildung V. 9: MT-Titrationsstudien.

Spastin und Katanin zeigen in ATPase-Messungen abweichende Verhaltensmuster bei Einsatz hoher Tubulin-Konzentrationen.

(i) Spastin gehorcht dem Michaelis-Menten Modell und geht bei hohen Konzentrationen an Tubulin in einen Sättigungsbereich über.

(ii) Katanin zeigt ein abweichendes Verhalten, indem durch große Mengen an Mikrotubuli ein inhibitorischer Effekt auf die ATP-Umsatzrate ausgelöst wird.

Wie kann dieses abweichende Verhalten zwischen den beiden studierten Mikrotubuli-schneidenden Enzymen erklärt werden? Da die Hydrolyseraten von Spastin und Katanin vom Oligomerisierungsgrad abhängen, muss es bei höheren Tubulin-Konzentrationen erhebliche Unterschiede im Aufkommen von Hexamerstrukturen geben. Nur Hexamere sind in der Lage ATP-Hydrolyse zu betreiben (Hartman und Vale 1999), während Monomere und Zwischenstufen keine Spaltungsprozesse einleiten. Daraus ist abzuleiten, dass Spastin auch in substöchiometrischen Konzentrationen (zu Tubulin) effizient hexamere Ringstrukturen ausbilden kann, während diese Fähigkeit bei Katanin reduziert ist. Bündelungsstudien haben gezeigt, dass das Spastin-Hexamer in der Lage ist als Quervernetzer für MT-Filamente zu fungieren (Abbildung V.10). Diese Resultate führen zu folgendem Modell: Spastin-Hexamere binden an den Mikrotubulus und fungieren dabei – neben ihrer Funktion als schneidende Werkzeuge – als Vernetzer. Dadurch ist eine lokale Konzentrierung von Mikrotubuli und an daran assoziierten Spastin-Molekülen möglich. Selbst bei einem Überschuss an Tubulin-Dimeren könnten Monomere über Zwischenstufen zu Hexameren assoziieren, da die Konzentration von Spastin durch den Bündelungseffekt auf einem hohen Niveau gehalten würde. Im Gegensatz zu diesem Szenario konnte in Gegenwart von Katanin-Ringstrukturen kein vergleichbares MT-Bündelungsverhalten beobachtet werden. Die Ringstrukturen dekorierten zwar Mikrotubuli, jedoch trat keine Vernetzung mehrerer Filamente zu einem Bündel auf (Abbildung V.10). Befindet sich ein Überschuss an Tubulin-Dimeren im Ansatz, so ist folgendes Szenario denkbar: einzelne Katanin-Moleküle sind räumlich so weit voneinander getrennt, dass die Untereinheiten nur noch bedingt Zwischenstrukturen und nachfolgend aktive Hexamere formen können. Da durch den fehlenden Bündelungseffekt keine lokalen Konzentrationserhöhungen möglich sind, sinkt bei Katanin die ATP-Umsatzrate mit steigenden Tubulin-Konzentrationen sukzessive, wie in Abbildung V.9 dargestellt ist. Ein weiteres Protein, das ein biphasisches Stimulationsmuster aufweist, stellt die GTPase Dynamin dar. Auch in diesem Fall wird postuliert, dass das Verhalten mit der Oligomerisierung des Enzyms zu höheren Strukturen in Zusammenhang steht (Tuma und Collins 1994; Warnock, Hinshaw et al. 1996).

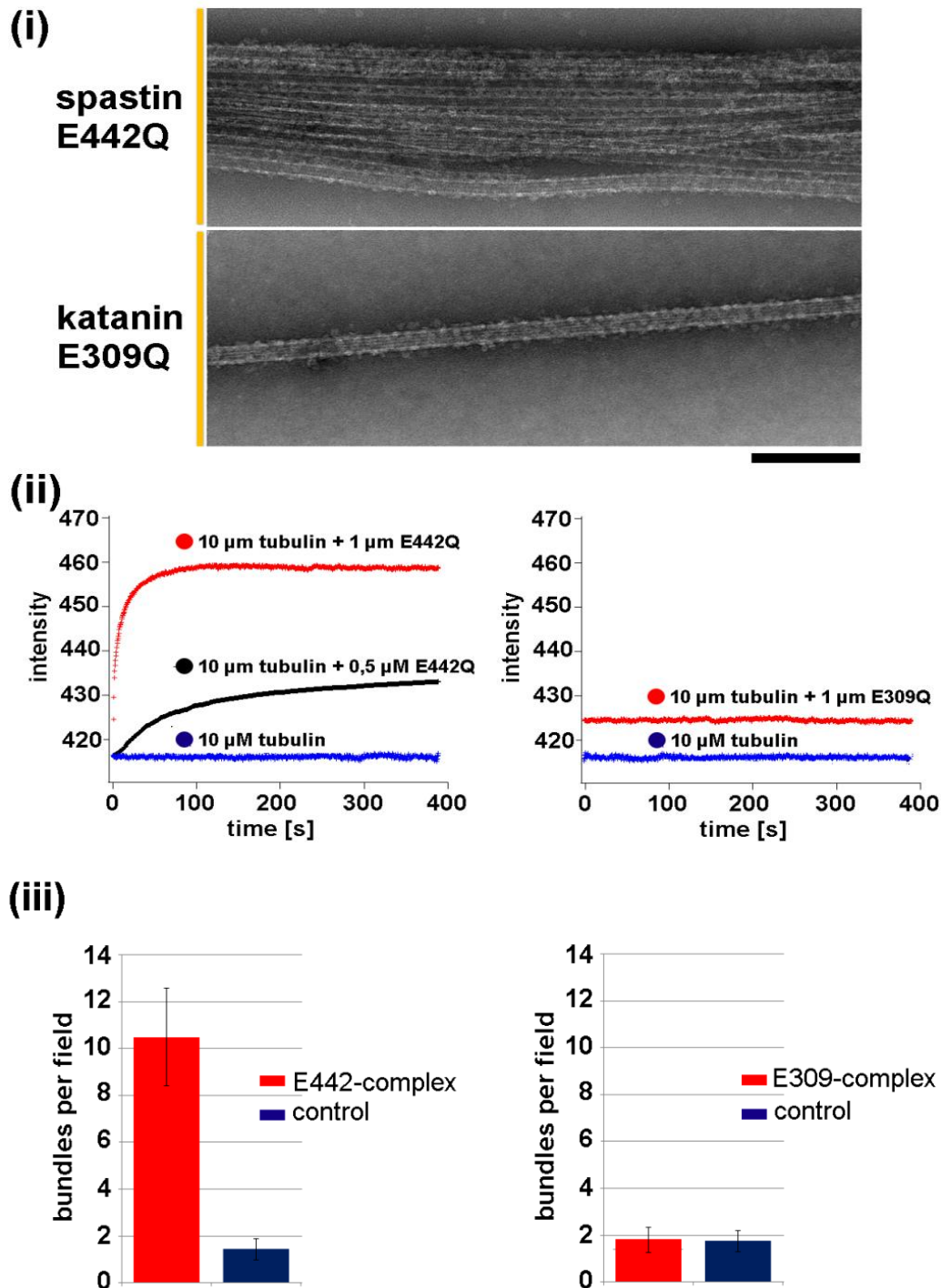


Abbildung V. 10: MT-Bündelungseffekt von Spastin im Vergleich zu Katanin.

(i) Elektronenmikroskopisches Bild, das den Bündelungseffekt durch Spastin E442Q verdeutlicht. Während Spastin als Vernetzer für Mikrotubuli fungieren kann, konnte in Gegenwart von Katanin keine Bündelung von Mikrotubuli-Filamenten beobachtet werden.

(ii) Der Bündelungseffekt wurde durch Lichtstreu-Experimente bei 350 nM analysiert. E442Q bündelt Mikrotubuli, so dass eine Zunahme des Signals nach Zugabe des Enzyms (+1 mM ATP) auftrat. Mit steigender Enzym-Konzentration trat der Effekt verstärkt auf. Im Gegensatz dazu blieb das Ausgangssignal in Gegenwart von Katanin konstant.

(iii) Quantifizierung der auftretenden Bündel durch die Analyse elektronenmikroskopischer Bilder. Mit der Zugabe von E442Q ist eine deutliche Zunahme an Bündel verbunden, während Katanin keinen derartigen Effekt zeigt.

V.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung V. 1: Depolymerisationsmuster von Katanin und Kinesin-13 (KLP59D).	192
Abbildung V. 2: Ergebnisse der durchgeführten Cosedimentationsmessungen.	199
Abbildung V. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Walker B-Mutanten.	200
Abbildung V. 4: Spastin-Hexamere fungieren als Vernetzer.	201
Abbildung V. 5: Oligomerisierungsmodell für delta227-Spastin.....	203
Abbildung V. 6: Oligomerisierungsmodell für <i>Coiled-Coil</i> Spastin.	204
Abbildung V. 7: Interaktion von Spastin-Untereinheiten auf dem MT-Filament.	205
Abbildung V. 8: Oligomerisierungs- und Interaktionsmodell für Δ 227-Spastin.	207
Abbildung V. 9: MT-Titrationsstudien.	208
Abbildung V. 10: MT-Bündelungseffekt von Spastin im Vergleich zu Katanin. .	210

V.7 Literaturverzeichnis

- Akoev, V., E. P. Gogol, et al. (2004). "Nucleotide-induced switch in oligomerization of the AAA+ ATPase ClpB." *Protein Sci* **13**(3): 567-574.
- Arnal, I. and R. H. Wade (1995). "How does taxol stabilize microtubules?" *Curr Biol* **5**(8): 900-908.
- Blainey, P. C., A. M. van Oijen, et al. (2006). "A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15): 5752-5757.
- Bormuth, V., V. Varga, et al. (2009). "Protein friction limits diffusive and directed movements of kinesin motors on microtubules." *Science* **325**(5942): 870-873.
- Bornschiogl, T., G. Woehlke, et al. (2009). "Single molecule mechanics of the kinesin neck." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(17): 6992-6997.
- Cooper, J. R. and L. Wordeman (2009). "The diffusive interaction of microtubule binding proteins." *Curr Opin Cell Biol* **21**(1): 68-73.
- Culver-Hanlon, T. L., S. A. Lex, et al. (2006). "A microtubule-binding domain in dynactin increases dynein processivity by skating along microtubules." *Nat Cell Biol* **8**(3): 264-270.
- Davis, L. J., D. J. Odde, et al. (2002). "The importance of lattice defects in katanin-mediated microtubule severing in vitro." *Biophys J* **82**(6): 2916-2927.
- Diaz-Valencia, J. D., M. M. Morelli, et al. (2011). "Drosophila katanin-60 depolymerizes and severs at microtubule defects." *Biophys J* **100**(10): 2440-2449.
- Dixit, R., B. Barnett, et al. (2009). "Microtubule plus-end tracking by CLIP-170 requires EB1." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(2): 492-497.
- Gai, D., R. Zhao, et al. (2004). "Mechanisms of conformational change for a replicative hexameric helicase of SV40 large tumor antigen." *Cell* **119**(1): 47-60.

- Goloubinoff, P., A. Mogk, et al. (1999). "Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a chaperone network." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13732-13737.
- Hanson, P. I. and S. W. Whiteheart (2005). "AAA+ proteins: have engine, will work." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(7): 519-529.
- Hartman, J. J., J. Mahr, et al. (1998). "Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit." Cell **93**(2): 277-287.
- Hartman, J. J. and R. D. Vale (1999). "Microtubule disassembly by ATP-dependent oligomerization of the AAA enzyme katanin." Science **286**(5440): 782-785.
- Helenius, J., G. Brouhard, et al. (2006). "The depolymerizing kinesin MCAK uses lattice diffusion to rapidly target microtubule ends." Nature **441**(7089): 115-119.
- Hyman, A. A., D. Chretien, et al. (1995). "Structural changes accompanying GTP hydrolysis in microtubules: information from a slowly hydrolyzable analogue guanylyl-(alpha,beta)-methylene-diphosphonate." J Cell Biol **128**(1-2): 117-125.
- Maney, T., M. Wagenbach, et al. (2001). "Molecular dissection of the microtubule depolymerizing activity of mitotic centromere-associated kinesin." J Biol Chem **276**(37): 34753-34758.
- Martin, A., T. A. Baker, et al. (2005). "Rebuilt AAA + motors reveal operating principles for ATP-fuelled machines." Nature **437**(7062): 1115-1120.
- McNally, F. J. and R. D. Vale (1993). "Identification of katanin, an ATPase that severs and disassembles stable microtubules." Cell **75**(3): 419-429.
- McNally, K. P., O. A. Bazirgan, et al. (2000). "Two domains of p80 katanin regulate microtubule severing and spindle pole targeting by p60 katanin." J Cell Sci **113 (Pt 9)**: 1623-1633.
- Motohashi, K., Y. Watanabe, et al. (1999). "Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK.J-GrpE set and ClpB chaperones." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7184-7189.
- Mukherjee, S., J. D. Valencia, et al. (2012). "Human Fidgetin is a microtubule severing the enzyme and minus-end depolymerase that regulates mitosis." Cell Cycle **11**(12): 2359-2366.
- Nitta, R., M. Kikkawa, et al. (2004). "KIF1A alternately uses two loops to bind microtubules." Science **305**(5684): 678-683.
- Okada, Y. and N. Hirokawa (1999). "A processive single-headed motor: kinesin superfamily protein KIF1A." Science **283**(5405): 1152-1157.
- Ramey, V. H., H. W. Wang, et al. (2011). "The Dam1 ring binds to the E-hook of tubulin and diffuses along the microtubule." Mol Biol Cell **22**(4): 457-466.
- Rath, U., G. C. Rogers, et al. (2009). "The Drosophila kinesin-13, KLP59D, impacts Pacman- and Flux-based chromosome movement." Mol Biol Cell **20**(22): 4696-4705.
- Roll-Mecak, A. and F. J. McNally (2010). "Microtubule-severing enzymes." Curr Opin Cell Biol **22**(1): 96-103.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2008). "Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin." Nature **451**(7176): 363-367.
- Salinas, S., R. E. Carazo-Salas, et al. (2005). "Human spastin has multiple microtubule-related functions." J Neurochem **95**(5): 1411-1420.
- Sandall, S., F. Severin, et al. (2006). "A Bir1-Sli15 complex connects centromeres to microtubules and is required to sense kinetochore tension." Cell **127**(6): 1179-1191.

- Severin, F. F., P. K. Sorger, et al. (1997). "Kinetochores distinguish GTP from GDP forms of the microtubule lattice." *Nature* **388**(6645): 888-891.
- Stoppin-Mellet, V., J. Gaillard, et al. (2007). "Arabidopsis katanin binds microtubules using a multimeric microtubule-binding domain." *Plant Physiol Biochem* **45**(12): 867-877.
- Sudo, H. and P. W. Baas (2010). "Acetylation of microtubules influences their sensitivity to severing by katanin in neurons and fibroblasts." *J Neurosci* **30**(21): 7215-7226.
- Thorn, K. S., J. A. Ubersax, et al. (2000). "Engineering the processive run length of the kinesin motor." *J Cell Biol* **151**(5): 1093-1100.
- Tuma, P. L. and C. A. Collins (1994). "Activation of dynamin GTPase is a result of positive cooperativity." *J Biol Chem* **269**(49): 30842-30847.
- Varga, V., C. Leduc, et al. (2009). "Kinesin-8 motors act cooperatively to mediate length-dependent microtubule depolymerization." *Cell* **138**(6): 1174-1183.
- Walker, M. L., S. A. Burgess, et al. (2000). "Two-headed binding of a processive myosin to F-actin." *Nature* **405**(6788): 804-807.
- Wang, Q., C. Song, et al. (2003). "Hexamerization of p97-VCP is promoted by ATP binding to the D1 domain and required for ATPase and biological activities." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(2): 253-260.
- Wang, Q., C. Song, et al. (2003). "D1 ring is stable and nucleotide-independent, whereas D2 ring undergoes major conformational changes during the ATPase cycle of p97-VCP." *J Biol Chem* **278**(35): 32784-32793.
- Wang, Z. and M. P. Sheetz (1999). "One-dimensional diffusion on microtubules of particles coated with cytoplasmic dynein and immunoglobulins." *Cell Struct Funct* **24**(5): 373-383.
- Wang, Z. and M. P. Sheetz (2000). "The C-terminus of tubulin increases cytoplasmic dynein and kinesin processivity." *Biophys J* **78**(4): 1955-1964.
- Warnock, D. E., J. E. Hinshaw, et al. (1996). "Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity." *J Biol Chem* **271**(37): 22310-22314.
- Westermann, S., A. Avila-Sakar, et al. (2005). "Formation of a dynamic kinetochore- microtubule interface through assembly of the Dam1 ring complex." *Mol Cell* **17**(2): 277-290.
- White, S. R., K. J. Evans, et al. (2007). "Recognition of C-terminal amino acids in tubulin by pore loops in Spastin is important for microtubule severing." *J Cell Biol* **176**(7): 995-1005.
- Wordeman, L. and T. J. Mitchison (1995). "Identification and partial characterization of mitotic centromere-associated kinesin, a kinesin-related protein that associates with centromeres during mitosis." *J Cell Biol* **128**(1-2): 95-104.
- Zanic, M., J. H. Stear, et al. (2009). "EB1 recognizes the nucleotide state of tubulin in the microtubule lattice." *PLoS One* **4**(10): e7585.
- Zhang, D., K. D. Grode, et al. (2011). "Drosophila katanin is a microtubule depolymerase that regulates cortical-microtubule plus-end interactions and cell migration." *Nat Cell Biol* **13**(4): 361-370.
- Zimmermann, D., B. Abdel Motal, et al. (2011). "Diffusion of myosin V on microtubules: a fine-tuned interaction for which E-hooks are dispensable." *PLoS One* **6**(9): e25473.
- Zolkiewski, M., M. Kessel, et al. (1999). "Nucleotide-dependent oligomerization of ClpB from Escherichia coli." *Protein Sci* **8**(9): 1899-1903.

VI Appendix

VI.1 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Günther Woehlke für die Bereitstellung des vielseitigen Themas und für die jederzeit freundliche und interessierte Betreuung meiner Arbeit herzlich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Rief für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Dissertation in der Abteilung *E22-Biophysik* sowie für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen.

Für die Zusammenarbeit und Kooperation, vor allem in Bezug auf die Elektronenmikroskopie, danke ich Herrn Prof. Dr. Hendrik Dietz und Jean-Philippe Sobczak.

Für die Einarbeitung, Unterstützung und Hilfe im Bereich der analytischen Ultrazentrifugation danke ich Herrn PD Dr. Klaus Richter.

Schließlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern der Abteilung *E22-Biophysik* für die Hilfsbereitschaft und freundliche Zusammenarbeit bedanken.

Ich danke meiner Freundin Martina, die mir stets Mut zugesprochen und mich in meiner Arbeit bestärkt hat. Hätte sie mir nicht den Rücken freigehalten, wäre meine Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Ganz großer Dank geht an meinen Bruder Dr. rer. nat. Christian Eckert. Seine brüderliche Freundschaft bedeutet mir unbeschreiblich viel. Herzlichen Dank für jedwede Unterstützung und den großen Beistand, den er jederzeit zu geben bereit ist.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widme. Ihre uneingeschränkte Förderung meiner Ausbildung und ihre liebevolle Unterstützung hat die Anfertigung der vorliegenden Arbeit erst ermöglicht.

VI.2 Lebenslauf

Name:	Thomas Eckert
Geburtsdatum:	10.10.1978
Geburtsort:	München
1985–1989	Grundschule Rohrbach
1989–1999	Apian-Gymnasium in Ingolstadt
2000–2007	Studium der Biologie an der Universität Regensburg
2006–2007	Anfertigung der Diplomarbeit unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Dr. Kalbitzer am Lehrstuhl für Biophysik und Physikalische Biochemie mit dem Thema: „CSP-RNA-Interaktion“ Abschluss: Diplom-Biologe
2008–2012	Anfertigung der Dissertation unter der Betreuung von Herrn PD Dr. Günther Woehlke an der Technischen Universität München mit dem Thema: „Kinetische und strukturelle Untersuchung der Mikrotubuli-schneidenden Enzyme Spastin und Katanin“ Abschluss: Dr. rer. nat.