

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Institut für Humangenetik
Klinikum rechts der Isar
Helmholtz Zentrum München
(Direktor: Univ.- Prof. Th. A. Meitinger)

Subzelluläre Lokalisation für ein neu identifiziertes NBIA-Krankheitsgen

Birgit Siegel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. Th. A. Meitinger
2. Univ.- Prof. Dr. P. A. Knolle

Die Dissertation wurde am 02.10.2013 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.04.2015 angenommen.

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG – NEURODEGENERATION MIT EISENABLAGERUNG IM GEHIRN (NBIA)	8
1.1 Definition und Überblick.....	8
1.2 Subtypen	9
1.2.1 Pantothenatkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN).....	10
1.2.2 <i>PLA2G6</i> – assoziierte Neurodegeneration (PLAN)	14
1.2.3 Fettsäurehydroxylase assoziierte Neurodegeneration (FAHN)	18
1.2.4 Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration (MPAN)	19
1.2.5 NBIA mit Beginn im Erwachsenenalter	23
1.2.6 Idiopathische NBIA	26
1.3 Diagnostik	27
1.3.1 Histopathologie	27
1.3.2 Bildgebung.....	32
1.3.3 Diagnostisches Vorgehen	37
1.4 Zielsetzung	39
2 MATERIAL UND METHODEN	41
2.1 Zellbiologische Methoden	41
2.1.1 Fibroblastenkultur	41
2.1.2 Transiente Transfektion von Fibroblastenzelllinien	42
2.1.3 <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) – Kultur	43
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	44
2.2.1 DNA/RNA – Isolierung	44
2.2.2 cDNA-Synthese	45
2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	46
2.2.4 Klonierung	48
2.2.5 Proteinisolierung und –reinigung	49
2.2.6 Antikörperproduktion	51
2.2.7 SDS – Page.....	52

2.2.8	Western Blot	53
2.2.9	Isolierung von Zellkern, Mitochondrien, ER und Zytosol aus Fibroblasten	54
2.2.10	Isolierung von Mitochondrien mittels Anti-TOM22-Antikörper	55
2.2.11	Immunzytochemie.....	56
2.3	Konfokale Mikroskopie	56
3	ERGEBNISSE.....	57
3.1	C19orf12 – Isoformen und Gensequenz	58
3.2	C19orf12 – Klonierung, Expression und Proteinisolierung	60
3.2.1	pTrc-His-TOPO®-Vektor Expressionssystem	60
3.2.2	C19orf12 – Klonierung und <i>E. coli</i> -Transformation	63
3.2.3	Rekombinantes His6:C19orf12 – Proteinexpression.....	66
3.2.4	His6:C19orf12 – Proteinaufreinigung	71
3.3	Anti – C19orf12 – Antikörperproduktion und Antikörpertestung	77
3.4	Subzelluläre Lokalisation von C19orf12.....	79
3.4.1	Western Blot	79
3.4.2	Konfokale Mikroskopie.....	83
4	DISKUSSION.....	87
4.1	Betrachtung der Methodik.....	87
4.1.1	Wahl des Expressionssystems	87
4.1.2	Wahl des Affinitätsmarkers	88
4.1.3	Proteinproduktion und Proteinaufreinigung	88
4.1.4	Antikörperproduktion und Antikörpertestung	89
4.2	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	90
4.2.1	Lokalisationsnachweis von C19orf12 in Fibroblasten	90
4.2.2	Dimerisierung von C19orf12	93
4.2.3	C19orf12-Tiermodell	95
5	AUSBLICK – GEMEINSAMKEITEN VON NBIA	96
6	ZUSAMMENFASSUNG	98
7	LITERATURVERZEICHNIS	101

8	DANKSAGUNG	112
9	PUBLIKATION.....	113
	ANHANG: 1. Geräte und Software	115
	2. Produkte und Reagenzien	118

Abkürzungsverzeichnis

ADHS	Aufmerksamkeitsdefizit-/ Hyperaktivitätsstörung
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA (Complementary DNA)
CII	Komplex II der Atmungskette
CNBr	Cyanogenbromid
CoA	Coenzym A
CP	Coeruloplasmin
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic Acid)
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DYT-Lokus	Dystoniegenlokus
ECL	Elektrochemilumineszenz
EEG	Elektroenzephalografie
EMG	Elektromyografie
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FA(2)H	Fettsäure (2-)hydroxylase (Fatty acid (2-)hydroxylase)
FAHN	Fettsäurehydroxylase assoziierte Neurodegeneration
FTL	Ferritin leichte Kette (Ferritin light chain)
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
His	Histidin

INAD	Infantile Neuroaxonale Dystrophie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IQ	Intelligenzquotient
M-MuLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MPAN	Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration
mRNA	Boten – RNA (messenger RNA)
MRT	Magnetresonanztomographie
mtSSBP	Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein
NBIA	Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (Neurodegeneration with brain iron accumulation)
Ni-NTA Agarose	Nickel-Nitrilotriacetic Acid Agarose
OD	Optische Dichte
Pank	Pantothenatkinase
PARK-Lokus	Parkinsongenlokus
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PKAN	Pantothenatkinase – assoziierte Neurodegeneration
PLA2G6	Phospholipase A ₂ Gruppe VI
PLAN	PLA2G6 – assoziierte Neurodegeneration
PNS	Peripheres Nervensystem
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rcf	Relative Zentripetalbeschleunigung (Relative Centrifugal Force)
RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (Reactive Oxygen Species)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (Revolutions Per Minute)

SD	Standardabweichung
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfat-Polyacrylamid Gelelectrophoresis)
SENDA	Static Encephalopathy of Childhood with Neurodegeneration in Adulthood
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (Single Nucleotide Polymorphism)
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphat
TOM22	Translokase der mitochondrialen Außenmembran 22kDa Untereinheit (Translocase of the outer mitochondrial membrane)
VEP	Visuell Evoziertes Potential
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung – Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (NBIA)

1.1 Definition und Überblick

NBIA – Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn (NBIA, engl.: Neurodegeneration With Brain Iron Accumulation) – ist im Gegensatz zu den bekannten Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, Chorea Huntington oder Multiple Sklerose eine sehr seltene, heterogene, zum Großteil autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung im Formenkreis der neurodegenerativen Erkrankungen des zentralen Nervensystems (ZNS).

Gemeinsame Charakteristika aller NBIA-Patienten sind progressiv fortschreitende neurologische Symptome und Eisenablagerungen in den Basalganglien, die mit Magnetresonanztomographie (MRT) nachgewiesen werden können. Das Spektrum der Merkmalsausprägung reicht von einer schweren progressiv verlaufenden Erkrankung anfangend im Kindesalter bis zu mild ausgeprägten Symptomen, die erst im Erwachsenenalter sichtbar werden. Hauptsymptome sind neurologische Störungen, die zu Gehverlust, Sprech- und Sehstörung, Behinderung der Nahrungsaufnahme und Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten führen. Die Behandlung von NBIA ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt rein symptomatisch.

Das Krankheitsbild mit den Hauptsymptomen Bewegungsstörung, Dysarthrie und geistiger Behinderung wurde zum ersten Mal 1922 von Julius Hallervorden und Hugo Spatz beschrieben und als Hallervorden-Spatz-Syndrom bezeichnet [47]. Nachdem beide Ärzte während des Dritten Reichs in das Euthanasie-Programm verstrickt waren, wurde die ursprüngliche Krankheitsbezeichnung mittlerweile weitgehend verlassen [124, 130]. Zusätzlich ist durch den Fortschritt in der Molekulargenetik inzwischen eine weitere Unterteilung in Subtypen anhand der zugrunde liegenden Genetik möglich, so dass sich der Name NBIA als Überbegriff in den letzten Jahren durchgesetzt hat. Eine strikte Einteilung anhand der Genetik widerspricht jedoch dem klinischen Alltag. Trotz identischer Mutationen haben

Patienten nicht immer dieselbe Symptomatik und zeigen ein unterschiedliches Therapieansprechen.

Molekulargenetisch können die im Folgenden beschriebenen Subtypen unterschieden werden.

Erkrankungen bei Patienten mit Mutation im gleichen Gen und zum Teil ähnlicher Symptomatik, bei denen jedoch keine Eisenablagerungen beschrieben wurden, werden als allelische Erkrankungen bezeichnet (Kap. 1.2, Tabelle 1.1).

1.2 Subtypen

Die Zuordnung einer Erkrankung zur Gruppe NBIA beruht auf der klinischen und bildgebenden Diagnostik. Die Entdeckung des ersten NBIA-Gens, Pantothenatkinasegen 2 (*PANK2*), im Jahr 2001 stellte eine Vorläuferrolle für die zukünftige Entdeckung und Beschreibung weiterer klinischer Subtypen dar [42, 142]. Neben *PANK2* und *PLA2G6* (Phospholipase A₂-Gen, Gruppe VI) wurden inzwischen fünf weitere Gene beschrieben, deren Mutationen zu fehlerhaften oder fehlenden Proteinen führen und die Ursache für NBIA und allelische Erkrankungen sind [42]. Kürzlich gelang unserer Arbeitsgruppe (Helmholtz Zentrum München, Humangenetik, Arbeitsgruppe Dr. Prokisch) die Identifizierung eines weiteren, bisher in seiner Funktion unbekanntem NBIA-Gens: *C19orf12*.

Auf Grund der geringen Fallzahlen und möglicher Foundereffekte kann eine genaue Prozentangabe der einzelnen Subtypen nur geschätzt werden. Mutationen im *PANK2*-Gen sind für ca. 50% aller NBIA-Fälle verantwortlich und stellen somit den Hauptanteil dar [57]. Alle weiteren mutierten Gene sind für einen kleinen Prozentsatz von NBIA und oftmals weitere allelische Erkrankungen verantwortlich. Eine Übersicht der verschiedenen Subtypen zeigt Tabelle 1.1 [104].

Im Bereich der Diagnostik gab es in den letzten Jahren auf Grund der erfolgreichen Identifizierung weiterer Genmutationen und der Verbesserung der klinischen und bildgebenden Diagnostik deutliche Fortschritte [43].

Tabelle 1.1:

NBIA-Subtypen, betroffene Gene und deren chromosomale Lokalisation sowie allelische Erkrankungen

NBIA – Name	Genname	Lokalisation im Genom	Allelische Erkrankungen
Pantothenatkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN)	<i>PANK2</i>	20p13	nicht bekannt
PLA2G6-assoziierte Neurodegeneration (PLAN)	<i>PLA2G6</i>	22q13.1	INAD, Dystonie-Parkinson (beide inzwischen NBIA zugeordnet)
Fettsäurehydroxylase assoziierte Neurodegeneration (FAHN)	<i>FA2H</i>	16q23.1	Familiäre Leukodystrophie Hereditäre spastische Paraplegie
Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration (MPAN)	<i>C19orf12</i>	19q12	bisher ein Fall von Parkinson
Neuroferritinopathie	<i>FTL</i>	19q13.3	Hyperferritinämie-Katarakt-Syndrom
Aceruloplasminämie	<i>CP</i>	3q24-q25	nicht bekannt
Kufor-Rakeb-Syndrom (Park9)	<i>ATP13A2</i>	1p36	Monogene Parkinsonerkrankung
Woodhouse-Sakati-Syndrom	<i>C2orf37</i>	2q31.1	nicht bekannt

1.2.1 Pantothenatkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN)

Bei etwa der Hälfte aller NBIA-Patienten wird auf molekularer Ebene eine Mutation im Pantothenatkinasegen 2 (*PANK2*) diagnostiziert, weshalb diese Krankheit Pantothenatkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN) genannt wird. Sie zählt zu den autosomal-rezessiv vererbten Erkrankungen des Coenzym A-Stoffwechsels [43]. In

der Bildgebung ist in allen Fällen das typische ‚Tigerauge‘ zu sehen (Kap.1.3.2) [57]. Basierend auf der Anzahl an beobachteten Fällen in der Bevölkerung wird eine Prävalenz von ein bis drei auf 1 000 000 für PKAN geschätzt [75]. Je nach Krankheitsbeginn und -verlauf werden zwischen klassischer und atypischer PKAN unterschieden. In den letzten Jahren zeigt sich aber ein immer breiteres phänotypisches Spektrum, oftmals mit Anteilen aus beiden Kategorien [42].

1.2.1.1 PKAN – Symptomatik

1.2.1.1.1 Klassische PKAN

Die Mehrheit der PKAN-Fälle weist die klassische Form auf und zeigt ein relativ homogenes Krankheitsbild. Patienten mit zwei Nullmutationen und somit vollständigem Funktionsverlust des Proteins zeigen einen früheren Krankheitsbeginn als Patienten mit noch erhaltener Restenzymfunktion von Pank2 [53]. Der Krankheitsbeginn liegt im Kindesalter (< 6 Jahre, Durchschnitt: 3.4 ± 3.0 Jahre) mit einer raschen Progredienz entsprechend der von Hallervorden ursprünglich beschriebenen Form [47, 57]. Die neurologischen Kardinalsymptome sind extrapyramidalmotorische Störungen wie Dystonie, Dysarthrie und Rigidity. Dystonie tritt nahezu immer als frühes Symptom auf und ist der Grund für die beobachtete Gang- und Haltungsinstabilität [27, 57, 125]. Die fokale Dystonie, die zunächst meist den Kopf- und die Extremitätenmuskulatur betrifft, geht im weiteren Verlauf in eine generalisierte Dystonie über [57]. Viele der Kinder verlernen das Laufen innerhalb weniger Jahre nach Krankheitsbeginn, manche erlernen diese Fähigkeit sogar nie [53, 57].

Neben der extrapyramidalmotorischen Symptomatik finden sich je nach Literaturangaben in 30 bis über 80% Pyramidenbahnzeichen wie Spastik, Hyperreflexie und ein positiver Babinskireflex [53, 57, 110].

Neben der zu Beginn nicht einfach zuzuordnenden neurologischen Symptomatik zeigen die meisten Kinder auch eine allgemeine Entwicklungsstörung, und manchmal wird fälschlicherweise zunächst ein ADHS diagnostiziert [43]. Die kognitive Leistung der Betroffenen weist große Unterschiede auf und zeigte in einer Studie von Freeman et al. (2007) über- und unterdurchschnittliche IQ-Werte [33].

Dabei fand sich eine Korrelation zwischen Alter bei Krankheitsbeginn und Intelligenz. Patienten mit schwerstverlaufender PKAN-Erkrankung und frühem Symptombeginn hatten den geringsten IQ [33].

Auf Grund der geringen Fallzahlen gibt es immer wieder unterschiedliche Angaben bezüglich der Symptommhäufigkeit. Pellecchia et al. (2005) berichtete, dass nur 20% der Patienten an einer Retinopathie litten [110]. In der Kohorte von Hartig et al. (2006) wurde in knapp 50%, in der von Hayflick et al. (2003) sogar in zwei Drittel der untersuchten Patienten klinisch oder elektroretinographisch eine Retinopathie diagnostiziert [53, 57]. Möglicherweise gibt es eine Diskrepanz zwischen klinisch sichtbarer und elektroretinographisch erfassbarer Retinitis pigmentosa, bzw. werden entsprechende Untersuchungen nicht immer bei allen Patienten durchgeführt. Eine Retinitis pigmentosa wird aber definitiv häufiger bei klassischen als bei atypischen PKAN-Patienten gesehen [29, 43]. Eine Optikusatrophie wurde dahingegen kaum diagnostiziert [53, 57, 110].

Die Krankheit verläuft meist in Schüben, unterbrochen von Phasen relativer Stabilität. Infektionen oder andere katabole Stresssituationen scheinen keinen Einfluss auf die Krankheitsprogression zu haben [43]. Im fortgeschrittenen Stadium ist auf Grund von Dysphagie und gastroösophagealem Reflux oft eine künstliche enterale Ernährung nötig. Im Endstadium treten meist sekundäre Komplikationen wie Aspirationspneumonien und Kachexie auf. Diese Ursachen führen letztendlich zum Tod der Patienten. [57].

1.2.1.1.2 Atypische PKAN

Das Spektrum der atypischen PKAN ist relativ heterogen. Der Krankheitsbeginn ist später (durchschnittlich 13.7 ± 5.9 Jahre) und die Progression meist langsamer als bei klassischer PKAN, so dass es noch Erwachsene mit molekulargenetisch bestätigter PKAN im Alter von 30-50 Jahren gibt [42-43, 57]. Größtenteils finden sich bei diesen Patienten Missensmutationen in *PANK2* [53].

Im Gegensatz zur klassischen PKAN zeigen die meisten Patienten Sprachstörungen, wie zum Beispiel Palilalia oder Tachylalia. Psychiatrische Symptome sind ebenfalls häufig [57, 96]. Dies kann durch Persönlichkeitsveränderung mit Impulsivität,

heftigen Zornausbrüchen oder Depression zum Ausdruck kommen. Erst im späteren Verlauf kommen vermehrt Symptome der klassischen PKAN zum Vorschein. Diese sind Spastik, Hyperreflexie und weitere Pyramidenbahnzeichen, was zunehmend zu Gangschwierigkeiten führt. Auch das bei Parkinsonpatienten typische „Einfrieren“ oder ein essentieller Tremor wurden beobachtet [45, 57, 82]. Insgesamt sind motorische Symptome im Vergleich zur klassischen PKAN schwächer ausgeprägt beziehungsweise schreiten langsamer fort [57].

Zusätzliche Symptome wie orofaziale Dystonie und laborchemische Veränderungen wie erhöhte Präbetalipoproteinspiegel und Akanthozyten im Blut stehen ebenfalls mit *PANK2*-Mutationen in Zusammenhang und werden beim HARP-Syndrom (Hyperpräbetalipoproteinämie, Akanthozytose, Retinitis pigmentosa und Degeneration des Globus Pallidus) beobachtet [17, 105].

1.2.1.2 *PANK2* – Mutationen

Das *PANK2*-Gen ist auf dem Chromosom 20p13 lokalisiert und besteht aus sieben Exons [127, 142]. Von den vier Pantothenatkinasen des Menschen ist *PANK2* die einzige Isoform, die im Mitochondrium lokalisiert ist [1, 63, 66, 69]. Pantothenatkinasen katalysieren den ersten Schritt in der Synthese von Coenzym A (CoA). CoA spielt unter anderem für den Energiehaushalt, den Fettsäure- und Neurotransmitter- sowie Glutathionmetabolismus eine entscheidende Rolle [142]. Als eines der Schlüsselenzyme der CoA-Biosynthese katalysieren Pantothenatkinasen die Phosphorylierung von Pantothenat (Vitamin B5), N-Pantothenoylcystein und Pantethein [1]. Das Produkt reagiert im gesunden Gewebe im darauffolgenden Schritt mit Cystein [41]. Bei defekter *PANK2* wird vermutet, dass nicht verwertetes Cystein akkumuliert und zur Komplexbildung mit Eisen sowie zur Autooxidation unter der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt [111]. Freie Radikale, die Zytotoxizität von Cystein sowie die durch Eisen induzierte Peroxidation von Lipiden können über die Zerstörung von Membranphospholipiden zur Apoptose führen [142]. Die Basalganglien und die Netzhaut gehören dabei zu den Geweben, die am sensibelsten auf oxidativen Stress reagieren und die bei NBIA am meisten betroffen sind [66, 132].

Die Dyshomöostase des Eisenmetabolismus scheint somit zur Pathogenese von PKAN beizutragen.

Im Tierversuch zeigen auch PKAN-*Drosophila melanogaster* Modelle erhöhte Eisenablagerungen im Gehirn sowie Sterilität und Bewegungsstörungen [2, 12, 139]. Knockout-Mäuse für *PANK2* hingegen weisen eine Retinadegeneration und eine Störung in der Spermatogenese auf. Ein charakteristischer neurologischer Phänotyp ist bisher jedoch nicht zu erkennen [74].

1.2.2 PLA2G6 – assoziierte Neurodegeneration (PLAN)

PLAN ist ein weiterer Subtyp von NBIA. Die zugrunde liegende Genmutation wurde 2006 von Morgan et al. identifiziert [94]. Die Gruppe der PLAN-Patienten wird anhand des Krankheitsbeginns nochmals unterteilt. Patienten mit sehr frühem Krankheitsbeginn zeigen einen relativ homogenen Phänotyp, der als infantile neuroaxonale Dystrophie (INAD) bezeichnet wird. Da über 50% dieser Patienten die typischen Eisenablagerungen in den Basalganglien aufweisen, werden sämtliche Patienten mit passender Symptomatik zu NBIA gezählt, selbst wenn zum Zeitpunkt der Bildung (noch) keine Eisenablagerungen zu sehen sind [44, 76].

Wie bei PKAN gibt es auch in der PLAN-Kohorte Patienten mit einem späteren Krankheitsbeginn und unterschiedlicher Symptomatik. Diese Form wird als NAD mit Beginn im Kindesalter (childhood NAD) oder atypische NAD bezeichnet [44, 76]. Desweiteren wurden einige Familien mit (Dystonie-) Parkinsonismus und *PLA2G6*-Mutation beschrieben [42, 107, 141].

1.2.2.1 PLAN – Symptomatik

1.2.2.1.1 Infantile Neuroaxonale Dystrophie (INAD)

Infantile neuroaxonale Dystrophie ist klinisch gesehen ein relativ homogenes Krankheitsbild. Der Krankheitsbeginn tritt bereits im Alter von weniger als zwei Jahren ein [3]. Die typischen Kennzeichen sind vor allem neurologische Symptome und eine rasche psychomotorische Regression.

Die Kinder weisen eine globale Entwicklungsstörung auf, gefolgt von einem Verlust bereits erreichter Meilensteine wie beispielsweise des ‚Laufens‘ [3, 14, 44, 100]. In diesem Zusammenhang sind oft Dystonie, Gangunsicherheit und Ataxie zu beobachten, ebenso Pyramidenbahnzeichen [44, 76, 100]. Zunehmende vor allem stammbetonte Hypotonie und muskuläre Schwäche sind häufig. Diese entwickeln sich im Verlauf oftmals zu einer spastischen, manchmal auch schlaffen Tetraparese [3].

Einige Patienten leiden auch an generalisierten Krampfanfällen, im Elektroenzephalogramm (EEG) zeigen sich teils schnelle Rhythmen [3, 14, 44].

Ophthalmologisch fallen bereits frühzeitig prominente Symptome auf: viele Kinder schielen und haben einen Nystagmus. Im weiteren Krankheitsverlauf entwickelt sich – im Gegensatz zur PKAN mit vorherrschender Retinopathie – oftmals eine Optikusatrophie, die bis zur Erblindung führen kann [3, 76, 100].

Der Abbau motorischer und kognitiver Fähigkeiten schreitet schnell voran, und die Kinder versterben meist an sekundären Komplikationen noch innerhalb des ersten Lebensjahrzehnts [43].

1.2.2.1.2 NAD mit Beginn im Kindesalter / Atypische NAD (childhood NAD)

Diese Untergruppe der PLAN-Patienten ist deutlich geringer mit bisher insgesamt acht beschriebenen Fällen [75]. Das klinische Spektrum der atypischen NAD-Patienten ist wesentlich heterogener und zeigt ebenfalls eine deutliche Überlappung mit Symptomen der PKAN-Patienten [42]. Im Gegensatz zur INAD erfolgt der

Krankheitsbeginn nach dem Kleinkindalter mit ca. vier Jahren [44]. Einige Hauptsymptome wie Ataxie und Gangunsicherheit sind auch bei diesen Patienten vorherrschend. Nystagmus, Optikusatrophie, Tetraparese und Krampfanfälle treten ebenfalls mit einer der INAD-Fälle vergleichbaren Häufigkeit auf [94]. Im Gegensatz dazu wurden bisher weder muskuläre Hypotonie noch schnelle EEG-Rhythmen nachgewiesen, die bei INAD-Patienten häufig zu finden sind. Hinzu kommt bei einigen Patienten eine Verzögerung der Sprachentwicklung und eine verminderte soziale Interaktion [43].

Ähnlich wie bei Patienten mit PKAN werden extrapyramidalmotorische Symptome wie progressive Dystonie, Dysarthrie sowie neurologisch bedingte Verhaltensstörungen wie Impulsivität, Ablenkbarkeit, geringe Aufmerksamkeitsspanne, Hyperreaktivität sowie emotionale Labilität festgestellt [42]. Die Progression ist jedoch langsamer als bei INAD-Patienten [44, 76].

Das Karak-Syndrom¹ mit PKAN-typischer Symptomatik sowie einer zerebellären Atrophie wird auf Grund der gefundenen *PLA2G6*-Mutation ebenfalls zur atypischen NAD gerechnet [94, 97].

1.2.2.1.3 PLAN mit Beginn im Erwachsenenalter (Adult onset PLAN) / PARK14

Paisan-Ruiz et al. (2009) berichtete von zwei Familien mit Parkinsonismus und Dystonie, bei denen sich eine *PLA2G6*-Mutation segregierte [107]. Die Betroffenen wiesen außer einem späten Krankheitsbeginn (2.-3. Lebensjahrzehnt) und Parkinsonismus ähnliche Symptome wie Patienten mit atypischer NAD auf: abnormer Gang, Dystonie, Dysarthrie und psychiatrische Störungen. Allerdings war im MRT keinerlei Eisenansammlung zu erkennen [107]. Auch die hier initial beobachtete rasante Ansprache auf Levodopa wurde bisher bei keinem Patienten mit atypischer NAD beschrieben [43]. Daraufhin wurden diese Patienten zunächst den autosomal-rezessiven Parkinsonismus-Syndromen (PARK14) zugeordnet [51].

¹ PKAN – ähnliche Symptomatik mit frühem Beginn und zusätzlich zerebellärer Ataxie, Dystonie und Spastik in einer Familie aus Karak (Stadt in Jordanien)

Kürzlich wurde von zwei weiteren Familien mit frühzeitigem Parkinsonismus und *PLA2G6*-Mutation berichtet. Allerdings war keine Dystonie zu diagnostizieren, aber einer der Patienten wies typische Eisenablagerungen in den Basalganglien auf [141]. Als erster Nachweis einer vermehrten Eisenakkumulation bei diesen Patienten besteht eine direkte Verbindung zum PLAN-Phänotyp. [42].

1.2.2.2 *PLA2G6* – Mutationen

Das *PLA2G6*-Gen ist auf dem Chromosom 22q13.1 lokalisiert und kodiert eine mitochondriale Ca^{2+} -unabhängige Gruppe VI Phospholipase A_2 [94, 122]. Phospholipase A_2 -Enzyme katalysieren die Hydrolyse von Glycerophospholipiden zu einer freien Fettsäure (normalerweise Arachidonsäure) und einem Lysophospholipid. Sie spielen eine Rolle in der Apoptoseregulation und sind für die Zellmembranhomöostase wichtig [7-8].

Das *PLA2G6*-Gen besteht aus 17 Exons. Durch alternatives Spleißen entstehen Transkripte, die mehrere Isoformen kodieren [78]. Mutationen, die ein Fehlen des Proteins zur Folge haben, führen zu INAD mit frühem Krankheitsbeginn und rascher Progression [94]. Compound-heterozygote Mutationen korrelieren möglicherweise mit einem späteren Krankheitsbeginn. Durch eine eventuell erhaltene Restfunktion des Proteins zeigt sich ein von der infantilen NAD abgrenzbarer, milderer Phänotyp [44, 94].

1.2.3 Fettsäurehydroxylase assoziierte Neurodegeneration (FAHN)

1.2.3.1 FAHN – Symptomatik

FAHN ist ein sehr seltener und erst kürzlich entdeckter NBIA-Subtyp mit bisher zwei betroffenen Familien [72]. Zu Beginn der Erkrankung ist vor allem die untere Extremität in Form von Dystonie betroffen, was bereits im Vorschulalter zu Gangunfähigkeit führt. Weitere Symptome wie Ataxie, Dysarthrie und fortschreitende Tetraparese inklusive Pyramidenbahnzeichen folgen. Meistens werden Strabismus, Nystagmus und eine Optikusatrophie diagnostiziert.

Im Verlauf der Krankheit werden epileptische Anfälle beobachtet, der Intellekt scheint aber verhältnismäßig wenig beeinflusst [72, 75]. Im Gegensatz zu Patienten mit (infantiler) neuroaxonaler Dystrophie (NAD/INAD) zeigen die FAHN-Patienten keine periphere Neuropathie (siehe 1.3.1.2) [72]. Möglicherweise gibt es in peripheren Geweben im Gegensatz zum ZNS eine zweite Fettsäure-2-hydroxylase (FA2H), die dort als „Rettungsenzym“ wirkt [49].

Die Kombination von Symptomatik und Bildgebung mit Eisenablagerung in den Basalganglien sowie pontozerebellärer Atrophie impliziert die Zugehörigkeit zum Formenkreis NBIA. Somit sind die bereits bekannten Krankheitsbilder der familiären Leukodystrophie und die der hereditären spastischen Paraplegie, die ebenfalls eine Mutation im *FA2H*-Gen aufweisen, allelische Erkrankungen [26, 28].

1.2.3.2 *FA2H* – Mutationen

FA2H ist auf dem Chromosom 16q23.1 lokalisiert und besteht aus sieben Exons [104]. Es spielt eine wichtige Rolle in der Lipidsignaltransduktion und katalysiert einen entscheidenden Schritt in der Ceramidsynthese [6]. Einige Ceramide zählen zu den essentiellen Lipidkomponenten des normalen Myelins [49, 72].

1.2.4 Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration (MPAN)

In der Arbeitsgruppe um Dr. Prokisch wurde kürzlich ein neues NBIA-Gen entdeckt. Die Daten des folgenden Kapitels entstammen weitgehend dem Paper von Hartig et al. 2011 sowie mündlicher Information [54].

1.2.4.1 *C19orf12* – Mutationsscreening

Als Neuropädiater diagnostiziert und behandelt Dr. T. Kmiec aus Warschau unter anderem auch Patienten mit der Diagnose NBIA. Auf Grund der langjährigen Zusammenarbeit mit der Humangenetik der Technischen Universität München (TUM) konnte eine Kohorte von 52 polnischen Indexpatienten erstellt werden, die durch Dr. Kmiec anhand der klinischen Symptome und entsprechender Bildgebung als NBIA klassifiziert wurden. Im Institut für Humangenetik der TUM wurde anschließend die genomische DNA dieser Patienten auf die häufigsten bisher bekannten NBIA-Mutationen untersucht. 28 Patienten wiesen Mutationen in *PANK2* auf. In den Genen *PLA2G6*, *FTL* oder *CP* konnte bei keinem der Patienten eine Mutation diagnostiziert werden.

Unter den untersuchten Nicht-PKAN Patienten (24 Indexpatienten) befand sich eine Familie mit fünf Kindern, davon drei mit klinischer NBIA-Diagnose. Daraufhin wurden in dieser Familie genomweite Kopplungsanalysen durchgeführt. Dabei zeigte sich eine homozygote 1.12 Mb große Kandidatenregion im Bereich des Chromosoms 19q12 (Abbildung 1.1A).

Durch anschließende Sequenzierung der Gene dieses Abschnittes konnte eine Mutation im Gen *C19orf12* identifiziert werden. Alle drei betroffenen Kinder waren homozygot für diese Mutation, die beiden Eltern sowie zwei gesunde Geschwister heterozygot (Abbildung 1.1B).

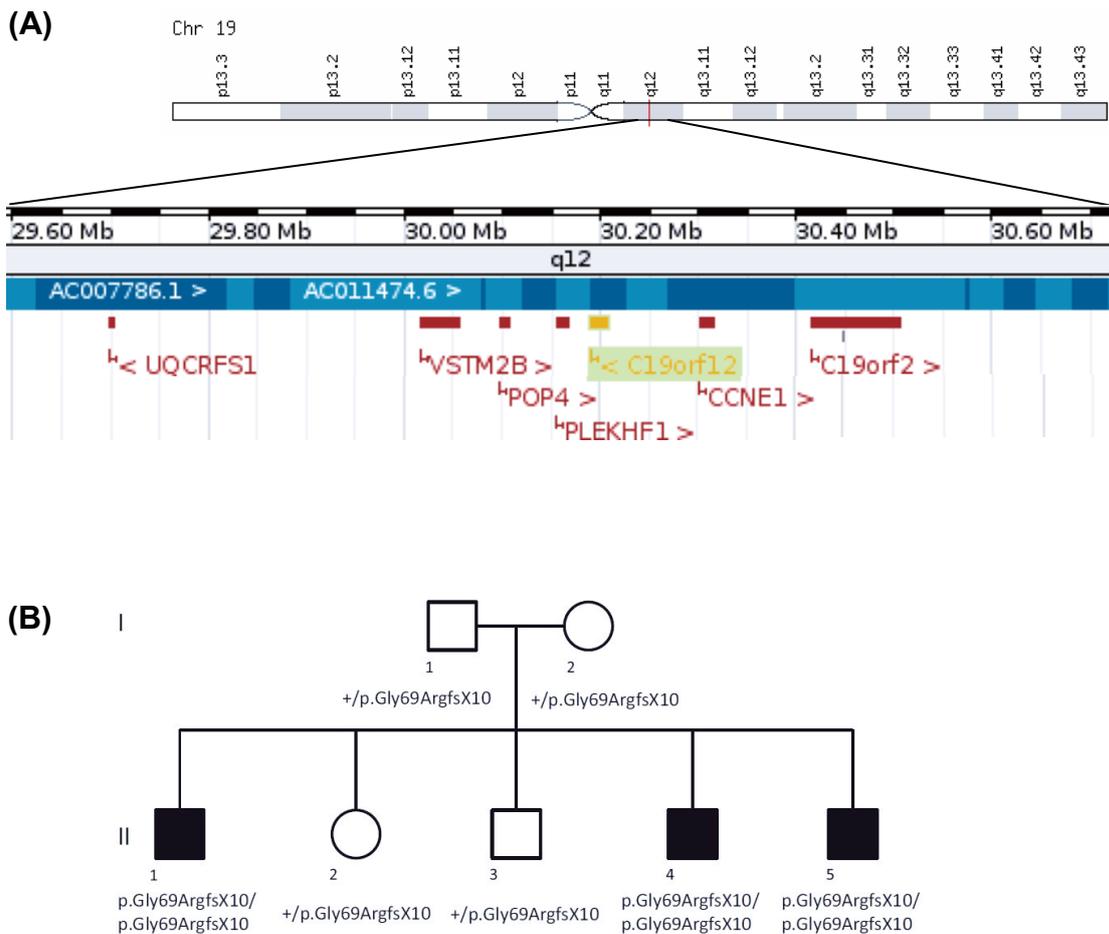


Abbildung 1.1: Kandidatengene im Bereich C19q12 und Stammbaum einer Indexfamilie

(A) Durch Kopplungsanalysen wurde eine 1.12 Mb große Kandidatenregion im Abschnitt C19q12 identifiziert. Die in Frage kommenden Gene (rot bzw. gelb) wurden daraufhin sequenziert. Hierbei wurden Mutationen in C19orf12 identifiziert [37] (modifiziert).

(B) Der Stammbaum einer Indexfamilie zeigt bei den drei erkrankten Kindern dieselbe Mutation in C19orf12, p.[Gly69Argfs*10]; p.[Gly69Argfs*10]. Die Eltern sowie die gesunden Kinder sind heterozygot für diese Mutation [54].

Ein daraufhin durchgeführtes Mutationsscreening des C19orf12-Gens bei den verbleibenden 23 Indexpatienten ergab neben der oben erwähnten Familie bei zwölf weiteren Indexpatienten eine Deletion von 11 bp, p.[Gly69Argfs*10]; p.[Gly69Argfs*10]. *In silico*-Analysen sagen vorher, dass sie zu einer Änderung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Stoppcodon führt. Insgesamt waren somit 13 Indexpatienten homozygot für diese Mutation. Drei weitere Indexpatienten waren com-

pound-heterozygot für die erwähnte Deletion und wiesen je eine der folgenden Missensmutationen auf: p.[Gly65Glu], p.[Gly53Arg] und p.[Thr11Met]. Ein weiterer Indexpatient hatte zwei compound heterozygote Missensmutationen: p.[Gly69Arg]; p.[Lys142Glu], und zwei weitere Indexpatienten hatten je homozygote Missensmutationen: p.[Thr11Met]; p.[Thr11Met], bzw. p.[Gly69Arg]; p.[Gly69Arg]. Bei fünf Patienten der polnischen Kohorte konnte keine Mutation im Gen *C19orf12* nachgewiesen werden.

Insgesamt wurden also bei 19 Indexpatienten der polnischen Kohorte Mutationen in *C19orf12* gefunden. Zur Kontrolle wurden 1000 Chromosomen gesunder Patienten in diesem Bereich sequenziert ohne Mutationen zu detektieren.

Dieses bisher in seiner Funktion unbekanntes Gen stand bis dahin noch nicht in Zusammenhang mit NBIA oder einer anderen Erkrankung. Mit 36% innerhalb dieser Kohorte scheint *C19orf12* für einen wesentlichen Anteil der bis dahin 'idiopathischen' NBIA-Fälle verantwortlich zu sein (Abbildung 1.2).

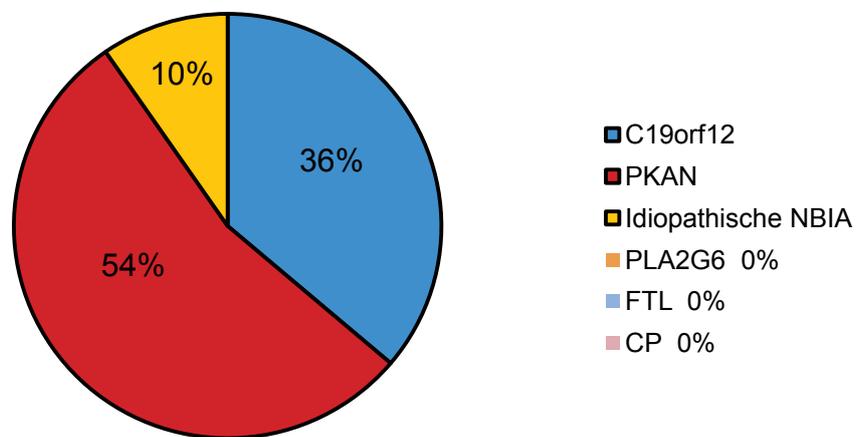


Abbildung 1.2: Verteilung der verschiedenen NBIA-Gene bei 52 polnischen Patienten

Mutationen in *PANK2* sind für 54% und Mutationen in *C19orf12* für 36% der polnischen NBIA-Fälle verantwortlich. Idiopathische NBIA ohne molekulare Diagnose machen die verbleibenden 10% aus. In *PLA2G6*, *FTL* und *CP* wurden in dieser Kohorte keine Mutationen gefunden [54] (modifiziert).

Zusätzlich zu den Indexpatienten der polnischen Kohorte wurden bei anderen NBIA-Patienten inzwischen weitere Mutationen in *C19orf12* gefunden. Zwei kürzlich berichtete Patienten hatten die Mutationen p.[Thr11Met]; p.[Gly66del], ein Patient p.[Gly69Argfs*10]; p.[Gly66del] [24]. In einer italienischen Kohorte fanden sich die Mutationen p.[Gln96Pro]; p.[Gln96Pro], p.[Gly58Ser]; p.[Gly58Ser], sowie bei einem Patienten ausschließlich die heterozygote Mutation p.[Phe100Alafs*3] [109].

Die in dieser Arbeit beschriebenen funktionellen Studien wurden mit Fibroblasten eines Patienten mit der Mutation p.[Ala67Glyfs*15]; p.[Ala67Glyfs*15] durchgeführt. Beim Menschen existieren zwei Isoformen von *C19orf12*. Die Nomenklatur der *C19orf12*-Mutationen basiert auf der Isoform 1 (NM_001031726.3), der OMIM-Eintrag ist unter 614298 zu finden [104]. Die *C19orf12*-Genstruktur sowie die beschriebenen Mutationen sind in Abbildung 1.3 zu sehen.

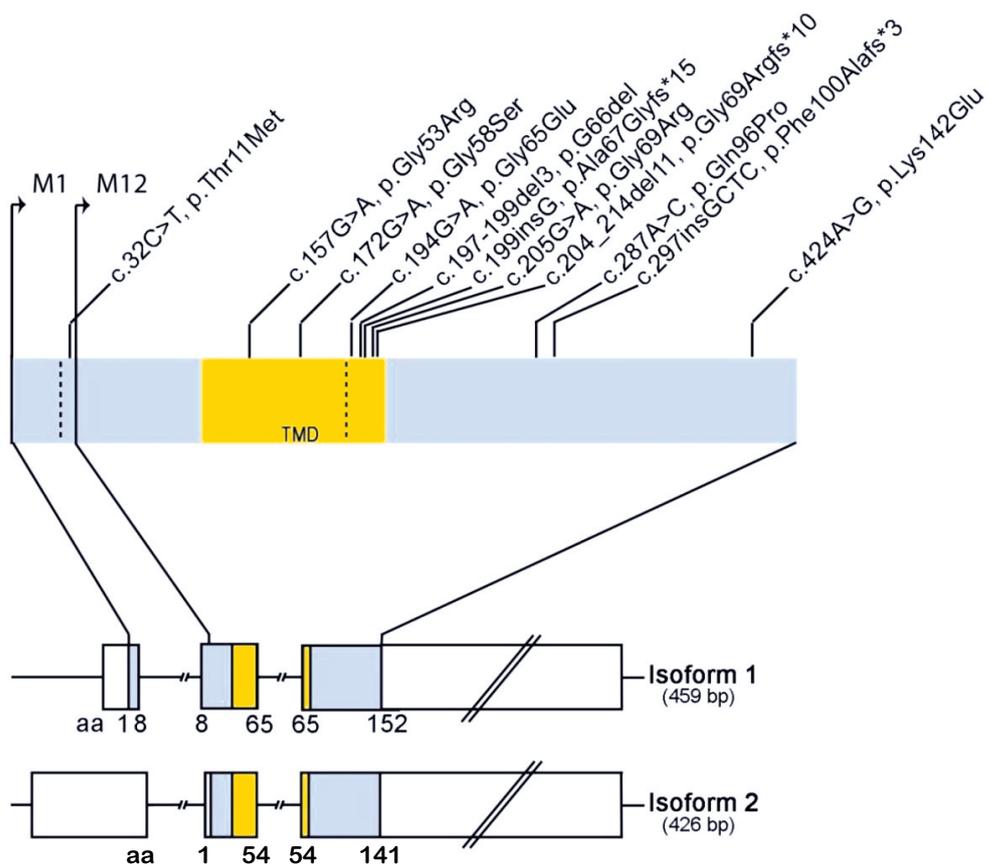


Abbildung 1.3: Genstruktur von *C19orf12* und identifizierte Mutationen

Es wird die Genstruktur der zwei Isoformen von *C19orf12* mit den bisher bekannten Mutationen gezeigt. Die vorhergesagte Transmembrandomäne (TMD) ist gelb markiert. Met 1 und Met 12 stellen die Startpunkte der Isoform 1 bzw. 2 dar [54] (modifiziert). Die Nomenklatur basiert auf der Isoform 1 (NM_001031726.3), Refseq-Zugangsnummer der Isoform 2 ist NM_031448.4.

1.2.4.2 MPAN – Symptomatik

Der Phänotyp der bisher beschriebenen 24 (19 Indexpatienten sowie insgesamt fünf betroffene Geschwister) polnischen Patienten mit Mutationen im Gen *C19orf12* ist untereinander recht homogen.

Der Krankheitsbeginn liegt bei einem Alter von etwa zehn Jahren (Durchschnitt 9.2 Jahre, SD 3.7 bei 18 Patienten mit homozygoter 11 bp Deletion). Die Patienten zeigen fortschreitende neurologische Störungen wie Dysarthrie und Dystonie sowie Pyramidenbahnzeichen. Die Symptome generalisieren im Verlauf und führen nach einigen Jahren zu einer spastischen Para- oder Tetraplegie. Die Progression ist jedoch deutlich langsamer als bei PKAN-Patienten, so dass ein Großteil der Patienten nach mehreren Jahren noch selbständig gehen konnte. Auch psychiatrische Symptome wie Depression, impulsives Verhalten oder Demenz wurden beobachtet. Deutlich häufiger als PKAN-Patienten und bereits früh im Krankheitsverlauf leiden die MPAN-Patienten an einer zumindest teilweisen Optikusatrophie.

1.2.5 NBIA mit Beginn im Erwachsenenalter

Im Gegensatz zu den NBIA-Subtypen, die sich bereits im Kindesalter manifestieren, treten die Symptome bei den folgenden Subtypen erst im Erwachsenenalter auf. Hierzu zählen auch die *PLA2G6* positiven Patienten mit Dystonie-Parkinsonismus. Diese wurden der Übersicht halber jedoch unter 1.2.2.1.3 beschrieben.

1.2.5.1 Neuroferritinopathie

Neuroferritinopathie wird durch Mutationen im *FTL*-Gen (*FTL*: ferritin light chain) auf dem Chromosom 19q13.3 verursacht und autosomal-dominant vererbt [21]. Alle bisher gefundenen Mutationen betreffen Exon 4, am häufigsten ist die

Mutation 460insA [21, 73, 83, 85, 102, 135]. Als intrazellulärer Hauptspeicher für Eisen führen Mutationen im Ferritogen zu veränderter Aufnahme und Abgabe von Eisen in den Geweben. Neuroferritinopathie betrifft einen sehr kleinen Teil der NBIA-Patienten.

Die Patienten werden erst im Alter von etwa 40 Jahren symptomatisch [18]. Der Phänotyp ist sehr variabel. Die meisten Patienten leiden an Chorea oder fokaler, vor allem beinbetonter Dystonie. Auch Parkinsonismus und zerebelläre Ataxie wurden beobachtet [21, 83, 85, 135]. Charakteristisch ist das asymmetrische Auftreten der extrapyramidalmotorischen Symptome. Einige Betroffene entwickeln außerdem eine Dysarthrophonie [20]. Geringer Verlust kognitiver Fähigkeiten ist bei den meisten Betroffenen festzustellen. Das Ausmaß des kognitiven Leistungsabfalls ist aber bei weitem nicht mit dem bei Chorea Huntington vergleichbar [137]. Das Ferritin im Serum liegt bei Männern und postmenopausalen Frauen unterhalb der Norm ($< 20\mu\text{g/l}$), bei prämenopausalen Frauen jedoch im Normbereich [18]. Das Hyperferritinämie-Katarakt-Syndrom (erhöhtes Serumferritin, bilateraler Katarakt, jedoch kein erhöhtes Eisen im Gehirn) ist eine allelische Erkrankung [10].

1.2.5.2 Aceruloplasminämie

Aceruloplasminämie ist eine autosomal-rezessive Erkrankung und wird durch Mutation im *CP* Gen (Coeruloplasmin) auf dem Chromosom 3q24-q25 verursacht [22, 52, 81, 140]. Es kodiert eine Kupfer bindende Ferroxidase und oxidiert toxisches Fe^{2+} zu Fe^{3+} , ohne dass reaktive Sauerstoffspezies entstehen [46, 106]. Außerdem ist es beim Eisentransport durch die Zellmembran beteiligt [133]. Im Gegensatz zu PKAN liegt hier ein primärer Defekt im Eisenmetabolismus vor [41]. Inzwischen sind bereits über 40 verschiedene Mutationen bekannt, die zum Aktivitätsverlust des Enzyms führen [87].

Oftmals zeigt sich eine Symptomentrias mit Retinadegeneration, Diabetes mellitus und neurologischen Symptomen [91-92]. Letztere bestehen aus Dysarthrie, Ataxie, unwillkürlichen Bewegungen mit Dystonie, Tremor und Chorea, Parkinsonismus sowie Abnahme der kognitiven Fähigkeiten. Die Symptome entsprechen weitgehend den Bereichen des Gehirns, in denen das Eisen akkumuliert [87, 93].

Bei vielen Patienten wird präsymptomatisch eine Anämie diagnostiziert. Auch die Serumkupfer- und Serumeisenkonzentration ist erniedrigt, das Serumferritin erhöht. Bei Patienten mit homozygoter Mutation ist die Coeruloplasminkonzentration nicht messbar [87].

1.2.5.3 PARK9 (Kufor-Rakeb Syndrom)

Bis vor kurzem zählte das Kufor-Rakeb Syndrom zu den monogenen Parkinsonerkrankungen (PARK9) und wird autosomal-rezessiv vererbt [58]. Genetisch liegt eine Mutation des Gens *ATP13A2* auf dem Chromosom 1p36 zugrunde. Dieses kodiert für eine lysosomale P-Typ ATPase [115].

Die Patienten zeigen bereits im Jugendalter (meist 12-16 Jahre) typische Parkinson-Symptome wie Tremor, Rigor und Akinese und werden dement. Außerdem kommen Zeichen einer pallido-pyramidalen Degeneration und eine supranukleäre Blickparese zum Vorschein [99].

Die von Schneider et al. (2010) gefundenen atrophischen und hypointensen MRT-Veränderungen (T2 gewichtet) der Basalganglien, v.a. des Putamens und des Nucleus caudatus, deuten auf Eisenablagerungen hin und führten zur Eingliederung in den Formenkreis NBIA [121]. Damit wurde erneut eine Verbindung zwischen einer Parkinsonerkrankung und NBIA belegt [42].

1.2.5.4 Woodhouse-Sakati Syndrom

Das Woodhouse-Sakati Syndrom wurde in verschiedenen Saudi-Arabischen Familien beschrieben und konnte von Alazami et al. (2008) durch Linkageanalyse einer Mutation im Gen *C2orf37* zugeordnet werden. Es kodiert ein Protein des Nukleolus mit bisher noch unbekannter Funktion [5].

Das Syndrom wird durch die Symptome Hypogonadismus, Alopezie, Diabetes mellitus, mentale Retardierung, oftmals Taubheit und neurologische Symptome

definiert [19, 138]. Letztere werden durch einen abnormen Muskeltonus, Haltungsunsicherheit sowie durch ungewollte choreoathetotische und dystone Bewegungen charakterisiert [4].

Die T2-gewichteten MRT-Bilder weisen die für Eisenablagerungen charakteristische Hypointensität der Basalganglien auf. Somit erfolgt die Zugehörigkeit zu NBIA. Auf Grund der extrazerebralen Symptomatik ist aber eine phänotypische Unterscheidung von anderen NBIA-Subtypen möglich.

1.2.6 Idiopathische NBIA

Trotz neuer Methoden der Identifizierung krankheitsverursachender Gene bleibt bei etwa einem Drittel der NBIA-Patienten mit eindeutiger Klinik und Bildgebung die molekulare Genese bisher unklar. Da es in dieser Patientenkohorte keinen einheitlichen Phänotyp zu geben scheint, kann davon ausgegangen werden, dass innerhalb dieser Subgruppe weiterhin genetische Heterogenität besteht und noch mehrere Gene für einen jeweils geringen Prozentsatz an NBIA-Fällen verantwortlich sind [42, 75]. Eine Ausnahme stellt eine kleine Gruppe phänotypisch ähnlicher Patienten dar. Diese leiden als Kind an einer stabilen, quasi statischen Enzephalopathie gefolgt von Neurodegeneration im Erwachsenenalter (SENDA, engl.: Static Encephalopathy with Neurodegeneration in Adulthood) mit plötzlichem Dystonie-Parkinsonismus und Spastik [42, 70]. Da jeweils nur von einem Fall innerhalb dieser Familien berichtet wurde, bleibt offen, ob es sich überhaupt um eine monogenetische autosomal-rezessive Erkrankung handelt oder womöglich um Neumutationen, oder ob sogar Umwelteinflüsse die ausschlaggebende Rolle spielen. Bisher konnte hier noch kein Genlokus gefunden werden [42].

1.3 Diagnostik

Im Folgenden wird auf die Histopathologie, die charakteristische Bildgebung und die Molekulargenetik als Standarddiagnostik näher eingegangen.

Bei den Patienten erfolgen des weiteren Untersuchungen wie zum Beispiel Elektroenzephalogramme, neurophysiologische Untersuchungen oder auch Elektoretinogramme (siehe jeweiliges Kapitel der Subtypen unter „Symptome“) [75].

Differentialdiagnostisch sind – je nach Erscheinungsbild – neben anderen neurodegenerativen Erkrankungen unter anderem die hereditäre Hämochromatose, oder auch Erkrankungen des Kupfermetabolismus wie Menkes-Syndrom und Morbus Wilson in Betracht zu ziehen [13, 16]. Gerade beim Morbus Wilson können ähnliche Veränderungen in der kranialen MRT zu finden sein [59]. Es zeigt sich aber stets eine hepatische Manifestation und bei neurologischer Symptomatik der charakteristische Kayser-Fleischer-Kornealring bei Spaltlampenuntersuchung [61].

1.3.1 Histopathologie

Bevor NBIA anhand der Bildgebung und neuerdings mittels molekularer Methoden diagnostiziert werden konnte, war die NBIA-Diagnostik eine neuropathologische, die primär post mortem bzw. durch eine Hirnbiopsie erfolgte [43, 47].

Bereits bevor das *PANK2*-Gen 2001 von Zhou et al. als Hauptgenlokus für NBIA entdeckt wurde, gab es viele verschiedene histopathologische Beschreibungen von NBIA-Patienten [34, 120, 142]. Anhand klinischer Daten und der entsprechenden Bildgebung stellten Gregory et al. (2009) jedoch fest, dass die Mehrzahl dieser Patienten wohl nicht an PKAN litt, sondern möglicherweise eine andere NBIA-Genmutation aufwies [43]. Dies erklärt, weshalb aktuelle Forschungsergebnisse zum Teil von den früheren abweichen [71].

Die bisherige Literatur berichtet in Fallberichten einzelner Autopsien unterschiedliche histopathologische Befundkonstellationen. Meistens wiesen die untersuchten Gehirne eine globale Atrophie auf [34, 44]. Besonders deutlich ist bei INAD- und

FAHN-Patienten die Kleinhirnatrophie, die sich auch mikroskopisch in einem Purkinjezellverlust widerspiegelt und das pathologische Korrelat von Symptomen wie Ataxie oder Hypotonie sein könnte [44, 68, 72]. Generell ist eine bemerkenswert geringe inflammatorische Antwort zu sehen [71]. Unspezifische Veränderungen vor allem im Globus pallidus und der Substantia nigra, den beiden am meisten betroffenen Basalganglien, sind Demyelinisierung und ein sehr variabler Neuro-nenverlust mit folglich Gliose [3, 71, 111, 125].

Die makroskopisch sichtbare Eisenablagerung im Globus pallidus stimmt vollständig mit der Hypointensität im T2-gewichteten MRT überein (Kap.1.3.2). Das histopathologische Korrelat des ‚Tigerauges‘ im MRT der PKAN-Patienten dürfte sich in einer deutlichen Astroglie, mikroglialen Aktivierung und vor allem im Parenchymverlust des Globus pallidus internus widerspiegeln [71].

Pathologische Untersuchungen mit Nachweis von Eisenablagerungen erfolgten bisher immer an Geweben im Endstadium der Erkrankung. Deshalb bleibt zu klären, ob die Eisenansammlung erst im Verlauf oder bereits im frühen Stadium der Erkrankung erfolgt [66]. Der normale systemische Eisenmetabolismus der Patienten weist darauf hin, dass die Eisenakkumulation eher einen sekundären Effekt darstellt [41].

1.3.1.1 Eisenablagerungen im zentralen Nervensystem (ZNS)

Die wesentlich zur Diagnose beitragenden Eisenablagerungen im Gehirn wurden bereits von Hallervorden und Spatz beschrieben und sind bis heute eines der entscheidenden diagnostischen Kriterien [43, 47]. Dabei sammelt sich das Eisen in den Basalganglien, besonders im Globus pallidus und der Substantia nigra pars reticularis, an [44, 54, 125]. Diese Strukturen sind zwar beim Gesunden ebenfalls eisenhaltig, NBIA-Patienten weisen jedoch – trotz eines normalen systemischen Eisengehalts – einen Eisengehalt der betroffenen Regionen auf, der dem drei- bis vierfachen der Norm entspricht [27, 41, 111]. Die Ansammlung ist so beträchtlich, dass die betroffenen Regionen bereits makroskopisch ohne jegliche Färbung „rostbraun“ erscheinen (Abbildung 1.4 A) [44, 47, 68].

Das Eisen lagert sich sowohl intra- als auch extrazellulär und vor allem perivaskulär ab und lässt sich – je nach Literaturangaben – hauptsächlich in der Mikroglia und/oder den Makrophagen sowie im Zytoplasma von Neuronen nachweisen (Abbildung 1.4 B, C) [43, 48, 54, 68, 71-72, 136].

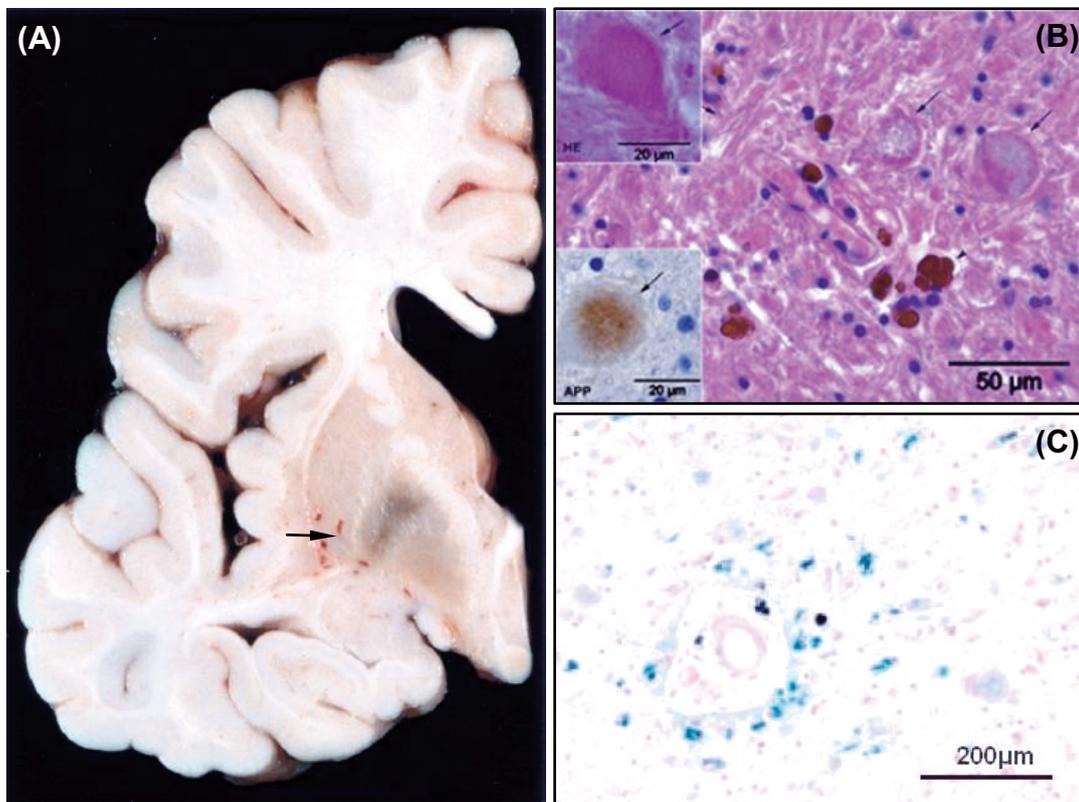


Abbildung 1.4: Eisenablagerungen im Gehirn bei NBIA – makroskopische und mikroskopische Befunde

(A) Die Dunkelfärbung des Globus pallidus (Pfeil) ist im Frontalschnitt des Gehirns eines NBIA-Patienten deutlich zu sehen [68]. (B) Im Globus pallidus eines MPAN-Patienten sind perivaskuläre Eisenansammlungen in Makrophagen (Pfeilspitze) sowie axonale Sphäroide (Pfeile) zu erkennen. Hämatoxylin-Eosin-Färbung [54]. (C) Bei einem PKAN-Patienten werden im Globus pallidus perivaskuläre Eisenablagerungen mit lokaler Ansammlung hämosiderinbeladener Makrophagen deutlich sichtbar. Perls Eisenfärbung [71].

1.3.1.2 Sphäroide im PNS und ZNS

Ein weiteres histologisches Charakteristikum sind axonale Sphäroide. Im peripheren Nervensystem (PNS) wurden sie zunächst nur bei INAD-Patienten diagnostiziert. Deshalb galten diese Veränderungen lange Zeit als pathognomonisch. Seit 1980 ermöglicht eine Biopsie von Nervenendigungen in Haut, Konjunktiva oder Muskel eine weniger invasive Diagnosestellung dieses Subtyps [3, 14, 32]. Allerdings zeigt sich mit dem Wissen um die molekulare Ursache, dass PNS-Sphäroide nicht vollständig mit INAD bzw. einer *PLA2G6*-Mutation übereinstimmen [108]. Es gibt sowohl Patienten mit klinischer INAD-Diagnose und typischen pathologischen Kriterien ohne *PLA2G6*-Mutation als auch Patienten mit einer Mutation im *PLA2G6*-Gen ohne periphere axonale Sphäroide [43, 108].

Im ZNS lassen sich axonale Sphäroide hingegen bei allen NBIA-Patienten nachweisen. Diese haben jedoch eine unterschiedliche mikroskopische Struktur und verschiedene immunhistochemische Reaktionsformen [3, 14, 23, 43].

Bei PKAN-Patienten lassen sich auf Grund der gegenwärtigen Untersuchungen zwei Arten von Sphäroiden unterscheiden [71, 84, 111]. Zum einen finden sich „richtige“ neuroaxonale Sphäroide, die – je nach Vergrößerung – mikroskopisch als kleine, runde Strukturen zu sehen sind (Abbildung 1.5 A). Sie stellen eine unspezifische Form der axonalen Degeneration dar und sind beispielsweise auch bei traumatischen Kopfverletzungen zu sehen und durch ihre Immunreaktivität für Amyloid-Precursor-Protein immunhistochemisch detektierbar [71]. Zum anderen finden sich Sphäroide mit einem etwas größeren Durchmesser von 10-80 µm. Dieser zweite Typ Sphäroide entspricht degenerierenden Neuronen (Abbildung 1.5 A) [71].

Bei einem MPAN-Patienten wurden Sphäroide mit einem Antikörper gegen Amyloid-Precursor-Protein detektiert und ließen sich vor allem im Striatum und Globus pallidus, in geringerer Anzahl unter anderem auch im Thalamus, Hirnstamm und Rückenmark nachweisen (Abbildung 1.4 B) [54].

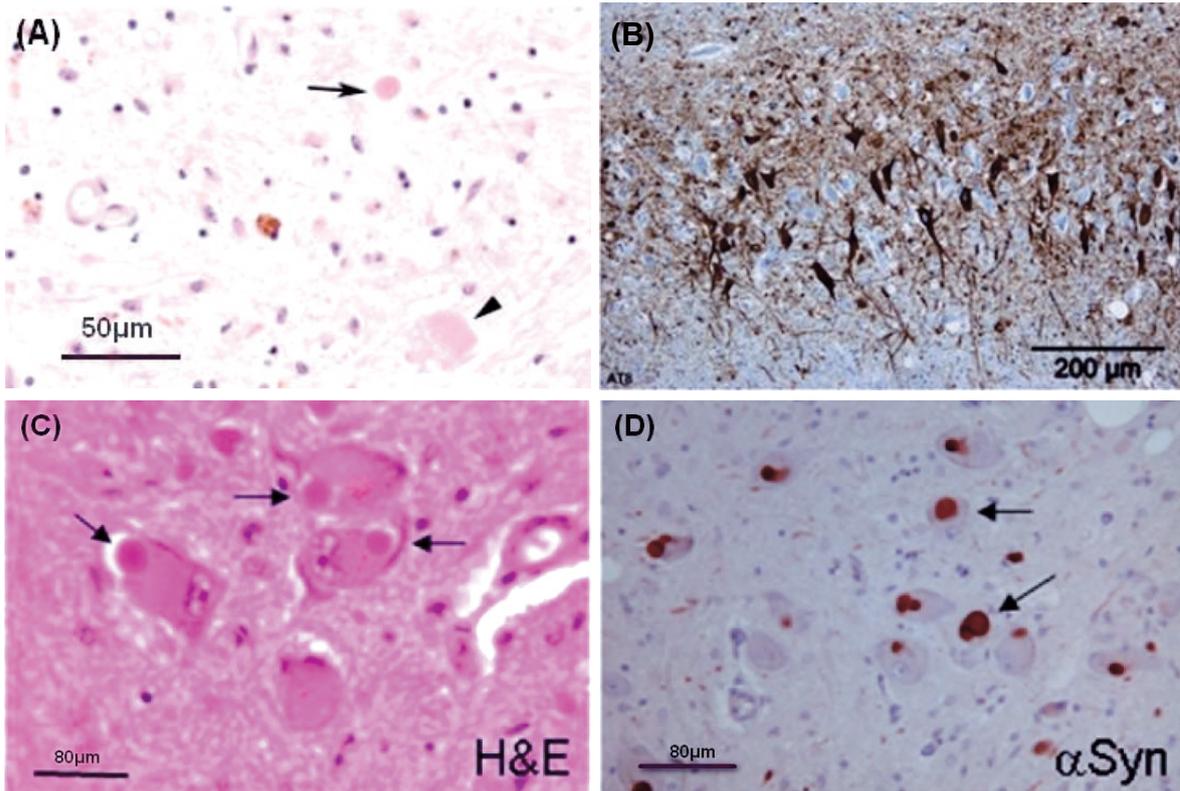


Abbildung 1.5: Nachweis von Sphäroiden und Lewy-Körperchen bei NBIA

(A) PKAN-Gewebe. Es lassen sich zwei Sphäroid-Typen darstellen: größere, degenerierende Neurone (Pfeilspitze) und kleinere neuroaxonale Sphäroide (Pfeil). Im Hintergrund sind Hämosiderinablagerungen zu sehen. Hämatoxylin-Eosinfärbung [71]. (B) MPAN-Gewebe, Hippocampusregion. Hyperphosphorylierte, Tau enthaltene neuronale Einschlusskörperchen können nachgewiesen werden [54]. (C) und (D) PLAN-Gewebe, Substantia nigra. (C) Bei den Patienten finden sich charakteristischerweise Lewy-Körperchen (Pfeile). Hämatoxylin-Eosinfärbung (H&E). (D) Der positive α -Synuclein-nachweis (α Syn) erfolgt mittels Immunhistochemie [108].

1.3.1.3 Nachweis von Tau-Ablagerungen, α -Synuclein und Lewykörperchen

Neben einer allseits positiven Ubiquitinreaktion lässt sich im Gegensatz zu PKAN bei den anderen NBIA-Subtypen (vor allem bei PLAN- und MPAN-Patienten) hyperphosphoryliertes Tau vergleichbar den Tauopathien nachweisen (Abbildung 1.5 B) [41, 54, 71, 108]. Direkte Ablagerungen von Amyloid-Precursor-Protein wurden in NBIA-Geweben grundsätzlich nicht gesehen [34, 108, 120].

Bei Patienten ohne *PANK2*-Mutation wurden außerdem α -Synuclein positive Lewy-Körperchen gesehen (Abbildung 1.5 C, D) [34, 41, 54, 125]. Diese entsprechen den für die Parkinsonerkrankung typischen Lewy-Körperchen und stellen eine mögliche Erklärung der psychiatrischen Symptome und der psychomotorischen Retardierung bei NBIA-Patienten dar [48, 108]. Zwar finden sich Lewy-Körperchen bei einem gewissen Prozentsatz älterer Menschen als Zufallsbefund, bei jungen Leuten sind sie und die anderen beschriebenen Befunde jedoch völlig untypisch [23].

1.3.1.4 Histopathologische Besonderheiten weiterer Subtypen

Es zeigt sich somit eine deutliche Heterogenität nicht nur auf klinischer und molekularer Ebene sondern auch im histopathologischen Befund zwischen PKAN-Patienten und den restlichen NBIA-Subtypen [71]. Bei der Neuroferritinopathie lassen sich makroskopisch außerdem Hohlrumbildungen sehen [21]. Bei der Aceruloplasminämie fallen in den Basalganglien histologisch vor allem bizarre, eisenhaltige Astrozyten auf [67, 91, 95, 103]. Von den Patienten mit Mutation in erst kürzlich entdeckten Genen gibt es bisher teilweise noch keine histopathologischen Ergebnisse, oder sie entsprechen weitestgehend den Befunden der Patienten ohne *PANK2*-Mutation [42, 54, 72, 121].

1.3.2 Bildgebung

Die Bildgebung, in diesem Fall eine MRT des Gehirns, ist oftmals eine der ersten Untersuchungen, wenn Patienten – vor allem Kinder – eine progressive neurologische Symptomatik entwickeln, und hat einen unersetzlichen Stellenwert in der NBIA-Diagnostik [42, 126]. Eine genaue Interpretation der Bildgebung ist nur in Verbindung mit der klinischen Symptomatik möglich. Innerhalb des NBIA-Spektrums zeigen sich abhängig vom NBIA-Subtyp, vom Alter des Patienten und

vom Krankheitsstadium nochmals unterschiedliche Veränderungen. Das Ergebnis der MRT ermöglicht dem Kliniker eine Zuordnung in den Formenkreis NBIA und leitet ihn in Richtung molekularer NBIA-Diagnostik [43]. Bei Unklarheit sollte eine Bildgebung nach drei bis fünf Jahren wiederholt werden [86].

1.3.2.1 Hypointensität der Basalganglien

Der Krankheitsbegriff ‚Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn‘ definiert die nötigen Einschlusskriterien bereits. Es handelt sich hierbei um Eisenablagerungen in den Basalganglien, die sich im T2-gewichteten MRT als Hypointensität der entsprechenden Regionen darstellen (Abbildung 1.6 A) [57, 125]. Diese Regionen erscheinen im T1-gewichteten Bild isodens, was beispielsweise eine Unterscheidung von Calciumablagerungen ermöglicht [43]. Kupferablagerungen wie sie beim Morbus Wilson gesehen werden, können sich in der MRT ähnlich darstellen, so dass die Zuordnung manchmal nur durch nicht bildgebende Verfahren (Bestimmung von Coeruloplasmin, Leberbiopsie) und charakteristische Symptomatik erfolgen kann [59].

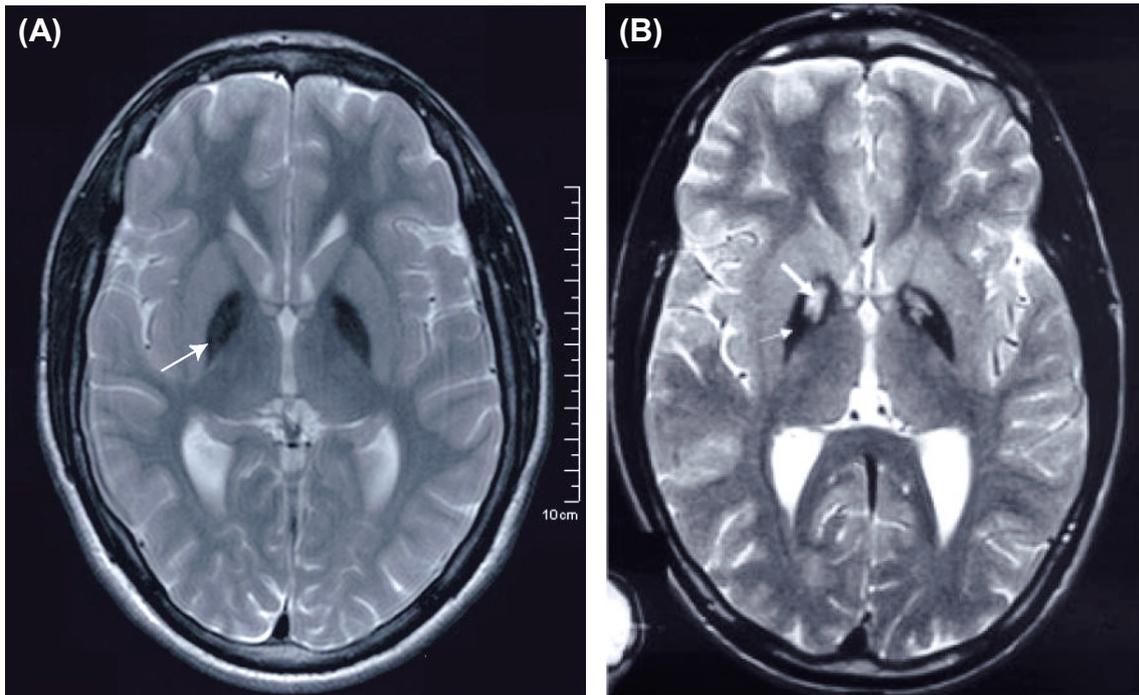


Abbildung 1.6: Hypointensität der Basalganglien und ‚Tigerauge‘ im MRT von NBIA-Patienten

Axiale Schnittführung, 1.5 Tesla, T2-gewichtet. (A) Die bilaterale Hypointensität des Globus pallidus (Pfeil) ist das charakteristische Kennzeichen der Eisenablagerungen im MRT von NBIA-Patienten, hier bei einem Patienten mit Mutation in C19orf12 [54]. (B) Bei PANK2-Mutation findet man fast immer das typische ‚Tigerauge‘. Im Zentrum der Hypointensität der Globi pallidi (dünner Pfeil) zeigt sich deutlich eine Hyperintensität in der anteromedialen Region (dicker Pfeil) [53].

1.3.2.2 Charakteristika einzelner Subtypen

1.3.2.2.1 ‚Tigerauge‘ bei PKAN

Bei Patienten mit *PANK2*-Mutation ist die charakteristische Hypointensität ausschließlich im Globus pallidus und oftmals in der Substantia nigra zu sehen [55, 86]. Außerdem findet man bei fast allen Patienten bilateral im Globus pallidus ein so genanntes ‚Tigerauge‘ [57, 123]. Dies ist eine hyperintense Region im Zentrum des hypointens erscheinenden Globus pallidus und weist auf einen primären Gewebeanfarkt hin, der zu einem begleitenden Ödem beziehungsweise einer Nekrose führt (Abbildung 1.6 B) [57, 142].

Ebenso wie es präsymptomatische Personen (oftmals Geschwister betroffener Patienten) mit bereits NBIA-typischen Veränderungen in der Bildgebung gibt, verändert sich diese im Verlauf der Erkrankung [56]. Es wurde von einem Patienten berichtet, bei dem das zunächst deutlich sichtbare ‚Tigerauge‘ bei einer Kontroll-MRT-Untersuchung nicht mehr nachweisbar war [9]. Ansonsten findet sich eine nahezu 100%-ige Korrelation zwischen *PANK2*-Mutation und dem Tigeraugezeichen im MRT [55, 86]. Bis auf sehr wenige Ausnahmen bei Patienten mit Neuroferritinopathie (dann oftmals Hyperintensität im gesamten Striatum) oder idiopathischer NBIA zeigen nur sehr wenige Patienten ohne *PANK2*-Mutation diese Hyperintensität [18, 57, 62, 75, 86]. Damit kann dieses diagnostische Tool zur Differenzierung zwischen PKAN-Patienten und NBIA-Patienten ohne *PANK2*-Mutation verwendet werden [41].

1.3.2.2 Zerebelläre Atrophie bei INAD und FAHN

Nachdem bei INAD-Patienten zunächst nur selten Eisenansammlungen in den Basalganglien gesehen wurden, konnten größere Studien inzwischen bei über 50% der PLAN-Patienten eine Hypointensität im Globus pallidus und der Substantia nigra nachweisen [31, 76, 86]. Charakteristisches Kennzeichen dieser Patienten sowie der FAHN-Patienten ist außerdem eine Kleinhirnatrophie (Abbildung 1.7 A) [31, 72, 76]. Eine Symptomkombination von (ponto-)zerebellärer Atrophie, gegebenenfalls eine Ausdünnung des Corpus callosum in Kombination mit Eisenablagerung im Gehirn ist ein sehr seltener Befund und lässt bei dessen Auftreten stets eine *PLA2G6*- oder nach neuester Erkenntnis auch *FA2H*-Mutation vermuten [42, 44].

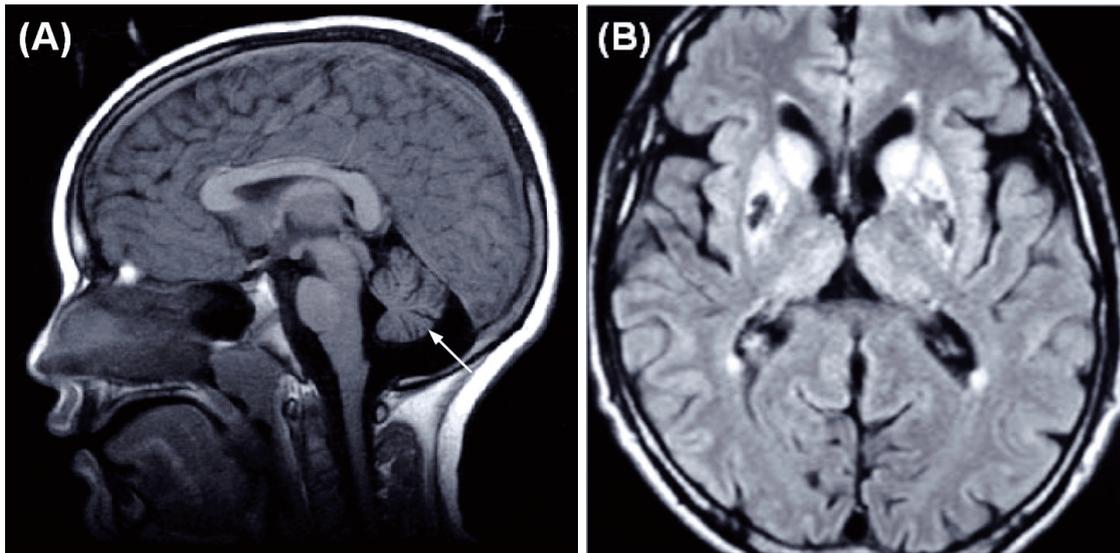


Abbildung 1.7: Kleinhirnatrophie bei PLAN und zystische Hohlrumbildung bei Neuroferritinopathie

(A) Sagittalschnitt. Bei einem Patienten mit PLA2G6-Mutation ist eine deutliche zerebelläre Atrophie (Pfeil) zu sehen [43]. (B) Axialschnitt. Bei diesem Patienten mit FTL-Mutation erscheint der Nucleus caudatus und lentiformis im T2 gewichteten MRT hyperintens. Zusätzlich sind zystische Hohlrumbildungen erkennbar [25].

1.3.2.2.3 Besonderheiten weiterer Subtypen

Bei den MPAN-Patienten fanden Hartig et al. (2011) die typische Hypointensität in Globus pallidus und Substantia nigra, bei bis auf einem Patienten aber kein ‚Tigerauge‘ (Abbildung 1.6 A) [54].

Patienten mit Neuroferritinopathie zeigen neben massiver Eisenansammlung in den gesamten Basalganglien vor allem im Krankheitsverlauf zystische Degenerationen im Globus pallidus und Putamen (Abbildung 1.7 B). Dadurch können sie anhand der Bildgebung von anderen NBIA-Patienten unterschieden werden [18, 20, 42, 86].

Bei Aceruloplasminämie findet man die Hypointensität in fast allen Basalganglien sowie eine vermehrte Eisenablagerung in den Eingeweiden, besonders in Leber und Pankreas [42, 81, 86].

Bei Patienten mit Kufor-Rakeb-Syndrom findet man bei einem Teil Hypointensität im Globus pallidus und Striatum sowie eine generalisierte Hirnatrophie [42, 121].

In der Bildgebung von Patienten, die am Woodhouse-Sakati-Syndrom leiden, zeigt sich neben der Hypointensität in den Basalganglien zusätzlich eine Atrophie des Hirnstamms sowie des Klein- und Großhirns [4, 42].

1.3.2.3 Eisenablagerungen im Gehirn bei anderen Erkrankungen

Veränderungen der Basalganglien in der Bildgebung werden auch bei normalem Alterungsprozess und anderen Pathologien gesehen [36, 55]. Eisenablagerungen in den Basalganglien werden beispielsweise bei Patienten mit sporadischem Parkinson beschrieben [38]. Auch im Verlauf einer HIV-Infektion wird Eisen aus geschädigten Zellen ausgeschüttet und führt konsequenterweise auch zu dessen Ablagerung in den Basalganglien [90]. Ebenso können sich bei der Thalassämie entsprechende Ablagerungen auf Grund der systemischen Eisenüberladung zeigen [86, 88]. Dies macht deutlich, dass eine korrekte Interpretation nur in Verbindung mit der entsprechenden Symptomatik möglich ist.

1.3.3 Diagnostisches Vorgehen

Mit der Kenntnis von *PANK2*, *PLA2G6* und *C19orf12* ist aus Erfahrung des Instituts für Humangenetik der TUM (250 NBIA-Fälle) eine molekulare Diagnosestellung inzwischen bei ungefähr 70% aller NBIA-Patienten möglich. Dabei lassen sich etwa 50% durch Mutationen in *PANK2* erklären, 5-15% fallen auf *PLA2G6* und 3-30% (je nach Kohorte in Italien 3%, USA 10%, Polen 30%) zeigen Mutationen in *C19orf12* [54, 109]. Die übrigen NBIA-Gene sind jeweils für einen sehr geringen Prozentsatz verantwortlich [43, 54]. Eine charakteristische Bildgebung kann dem Kliniker Hinweise auf die zugrunde liegende Mutation geben und zu einem gezielten Mutationsscreening leiten (Abbildung 1.8).

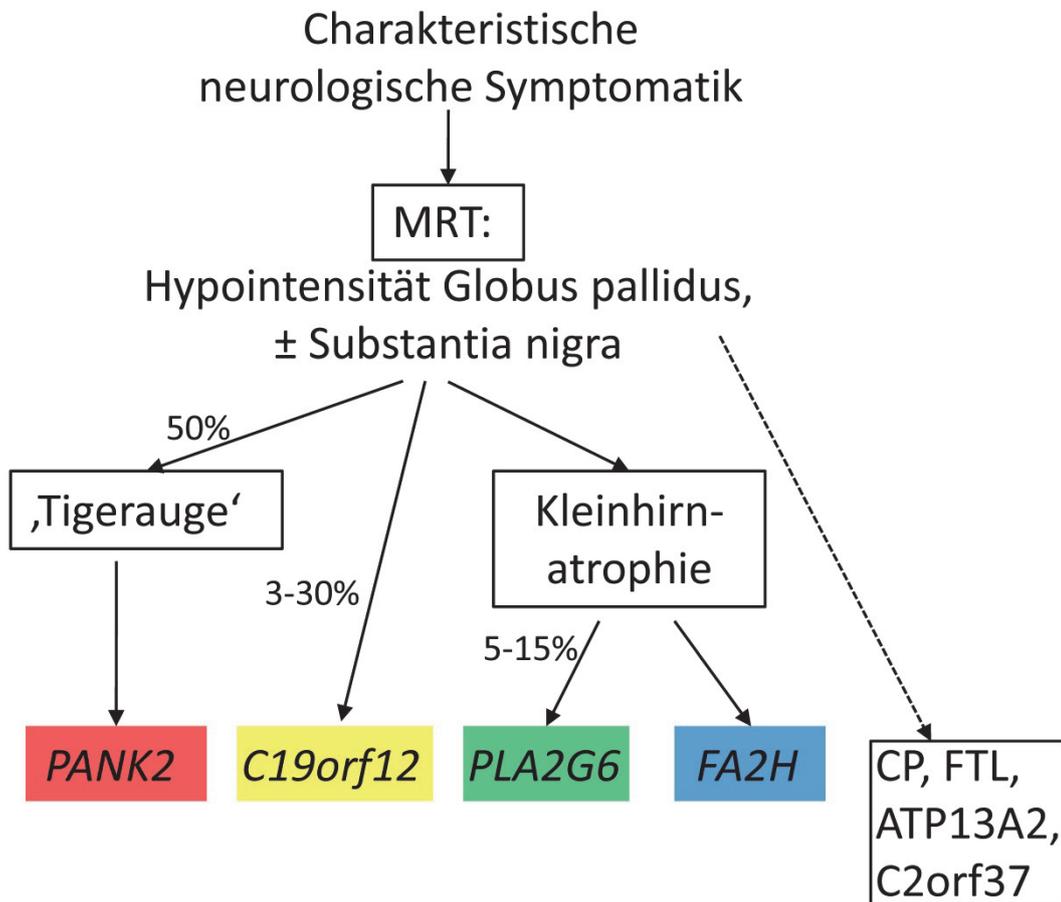


Abbildung 1.8: Diagnostisches Prozedere bei Verdacht auf NBIA

Die Abklärung einer neurodegenerativen Erkrankung bei Kindern beinhaltet neben der klinischen Vorstellung unter anderem eine MRT-Untersuchung. Zeigt sich dabei eine Hypointensität des Globus pallidus und gegebenenfalls der Substantia nigra, erfolgt die Diagnose NBIA. Je nach zusätzlichen Befunden wie dem ‚Tigerauge‘ oder einer Kleinhirnatrophie sollte zunächst ein Mutationsscreening von PANK2, bzw. PLA2G6, FA2H sowie C19orf12 erfolgen. Damit lassen sich ca. 70% an „NBIA mit Beginn vor dem Erwachsenenalter“ molekulargenetisch diagnostizieren. Bei spätem Symptombeginn und passender Bildgebung und gegebenenfalls positivem Stammbaum, sollte außerdem ein Mutationsausschluss in CP, FTL, ATP13A2 und C2orf37 erfolgen [86] (modifiziert).

1.4 Zielsetzung

NBIA ist eine seltene monogenetische Erkrankung, für die bis zum heutigen Tag keine kausale Therapie zur Verfügung steht. Bei etwa einem Drittel der Patienten ist eine molekulare Diagnostik bisher nicht erfolgreich. Die Identifizierung neuer, zurzeit noch unbekannter Gene wird zur genaueren Diagnosestellung beitragen. Gerade im Hinblick auf mögliche kausale Therapieansätze ist die Kenntnis der Proteinfunktionen unerlässlich.

Bis zum heutigen Tag ist die molekulare Pathogenese von NBIA unklar. Wie kommt es bei Mutationen in Genen des Lipidstoffwechsels zu Eisenablagerungen in den Basalganglien? Sind diese Ablagerungen ein frühzeitiges Charakteristikum oder eher ein Epiphänomen? Warum finden sich trotz ubiquitärer Genexpression nur auf das ZNS beschränkte Symptome?

Ein erster Schritt um diesen Fragen näher auf den Grund zu gehen ist die Analyse der einzelnen NBIA-Gene bzw. deren Produkte und ihre Lokalisation innerhalb der Zelle.

In der Arbeitsgruppe um Dr. Prokisch (Helmholtz Zentrum München, Humangenetik) wurde ein neues, bisher unbekanntes NBIA-Gen entdeckt – *C19orf12*. Mutationen in diesem Gen führen zu einem NBIA-typischen Phänotyp. Als Voraussetzung für funktionelle Experimente mit dem *C19orf12*-Gen war das Ziel der vorliegenden Arbeit, sich genauer mit dem Protein C19orf12 zu beschäftigen.

Zusammengefasst ergeben sich folgende Zielsetzungen und methodische Aufgaben:

1) Generierung und Testung eines polyklonalen Antikörpers gegen C19orf12

- Amplifizierung und Klonierung der cDNA von *C19orf12*
- Expression und Aufreinigung des rekombinanten Proteins
- Immunisierung durch die Firma „Pineda-Antikörperservice“
- Testung des Antikörpers

2) Nachweis der subzellulären Lokalisation von C19orf12

- Isolierung der Zellorganellen von Fibroblasten und Detektion mit dem C19orf12-Antikörper im Western Blot
- Konfokale Mikroskopie von Fibroblasten nach Transfektion mit einem C19orf12-GFP-Fusionsprotein

2 Material und Methoden

Die verwendeten Geräte und Materialien inklusive Pufferzusammensetzungen sind dem Anhang zu entnehmen.

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Fibroblastenkultur

Die adhärent wachsenden Kulturen wurden in dem entsprechenden Fibroblastenmedium bei 37 °C in einem Inkubator bei 5% CO₂ und gesättigt feuchter Atmosphäre kultiviert. Sämtliche Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Zellkulturwerkbank durchgeführt.

Zum Auftauen wurden die kryokonservierten Zellen kurzzeitig in 37 °C warmes Wasserbad, anschließend in eine Zellkulturschale gegeben und mit der nötigen Menge Medium (20 ml bei Kulturschalen mit 14 cm Durchmesser) aufgefüllt. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt um vorhandenes DMSO sowie tote Zellen zu entfernen. Im weiteren Verlauf erfolgte ein Mediumwechsel alle 48-72 h. Hierzu wurde mit einer Glaspipette zunächst das alte Medium abgesaugt und nach Waschen mit PBS neues Medium hinzugefügt.

Zum Zeitpunkt der Zellkonfluenz wurden die Kulturen auf eine größere Fläche subkultiviert, um eine Differenzierung sowie ein Absinken der Proliferationsrate zu verhindern. Nach Absaugen des Mediums erfolgten zwei Waschvorgänge mit je 10 ml PBS um Reste des Kulturmediums zu entfernen, die sonst die Trypsinwirkung beeinträchtigt hätten. Es wurden 2 ml Trypsin appliziert und die Kultur für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Der Ablösungsprozess, der durch Zerstörung der Adhäsionskomplexe der Zellen erfolgte, wurde mittels Lichtmikroskopie kontrolliert und unter Verwendung von mindestens 4 ml Medium beendet, sobald alle Fibroblasten

losgelöst waren. Die abgelösten Zellen wurden in einem Falcon-Zentrifugationsröhrchen 3:30 min mit 500 rcf zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Anschließend erfolgte ein Waschvorgang. Hierzu wurde das Zellpellet in PBS resuspendiert, erneut 3:30 min mit 500 rcf zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellet wurde in neuem Medium resuspendiert und auf die entsprechenden Kulturgefäße verteilt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen erfolgte die Teilung 1:2 bis 1:5. Gleichzeitig wurde die Passagezahl erhöht.

Zur Lagerung wurden humane Fibroblasten in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Zellen wie beim Passagieren trypsiniert und nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes in Einfriermedium resuspendiert. Dieses enthielt neben dem Standardmedium 10% DMSO um eine Kristallbildung beim Auftauen der Zellen zu verhindern.

2.1.2 Transiente Transfektion von Fibroblastenzelllinien

Die transiente Fibroblastentransfektion erfolgte mit Hilfe des Kits „Effectene Transfection Reagent“ der Firma Qiagen.

Um eine 70%-ige Konfluenz der Fibroblasten am Tag der Transfektion zu erreichen wurden ca. 2×10^5 Zellen pro 6-Well-Platte in 1600 μ l Fibroblastenmedium am Tag zuvor ausgesät. Für die Transfektion wurde 0.4 μ g GFP-gekoppeltes *C19orf12* auf eine Konzentration von etwa 0.1 μ g/ μ l mit TE1-Puffer verdünnt und auf ein Endvolumen von 100 μ l mit DNA-Kondensierungspuffer erneut verdünnt. Es wurden 3.2 μ l eines Enhancers hinzugefügt und das Gemisch 1 s gevortext. Nach 2-5 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Mischung für wenige Sekunden herunter zentrifugiert, um am Tube hängende Tropfen zu entfernen. Anschließend wurden 10 μ l Transfektionsreagenz zur DNA-Enhancer-Mischung gegeben und diese mittels 10 s Vortexen gemischt. Um die Bildung von Transfektionskomplexen zu ermöglichen, wurde eine 5-10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur durchgeführt. Währenddessen wurde bei den am Tag zuvor ausgesäten Fibroblasten das Medium gewechselt. Nach der Inkubation wurde 600 μ l Fibro-

blastenmedium in das Tube mit den Transfektionskomplexen gegeben, durch zweimaliges auf- und abpipettieren gemischt und umgehend tropfenweise in der 6-Well-Platte verteilt. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt, um eine einheitliche Verteilung der Transfektionskomplexe zu gewährleisten. Die Fibroblasten wurden unter den üblichen Wachstumsbedingungen für ca. 18 h inkubiert, um eine ausreichende Expression des GFP-C19orf12-Proteins zu erreichen.

2.1.3 *Escherichia coli* (*E. coli*) – Kultur

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte bei 37 °C in LB-Medium. Es wurde eine Übernachtskultur (37 °C, 200 rpm) aus 5 ml LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin und einigen Kolonien eines Glycerolstocks, der die entsprechend transformierten Bakterien enthielt, erstellt (Kap.2.2.4). Am folgenden Tag wurde die Bakterienkultur (1 l LB-Medium, 100 µg/ml Ampicillin, 5 ml Übernachtskultur) ca. 3 h bei 37 °C mit 200 rpm bis zu einer Absorption von OD₆₀₀ 0.6 wachsen gelassen. Da die Expression des rekombinanten Proteins unter der Kontrolle eines T7lac-Promotors stand, konnte diese durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert werden. Nach weiterem Wachstum von 2 h bei 37 °C mit 200 rpm wurde die Kultur in 100 ml Proben aufgeteilt. Diese wurden 10 min bei 4 °C mit 4000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in je 10 ml PBS resuspendiert und erneut 10 min bei 4 °C mit 4000 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und die Zellpellets bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 DNA/RNA – Isolierung

Die DNA/RNA-Isolierung erfolgte mit dem „AllPrep DNA/RNA Mini Kit“ der Firma Qiagen, wobei aus denselben Zellen sowohl DNA als auch RNA extrahiert werden konnte.

Die nötige Anzahl (maximal 1×10^7) Fibroblasten wurde gesammelt (Kap. 2.1.1). Das Zellpellet wurde durch Zugabe von 600 μ l Puffer RLT resuspendiert und die Zellen durch vortexen auseinandergelöst. Das Lysat wurde in eine QIAshredder-spin-Säule (im Kit enthalten) pipettiert und 2 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert. Das in einem Eppendorftube aufgefangene Homogenisat wurde in eine AllPrep-DNA-spin-Säule (im Kit enthalten) überführt und 30 s mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Zur Gewinnung der DNA wurde das in der AllPrepDNA-spin-Säule verbleibende Material verwendet (Kap. 2.2.1.1). Der Durchfluss wurde für die RNA-Isolierung (Kap. 2.2.1.2) verwendet.

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden am Ende durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem ND-1000 Spektrophotometer Nanodrop[®] bestimmt.

2.2.1.1 DNA-Isolierung

Zur Reinigung der genomischen DNA wurde die AllPrepDNA-spin-Säule zweimal gewaschen: zunächst wurde 500 μ l des Waschpuffers AW1 dazu gegeben und für 15 s mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dann wurden 500 μ l Puffer AW2 hinzugegeben und 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Durchfluss wurde wieder verworfen. Die lange Zentrifugation und hohe Geschwindigkeit diente zum Trocknen der Membran der Säule, so dass anschließend kein Ethanol (in Puffer AW1 und AW2 enthalten) mehr vorhanden war.

Die AllPrepDNA-spin-Säule wurde zur Elution in ein neues Eppendorftube gestellt. In die Säule wurden 100 μ l Puffer EB pipettiert und nach 1-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 1 min mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Um weitere DNA zu eluieren wurde der letzte Schritt wiederholt.

2.2.1.2 RNA-Isolierung

Wie oben beschrieben wurde zur DNA-Gewinnung nach Lyse der Zellen das Homogenisat in einer AllPrepDNA-spin-Säule zentrifugiert. Der Durchfluss konnte zur RNA-Reinigung verwendet werden. Hierfür wurden 600 µl 70%-iger Ethanol hinzu gegeben und durch mehrmaliges Pipettieren gut gemischt (keine Zentrifugation). Das Gemisch wurde in eine RNeasy-spin-Säule (im Kit enthalten) überführt und 15 s mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Zum Waschen wurden 700 µl Puffer RW1 in die Säule pipettiert und 15 s mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Der Waschvorgang wurde durch Zugabe von 500 µl Puffer RPE und erneuter Zentrifugation für 15 s mit 8000 rcf wiederholt. Der Durchfluss wurde stets nach jeder Zentrifugation verworfen. Um die Membran der Säule zu trocknen und den Alkohol zu entfernen wurden erneut 500 µl Puffer RPE in die Säule gegeben und anschließend 2 min mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert.

Zur Elution wurde die RNeasy-spin-Säule in ein neues Eppendorftube gestellt. In die Säule wurden 30 µl RNase-freies Wasser gegeben. Anschließend wurde 1 min mit mindestens 8000 rcf zentrifugiert. Um weitere RNA zu erhalten wurde der letzte Schritt wiederholt.

2.2.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der mRNA in komplementäre DNA (cDNA) erfolgte mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas.

Mit Hilfe einer reversen Transkriptase wird eine zur mRNA komplementäre einsträngige DNA in Richtung 5'→3' synthetisiert. Das Schlüsselenzym dieser Reaktion ist die RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in diesem Kit eine rekombinante M-MuLV (engl.: Moloney Murine Leukemia Virus) reverse Transkriptase. Da ihr Optimum bei 37 °C liegt, erfolgte die Erststrangsynthese der cDNA für 1 h bei dieser Temperatur. Durch Verwendung von RNase freiem Wasser sowie RNase Inhibitor wurde die Degradierung der RNA verhindert.

Zunächst wurden 1 µg RNA (Kap. 2.2.1.2) und 1 µl Oligo-dT₁₈-Primer (100 µM) zusammengebracht und mit RNase freiem Wasser zu einem Reaktionsvolumen von 11 µl aufgefüllt. Um mögliche Sekundärstrukturen zu trennen wurde das Reaktionsgemisch durchmischt, kurz zentrifugiert, 5 min bei 65 °C inkubiert und anschließend kurzzeitig auf Eis gegeben sowie herunter zentrifugiert. Dann erfolgte die Zugabe von 4 µl cDNA-Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock™ RNase Inhibitor (20 u/µl) und 2 µl dNTP (10 mM). Das Reaktionsgemisch wurde vermischt, kurz zentrifugiert, 5 min bei 37 °C inkubiert und kurz auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl M-MuLV reverse Transkriptase (20 u/µl) wurde das Reaktionsgemisch (20 µl) vermischt, kurz zentrifugiert und anschließend zur cDNA-Synthese für 60 min bei 37 °C inkubiert. Beendet wurde die Reaktion durch eine 10 minütige Inkubation bei 70 °C. Die so gewonnene cDNA wurde als Template für die PCR verwendet (Kap. 2.2.3).

2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.3.1 PCR – Amplifizierung

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) werden Abschnitte der DNA mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase in vitro vervielfältigt. Durch spezifisch bindende Primer wird der zu amplifizierende Bereich festgelegt. Die Reaktion besteht im Wesentlichen aus drei Teilschritten:

Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch auf 95 °C erhitzt. Die doppelsträngige DNA wird denaturiert und in ihre beiden Einzelstränge aufgetrennt. Durch Kühlen auf eine für jeden Primer spezifische Temperatur können diese im folgenden Schritt an den entsprechenden Stellen mit der Einzelstrang-DNA hybridisieren. Die Temperatur dieses Schrittes ist von der Länge und Sequenz der Primer abhängig und stets für jeden Primer neu zu testen. Im dritten Schritt, der Elongation, bindet die thermostabile DNA-Polymerase an den durch den DNA-Einzelstrang und Primer gebildeten Doppelstrang und beginnt mit der DNA-Synthese entlang der Matrize.

Dieser Reaktionszyklus wird ca. 30-mal durchlaufen, so dass die DNA exponentiell amplifiziert wird. Anschließend wird die amplifizierte DNA auf einem Agarosegel (Kap. 2.2.3.2) analysiert.

Verwendete Primer:

Isoform 1 – cDNA-PCR:

Vorwärts: 5' – ATGGAGAGGCTGAAGTCACACAA – 3'
Rückwärts: 5' – CTAGTCATCATACTGGATCTCGG – 3'

Isoform 1 – PCR zur Klonierung in pTrcHisTOPO®:

Vorwärts: 5' – AGGCATGGAGAGGCTGAAGTCA – 3'
Rückwärts: 5' – GGTCATCATACTGGATCTCGG – 3'

Primer innerhalb des pTrcHisTOPO®:

V-Topo® : 5' – GAGGTATATATTA ATGTATCG – 3'
R-Topo® : 5' – GATTTAATCTGTATCAGG – 3'

Reaktionsansatz (20 µl):

PCR-Puffer	2 µl
dNTP (2mM)	2 µl
MgCl ₂ (25mM)	2 µl
DNA.-Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
Primer vorwärts (10µM)	0,4 µl
Primer rückwärts (10µM)	0,4 µl
DNA	*
<u>H₂O</u>	<u>bis auf 20 µl auffüllen</u>
Total:	20 µl

* DNA: cDNA (Verwendung von 100 µg RNA zur cDNA-Synthese): 1 µl
Plasmid-DNA: 100 ng
DNA aus transformierten *E. coli* (1 Kolonie in 20 µl H₂O gelöst): 1 µl

Temperaturprogramm des PCR-Cyclers:

Prädenaturierung	95 °C	10 min	} 30 mal
Denaturierung	95 °C	45 s	
Annealing	variabel**	45 s	
Elongation	72 °C	1 min	
	72 °C	7 min	
Kühlen	10 °C	beliebig	

** : Annealing-Temperatur abhängig vom jeweiligen Primer

2.2.3.2 Gelelektrophorese

DNA-Fragmente, die mittels PCR amplifiziert wurden, wurden in horizontalen Agarosegelen nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die negativ geladenen Nukleinsäure-Moleküle wandern auf Grund der angelegten elektrischen Spannung von der Kathode zur Anode. Dabei bewegen sich kleinere Moleküle schneller und wandern weiter als größere. Durch Vergleich mit Markern bekannter Produktgrößen wurden die Produktlängen identifiziert beziehungsweise die Richtigkeit der PCR überprüft. Die Konzentration des Agarosegels (0,8-2 %) richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente. Durch Zugabe von 1%-igem Ethidiumbromid konnte die DNA anschließend unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Elektrophorese erfolgte in 1xTBE-Puffer. Pro Kammer wurde je 10 µl Probe geladen. Diese setzte sich aus 5 µl PCR-Produkt und 5 µl einer 15%-igen Ficoll-Lösung zusammen. Durchschnittlich wurde die Gelelektrophorese 40 min bei konstanten 80 V durchgeführt und das Gel anschließend unter UV-Licht analysiert.

2.2.4 Klonierung

Um ein rekombinantes Protein exprimieren zu können musste die kodierende DNA-Sequenz in einen Expressionsvektor kloniert werden. Dies erfolgte mit einem T/A-TOPO[®]-Vektor von Invitrogen. Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden entsprechend des ‚ATG‘ des Proteins mit der Kozaksequenz und ohne Stopcodon gewählt (Kap. 2.2.3).

Zur Ligation wurden zunächst 2 µl des entsprechenden PCR-Produkts, 0.5 µl H₂O und 0.5 µl des Vektors zusammen pipettiert, vorsichtig gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transformation wurde die Klonierungsreaktion (3 µl) zu chemisch kompetenten *E. coli* Zellen gegeben und das Reaktionsgemisch 30 min auf Eis inkubiert. Nach 30 sekundiger Erwärmung im Wasserbad bei 42 °C wurden die Zellen sofort wieder auf Eis gegeben. Es wurden 250 µl S.O.C.-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C im Shaker gemischt. 100 µl der

Transformation wurden auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Analyse wurden ca. 10 der gewachsenen Kolonien gepickt und in jeweils 20 µl H₂O gelöst. Je 1 µl wurde davon als Template-DNA für die Kontroll-PCRs (Kap.2.2.3) verwendet. Die PCRs erfolgten mit verschiedenen Primerkombinationen innerhalb des Vektors sowie des Inserts, um sicher zu stellen, dass die DNA-Sequenz richtig eingebaut wurde. Zum Mutationsausschluss wurde das Insert inklusive Histidin-tag sequenziert.

Die positiven in H₂O resuspendierten Klone wurden in je 3 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin angeimpft und über Nacht bei 37 °C wachsen gelassen. Anschließend wurde zur längerfristigen Aufbewahrung ein Glycerinstock erstellt. Hierfür wurden zu 500 µl der Übernachtskultur 1.5 ml Glycerol (60%) hinzugefügt. Die Stocks wurden bei -80 °C eingefroren.

2.2.5 Proteinisolierung und –reinigung

Die Reinigung des in *E. coli* klonierten C19orf12-Proteins erfolgte weitgehend nach Angaben des „Wolfson Centre for Applied Structural Biology“ und „The QIAexpressionist™“, Qiagen, unter nativen Bedingungen. Verwendet wurden Zellpellets einer induzierten *E. coli*-Kultur (Kap.2.1.3). Falls nicht gesondert erwähnt, wurden alle Zentrifugationen bei 4 °C 3 min bei 3500 rpm (Zentrifuge Mikro20) durchgeführt.

Ni-NTA-Agarose-Äquilibration

Es wurden 200 µl Ni-NTA-Agarosebeads-Suspension äquilibriert, indem 1.5 ml H₂O dazu gegeben, gevortext und zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen. Dieser Schritt wurde erneut mit 1.5 ml H₂O wiederholt und anschließend noch zweimal mit jeweils 1.5 ml Lyse-Puffer-1.

Proteinextraktion

Das Zellpellet, welches aus 100 ml IPTG-induzierter Bakterienkultur gewonnen wurde (Kap. 2.1.3), wurde in 1 ml Lysepuffer-1 resuspendiert. Die Zellmembranen wurden mittels Ultraschallprozessor zerbrochen. Die Beschallung erfolgte 5x10 s bei einer Amplitude von 20%. Die Probe wurde stets im Eisbad gekühlt. Im Anschluss erfolgte eine 10 minütige Zentrifugierung bei 4 °C mit 13000 rpm. Zur Analyse wurden 40 µl des Überstandes verwendet, der Rest zur Proteinreinigung. Das Zellpellet wurde verworfen.

Proteinreinigung

Der Überstand der Proteinextraktion wurde zu den zuvor äquilibrierten Ni-NTA-Agarosebeads gegeben und 60 min bei 4 °C mit 25 rpm in einem Rotator inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert und der Überstand, bis auf 40 µl zur Analyse, verworfen. Um unspezifische Proteinbindungen an die Ni-NTA-Agarosebeads zu verringern wurde das Pellet aus Ni-NTA-Agarosebeads und rekombinantem Protein zweimal gewaschen. Es wurden jeweils 1.5 ml Waschpuffer hinzu gegeben, die Lösung gevortext und zentrifugiert. Der Überstand wurde stets bis auf 40 µl zur Analyse verworfen.

Elution

Um das rekombinante Protein zu eluieren wurden 100 µl Elutionspuffer zum Pellet gegeben. Das Pellet wurde durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren aufgelöst und nach 4-minütiger Inkubation bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne die Ni-NTA-Agarosebeads zu berühren, abpipettiert. Der Elutionsvorgang wurde insgesamt dreimal mit je 100 µl Elutionspuffer durchgeführt und der Überstand stets in neuen Eppendorftubes gesammelt. Die Elutionsfraktionen wurden zur Analyse und dann zur Antikörperproduktion verwendet.

2.2.6 Antikörperproduktion

Nach Konzentrationsbestimmung der Elutionen 1 und 2 (Kap. 2.2.5) wurden diese zur Firma „Pineda Antikörperservice“ zur Antikörperproduktion gesendet. Es wurden zwei Kaninchen ausgewählt, deren Präimmunsereen keine Antikörper im Größenbereich unseres Antigens enthielten. Den Tieren wurde das Antigen 1 bzw. 2 nach unten stehendem Schema (Abbildung 2.1) injiziert. Zur Testung der Qualität der Antikörper erfolgten nach definierten Zeitintervallen Blutentnahmen, das erste Mal 61 Tage nach der ersten Antigeninjektion. Bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte bereits ein dreimaliger Boost. Alle weiteren Boosts erfolgten vierzehntägig, die Blutentnahmen alle 30 Tage. Die Serumproben wurden zur Antikörpertestung, Antikörperreinigung und anschließend für weitere Versuche verwendet.

Basisprotokoll (2 Immunisierungsmonate)

Kaninchen 1, bzw. 2

1. Tag	Primärimmunisierung, i.d.,FCA
20. Tag	1. Boost, s.c., FIA
30. Tag	2. Boost, s.c., FIA
40. Tag	3. Boost, s.c., FIA
61. Tag	1. Blutentnahme
	4. Boost

Abkürzungen:

i.d. - intradermal

s.c. - subcutan

FCA - Freund's complete adjuvant

FIA - Freund's incomplete adjuvant

3. Immunisierungsmonat

75. Tag	5. Boost
90. Tag	2. Blutentnahme
	6. Boost

jeder weitere Immunisierungsmonat

alle 14 Tage	Boost, s.c., FIA
alle 30 Tage	Blutentnahme

Abbildung 2.1: Antikörperproduktion: Immunisierungsprotokoll [112].

2.2.7 SDS – Page

Präparation der Proben

Abhängig davon, ob ein vorhandenes Pellet oder eine Lösung für eine SDS-Page (engl.: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) verwendet wurde, erfolgte die Probenzubereitung auf unterschiedliche Weise. Pellets wurden in 1x Lämmli-puffer bis zur gewünschten Konzentration aufgelöst. Bei Proteinen in Lösung wurde zunächst die Proteinkonzentration mittels Bradfordmessung bestimmt: zu 1 ml einer 1:5-Verdünnung des Farbstoff-Konzentrates wurde 1 µl der zu messenden Probe gegeben. Die Absorption wurde bei 595 nm gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch eine Eichkurve mit Proben bekannter Konzentration (BSA). Die gewünschte Menge wurde anschließend in ein Eppendorftube pipettiert, 4x Lämmli-puffer dazu gegeben und mit H₂O auf das entsprechende Volumen aufgefüllt. Das für die Elektrophorese benötigte Volumen war abhängig von den verwendeten Polyacrylamidgelen. Durch Zugabe von SDS sowie Erhitzen wurden sämtliche Proteine mit negativer Ladung quasi unabhängig von der ursprünglichen Proteinladung versehen und denaturiert. Die Proben wurden dazu entweder 3 min auf 95 °C oder 10 min auf 50 °C erhitzt. Um die im Protein vorhandene Cysteinbrücke – soweit möglich – zu lösen und die Proteine in lineare Polypeptidketten umzuwandeln wurde anschließend als Reduktionsmittel 100 mM DTT oder TCEP direkt in die Proben gegeben.

Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel

Das Polyacrylamidgel wurde in die Kammer eingebaut und diese mit dem Laufpuffer aufgefüllt. Bei Gelen mit 16 Taschen wurden 10 µl pro Tasche pipettiert. Als Standard wurden 5 µl eines Markers verwendet. Nach Schließen der Kammer lief die Gelelektrophorese bei konstanten 125 V ca. 90 min. Anschließend wurde das Gel aus Kammer und der Gelkassette herausgelöst und mit einer Coomassie-Färbung gefärbt (siehe unten) oder in einem Western-Blot (Kap. 2.2.8) detektiert.

Färbung mit Coomassie-Brillant-Blau R-250

Das Gel der SDS-Page wurde für ca. 4 h bei Raumtemperatur mit einer Coomassie-Färbelösung unter Schwenken gefärbt. Zum Entfärben wurde das Gel so lange in die Entfärbelösung (Lösung während dessen mehrfach ausgewechselt) gegeben bis der Hintergrund klar wurde und nur noch die Proteinbanden zu sehen waren.

2.2.8 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen durch deren Kopplung an markierte Antikörper. Durch eine Gelelektrophorese wurden die zu detektierenden Proteine zunächst größenabhängig aufgetrennt, anschließend durch Blotting auf eine Membran übertragen und dann mittels Antikörpern detektiert.

Nach der SDS-Page (Kap. 2.2.7) wurde das Gel und die Blottingpapiere 30 min in den Transfer-Puffer gegeben, die PVDF-Membran nach Aktivierung durch Methanol ebenfalls. Anschließend erfolgte der Blottingvorgang. Es wurde eine Art Sandwich aus 3 Blottingpapieren, der PVDF-Membran, dem Gel und wiederum 3 Blottingpapieren gebildet. Diese wurden übereinander geschichtet und so in die Blottingapparatur gelegt, dass die Proteine beim Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf die PVDF-Membran in Richtung Anode transferiert wurden. Auf Grund der Membrangröße von 7x8 cm und da meist zwei Gele gleichzeitig geblottet wurden erfolgte der Vorgang bei 112 mA (7x8x2) für 70 min. Anschließend wurde die PVDF-Membran zur Sichtbarmachung der Proteine ca. 10 min mit einer Ponceau S-Färbelösung gefärbt. Nach Kopieren der Membran erfolgte die Entfärbung mittels Methanol.

Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern wurden die freien Bindungsstellen auf der Membran blockiert. Dazu wurde die Membran für mindestens 1 h in 5 % Milch auf dem Kipptisch inkubiert.

Der primäre Antikörper, durch den das bestimmte Protein nachgewiesen werden sollte wurde in untenstehender Konzentration (in 5 % Milch) für 1 h auf die Membran gegeben. Nach dreimaligem Waschen der Membran in T-TBS für je 5 min erfolgte die einstündige Inkubation mit dem spezie-spezifischen Antikörper (in 5% Milch), der mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt war. Vor der Detektion des Antigen-Antikörperkomplexes erfolgten nochmals 3 Waschvorgänge von je 5 min in T-TBS.

Die Antikörperkonzentrationen bei Anti-C19orf12-Antikörper variierten zwischen einer Verdünnung von zunächst 1:200 bis 1:1000, Anti-Kaninchen-Antikörper wurden in einer Konzentration von 1:5000, Anti-70kDa-CII-Antikörper 1:2500 und Anti-Maus-Antikörper in einer Verdünnung von 1:1000, je in 5 % Milch verwendet.

Die PVDF-Membran wurde anschließend zum Nachweis des Proteins über Chemolumineszenz kurz mit ECL-Reagenzlösung inkubiert. Das in der ECL-Reaktionslösung enthaltene Luminol wurde durch die am sekundären Antikörper

befindliche Peroxidase oxidiert. Das an der Stelle der Antikörperbindung entstandene Produkt lumineszierte und wurde durch Belichtung eines ECL-Films nachgewiesen.

Der Western Blot bei Verwendung von Nitrozellulose statt einer PVDF-Membran erfolgte weitgehend identisch. Lediglich die Aktivierung mittels Methanol entfiel und das Entfärben der Ponceau S-Färbung erfolgte mit H₂O.

2.2.9 Isolierung von Zellkern, Mitochondrien, ER und Zytosol aus Fibroblasten

Zur Präparation von Proteinen des Zellkerns, der Mitochondrien, des ERs sowie des Zytosols mittels differentieller Zentrifugierung wurden die Fibroblasten zunächst gesammelt (Kap. 2.1.1) und in 1.5 ml Puffer-1 aufgelöst. Die Zellen wurden mittels Teflon-Glas-Homogenisator durch 25 Hübe homogenisiert. Um die Zellkerne zu pelletieren wurde das Homogenisat 10 min bei 4 °C mit 600 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde für 25 min bei 4 °C mit 10000 rcf zentrifugiert. In diesem Pellet waren die mitochondrialen Proteine enthalten. Um Proteine des ER und Zytosols zu erhalten, wurde der Überstand für 1 h bei 4 °C mit 100000 rcf (Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Proteine des ERs befanden sich im Pellet, die des Zytosols im Überstand.

2.2.10 Isolierung von Mitochondrien mittels Anti-TOM22-Antikörper

Die Isolierung der Mitochondrien mittels Anti-TOM22-Antikörper erfolgte mit dem „Mitochondrial Isolation Kit Human“ der Firma Miltenyi Biotec GmbH.

Herstellung des Zellysates

PBS und Lysepuffer-2 wurden bis auf 4 °C gekühlt und alle Vorgänge soweit möglich auf Eis durchgeführt. Nach dem Sammeln der Zellen wurde die Zellsuspension 10 min bei 4 °C mit 300 rcf zentrifugiert, der Überstand abpipettiert. Das Zellpellet wurde in ca. 10 ml/10⁷ Zellen PBS resuspendiert. Der Zentrifugierungsschritt wurde wiederholt. Das Zellpellet wurde nun in 1 ml Lysepuffer-2/10⁷ Zellen gelöst. Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mit einer Spritze mit einer 26 G Nadel.

Markierung mittels Anti-TOM22 Mikrobeads

1 ml Zellysat (entspricht 10⁷ Zellen) und 9 ml Trennungspuffer wurden in ein 15 ml Falcontube gegeben und gut vermischt. Es wurden 50 µl Anti-TOM22 Mikrobeads hinzugefügt, um die Mitochondrien zu magnetisieren. Die Substanzen wurden gut durchgemischt und 1 h im Kühlschrank unter geringem Schütteln inkubiert.

Trennung der Mitochondrien auf Grund der Magnetwirkung

Während der beschriebenen Inkubation wurde eine Säule in das magnetische Feld eines MACS-Separators (im Kit enthalten) gestellt und mit 3 ml des Trennungspuffers gespült. Nach der Inkubation der Mitochondrien mit den Mikrobeads wurden diese schrittweise (3x3.3 ml) auf die vorbereitete Säule pipettiert und jeweils gewartet bis das Lysat durchgelaufen war. Anschließend wurde die Säule 3x mit je 3 ml des Trennungspuffers gewaschen und danach in ein Auffangtube (z.B. 15 ml Falcontube) gestellt. Zur Gewinnung der mit TOM22 markierten Mitochondrien wurde 1.5 ml Trennungspuffer in die Säule pipettiert. Direkt im Anschluss wurde ein kleiner Kolben fest in die Säule gedrückt um die Mitochondrien auszuspülen. Vor der Messung des Gehalts an Mitochondrien, wurden diese 2 min bei 4 °C mit 13000 rcf zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in 300 µl Aufbewahrungspuffer aufgelöst. Die Zentrifugation wurde mit den gleichen Parametern wiederholt, das Pellet anschließend jedoch in 100 µl Aufbewahrungspuffer gelöst.

2.2.11 Immunzytochemie

Transient transfizierte Fibroblastenzellen (Kap. 2.1.2) wurden auf den Objektträgern mit PBS gewaschen, bevor sie mittels 4%-Formaldehyd 10 min in PBS fixiert wurden. Es erfolgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS. Permeabilisiert wurden die Zellen während einer 10-minütigen Inkubation in einer Lösung aus PBS mit 0.1% NP-40. Die bisherigen Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der Vorgang der Permeabilisierung wurde durch eine Lösung aus PBS mit 2 % BSA und 0.1 % NP-40 bei 37 °C beendet. Anschließend wurde für 45 min bei 37 °C ein Anti-mtSSBP-Antikörper (Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein, 1:100) in die vorherige Blocking-Lösung hinzugegeben. Es wurde ein weiterer Waschvorgang in PBS mit 0.1 % NP-40 während eines 30 minütigen Zeitraumes durchgeführt. Während weiterer 30 min wurden die Objektträger mit einem zweiten Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 568-Antikörper (1:500) in PBS mit 2 % BSA und 0.1 % NP-40 bei 37 °C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit PBS wurden die Deckgläser auf die Objektträger gebracht, wobei eine Färbelösung mit DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) zur Färbung des Zellkerns verwendet wurde.

2.3 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica mit einem 63x Immersionsobjektiv durchgeführt. Auf Grund der Färbung mit GFP, Alexa Fluor 568 und DAPI wurden Argonlaser der Wellenlänge 488 nm und 568 nm sowie UV-Licht verwendet.

3 Ergebnisse

Die Grundlage zur Durchführung der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente war die Assoziation von Mutationen in *C19orf12* mit NBIA, einem Gen bzw. Genprodukt mit bisher unbekannter Funktion und unklarer subzellulärer Lokalisation. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der subzellulären Lokalisation von *C19orf12*, um einen ersten Anhaltspunkt zur Funktion des Proteins zu erhalten. Es gibt mehrere experimentelle Ansätze, die subzelluläre Lokalisation von Proteinen zu bestimmen.

Der Nachweis des Proteins mithilfe eines spezifischen Antikörpers ist eine der gängigen Möglichkeiten. Nachdem zum Zeitpunkt der Arbeit kein Antikörper gegen das *C19orf12*-Protein käuflich zu erwerben war, bestand der größte Teil der Arbeit in der Generierung eines Antikörpers gegen das *C19orf12*-Protein. Dazu sollte die cDNA für *C19orf12* zunächst amplifiziert und in ein Plasmid zur Expression in *E. coli* kloniert werden, um das rekombinante Protein zur Immunisierung von Kaninchen anschließend aus den Bakterien isolieren zu können. Mögliche polyklonale Anti-*C19orf12*-anti-Kaninchen-Antikörper sollten dann verifiziert und zur Bestimmung der Lokalisation von *C19orf12* in verschiedenen subzellulären Fraktionen verwendet werden.

Eine zusätzliche Möglichkeit die subzelluläre Lokalisation von *C19orf12* zu bestimmen stellt die konfokale Mikroskopie dar, mit deren Hilfe überexprimiertes *C19orf12*-GFP-Fusionsprotein (GFP: grün fluoreszierendes Protein) in Fibroblasten betrachtet werden sollte.

3.1 C19orf12 – Isoformen und Gensequenz

Bisher wurden zwei Isoformen des Gens *C19orf12* mit identischem Leseraster nachgewiesen und in RefSeq annotiert [30, 116]. Die Isoform 2 ist in der Evolution hoch konserviert, was sich in einer Übereinstimmung von 115 von 141 Aminosäuren zwischen Maus und Mensch widerspiegelt (Abbildung 3.1) [54].

chimpanzee isoform 1	MERLKSHKPA	T	MTIMVEDIMKLLCSLSGERKMKAAV	KHSGKGLV	TGAVAFV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	
chimpanzee isoform 2	-----	T	MTIMVEDIMKLLCSLSGERKMKAAV	KHSGKGLV	TGAVAFV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	
human isoform 1	MERLKSHKPA	T	MTIMVEDIMKLLCSLSGERKMKAAV	KHSGKGLV	TGAMA	FV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD
human isoform 2	-----	T	MTIMVEDIMKLLCSLSGERKMKAAV	KHSGKGLV	TGAMA	FV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD
mouse	-----	T	MPIMVDDIMRLLCSISGERKMKAAV	KHSGKGLV	TGAMA	FV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD
chicken	MKGIKGPLFA	K	MPVVDVDMQQLLCHVDSQEKMTAAVKHSRGRALLAGATAV	G	ELVGGPPGLAV	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	
frog	-----	T	MPVQVDDI	KLLCHVSDHQRKMTA	KHSGKGLV	RAAGLAF	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD
zebrafish	-----	T	MPPHVDDVMKLCCELSANQVKTAV	KSGKGLV	RAAGLAF	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	
drosophilal	-----	T	MPIDTRELMEAI	IVADERNVRVAVKQSGKGLV	RAAGLAF	G	ELVGGPPGLAV	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	
drosophila2	-----	T	MDSATSEI	INALAL	LADDKNIQLTI	KRAGKGLV	RAAGLAF	G	GAV	G	GLLGAMMTSQQFKVPVQIILM-ELPPAEQQRLEFNEAAAIIRHLEWTDVAVQLTALVMGSEALQQQLLAMLVNYVT	K	ELRAEIQYDD	

Abbildung 3.1: Konservierung von *C19orf12* während der Evolution

Mehrere orthologe Gensequenzen wurden mit CLUSTALW2 abgeglichen. Es sind identische Aminosäuren (rot), sehr ähnliche (grün) und ähnliche (blau) markiert. Die vorher gesagte Transmembrandomäne ist gelb markiert [54].

Die beiden Isoformen unterscheiden sich in ihrer mRNA-Sequenz durch verschiedene Promotoren und alternativer erster Exons, bestehen aber beide aus drei Exons. Das Protein der längeren Isoform 1 wird ebenfalls durch drei Exons kodiert, das erste Exon kodiert nur acht Aminosäuren. Das Protein der Isoform 2 wird nur durch zwei Exons kodiert, da sich im ersten Exon der mRNA kein Startcodon befindet. Die Proteinsequenz der Isoform 2 ist somit lediglich elf Aminosäuren kürzer als Isoform 1, ansonsten jedoch identisch. Die Proteine bestehen dementsprechend aus 152 (16.29 kDa) bzw. 141 (15.1 kDa) Aminosäuren (Abbildung 3.2) [30].

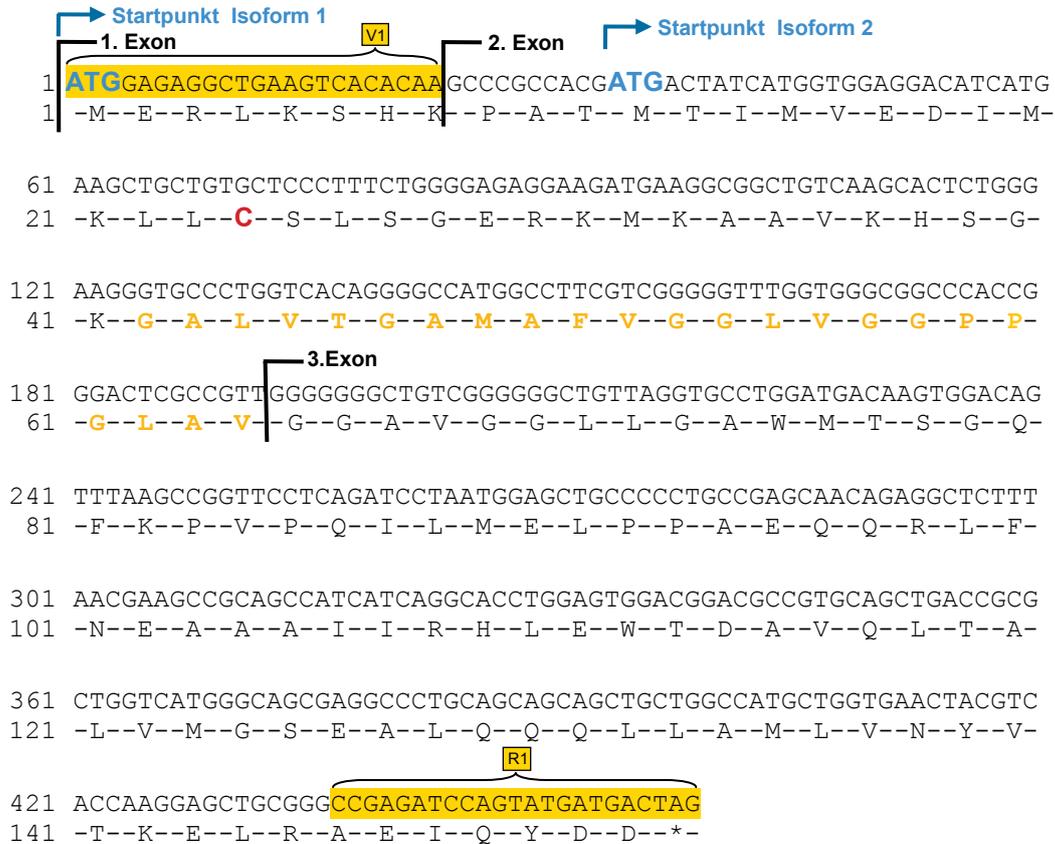


Abbildung 3.2: cDNA- und Aminosäuresequenz der Isoformen 1 und 2

Die Nummerierung und Angabe der Exons 1-3 bezieht sich auf die Isoform 1. Die Startpunkte beider Isoformen sind blau markiert. Die Aminosäuresequenz der vorhergesagten Transmembran-domäne (orange) und die Aminosäure Cystein (rot) sind gekennzeichnet. Zur Amplifizierung der Isoform 1 wurden die gelb hinterlegten Nukleotidsequenzen als Vorwärtsprimer (V1) und Rückwärtsprimer (R1) verwendet [30] (modifiziert).

3.2 C19orf12 – Klonierung, Expression und Proteinisolierung

3.2.1 pTrc-His-TOPO[®]-Vektor Expressionssystem

Um rekombinantes C19orf12 als Antigen zur Produktion eines Antikörpers gewinnen zu können, musste für die Expression der cDNA in *E. coli* ein geeignetes Plasmid gefunden werden. Hierfür wurde aus folgenden Gründen der pTrc-His-TOPO[®]-Vektor von Invitrogen gewählt [64].

Ein Vorteil des Vektors ist der relativ einfache Klonierungsvorgang. Dafür verantwortlich ist vor allem eine Topoisomerase, die an den so genannten T/A-Klonierungsvektor gebunden ist (daher der Name „TOPO“ im Name des Vektors). Die Topoisomerase schnitt die Vektor-DNA im Vorfeld an zwei benachbarten Stellen so, dass beidseits ein Überhang der Base Thymin (T) entstand und damit eine Selbstligation verhindert wurde [98]. In dieser Form, sozusagen mit aktivierten Insertionsenden, wurde der Vektor gekauft. Bei Verwendung einer cDNA mit Adenin (A)-Überhang an beiden Enden für die Klonierung, kann dann das Adenin bei der Ligation mit der komplementären Base Thymin (T) des Vektors direkt hybridisieren. Da die Schnittstellen bereits im Vorfeld generiert wurden, konnten hierbei auftretende Probleme umgangen werden und es wurden weder Restriktionsenzyme noch Ligasen (auf Grund der vorhandenen Topoisomerase) zusätzlich benötigt. Deshalb dauerte der Vorgang der Ligation nur fünf Minuten und war außerdem hoch effizient [64].

Des Weiteren enthält der Vektor einen Genabschnitt, der eine Ampicillinresistenz kodiert. Mithilfe dieses Selektionsmarkers können die transformierten Klone im Gegensatz zu nicht transformierten nach der Klonierung auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte wachsen und so ausgewählt werden.

Für die anschließende Expression des klonierten Produkts in *E. coli* sind weitere Gensequenzen des Vektors entscheidend. Einerseits sollte möglichst viel Protein produziert werden, andererseits könnte das rekombinante Protein auch schädlich für *E. coli* sein und zu einem Wachstumsnachteil der Zellen mit langer Kultivierungszeit führen. Deshalb wurde ein induzierbares System gewählt: die Zellen wuchsen zunächst bis zur optimalen Wachstumsrate ohne dass rekombinantes Protein gebildet wurde. Erreicht wurde dies durch eine Hemmung der Transkrip-

tion des Promotors P_{Trc} (daher „pTrc“ im Name des Vektors), der für die Produktion des rekombinanten Proteins wichtig ist. Die Hemmung erfolgte durch den sogenannten lac-Repressor, der im Vektor durch die Gensequenz *lacI^q* kodiert wird. Durch die Bindung des lac-Repressors an die *lac*-Operatorstelle des Plasmids soll die Transkription des Promotors P_{Trc} und damit die Produktion des rekombinanten Proteins unter normalen Wachstumsbedingungen weitgehend verhindert werden [134]. In der Phase des exponentiellen Wachstums, in der viele *E. coli* vorliegen und diese ein schnelles Wachstum und damit eine hohe Proteinproduktion aufweisen, sollte die Transkription des Promotors P_{Trc} freigegeben werden. Dies erfolgte durch Zugabe von Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG), das an den lac-Repressor binden und dazu führen sollte, dass dieser von der *lac*-Operatorstelle dissoziierte. Dies sollte dann über die Transkription des Promotors P_{Trc} eine deutliche Proteinproduktion des rekombinanten Proteins C19orf12, das durch das klonierte Gen kodiert wurde, ermöglichen [113].

Außerdem musste der Vektor eine Struktur enthalten, mit deren Hilfe das rekombinante Protein aus *E. coli* isoliert werden konnte. Dazu verfügt der pTrc-His-TOPO[®]-Vektor über einen N-terminalen 6x Histidin-Affinitätsmarker (His₆-Tag). Diese Sequenz kodiert sechs Histidine, die in *E. coli* an das rekombinante C19orf12-Protein gekoppelt exprimiert werden sollten. Auf Grund der strukturellen Eigenschaften dieses His₆-Tags sollte dann das His₆:C19orf12-Protein mit Hilfe von Nickelbeads aus *E. coli* isoliert werden (daher der Begriff „His“ im Name des Vektors).

Der pTrcHis-TOPO[®]-Vektor sowie eine genaue Beschreibung der einzelnen Bestandteile ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

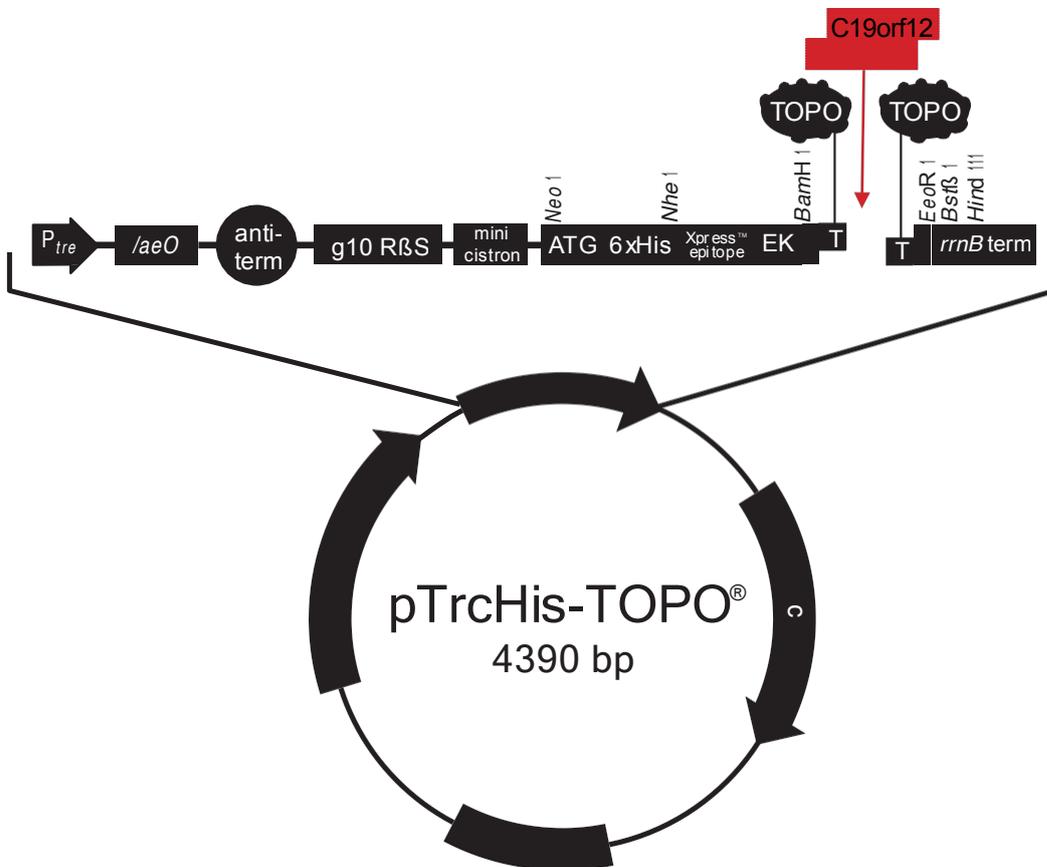


Abbildung 3.3: Aufbau des pTrcHis-TOPO[®] Vektors

Wichtige Bestandteile des Vektors sind: P_{Trc} – Promotor zur gesteigerten Expression des rekombinanten Proteins in *E. coli*; $lacO$ – Bindungsstelle des lac -Repressors zur regulierten Expression des P_{Trc} ; $rrnB$ anti-term und $rrnB$ term – Verringerung des Levels an vorzeitigem Transkriptionsstop, bzw. Region mit starker Wirkung zur Terminierung der Transkription; T7 gene 10 – Optimierung der Initiation der Translation; RBS, minicistron – Offenes Leseraster und Ribosomenbindungsstelle zur Translation des klonierten Produkts in Prokaryonten; ATG – Startpunkt der Translation; 6xHis – 6x Histidintag; Xpress[™] epitope – Detektionsmöglichkeit mit Hilfe des Anti-Xpress[™]-Antikörpers; EK – Enterokinasebindungsstelle für Rinder-Enterokinase zur Entfernung des N-terminalen Peptids vom rekombinanten Protein; TOPO[®]-Klonierungsstelle – Insertion des PCR-Produkts; Ampicillin – Resistenzgen zum Wachstum transformierter *E. coli* auf selektiven Nährböden; pBR322 ori – nötige Gensequenzen zur Replikation und Wachstum in *E. coli*; $lacI^q$ gene – Gensequenz zur Kodierung des lac -Repressors zur Regulation des P_{Trc} -Promotors [64] (modifiziert).

3.2.2 *C19orf12* – Klonierung und *E. coli*-Transformation

Es wurde entschieden einen Antikörper gegen das ganze Protein generieren zu lassen. Dies könnte später zur Lokalisierung einzelner Domänen des Proteins hilfreich sein.

Dafür wurde die Gensequenz der längeren Isoform 1 verwendet. Dies beruhte auf einem Mutationsbefund der von Hartig et al. (2011) untersuchten polnischen Kohorte. Ein Patient mit der homozygoten Missensmutation p.Thr11Met, die noch vor dem Startcodon der Isoform 2 lokalisiert war, zeigte typische NBIA-Krankheitssymptome. Damit scheinen die ersten elf Aminosäuren eine bedeutende Rolle für die Funktion des Proteins zu haben [54].

Die RNA wurde aus Kontrollfibroblasten isoliert, in cDNA umgeschrieben und die Isoform 1 mit den spezifischen Primern (V1, R1) amplifiziert. Um die gesamte cDNA zu amplifizieren und im Leseraster klonieren zu können wurden die Primer direkt am Beginn und Ende der cDNA-Sequenz inklusive des Start- und Stopcodons gewählt. Die Base Adenin (A) als 5'-Nukleotid des Vorwärtsprimers erleichterte zusätzlich die Produktion eines Adeninüberhangs am komplementären Strang durch die verwendete Taq-Polymerase, was für die im Folgenden durchgeführte Klonierungsreaktion von Vorteil war [98]. Der Rückwärtsprimer wurde inklusive des Stopcodons gewählt, um bei der Proteinexpression keine zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus zu erhalten. Die PCR-Produkte wurden in der Gelelektrophorese aufgetrennt, um die Größe des Produkts überprüfen zu können (Abbildung 3.4). Durch Sequenzierung nach Sanger wurde überprüft, ob das richtige Fragment amplifiziert wurde und die korrekte Basenabfolge vorlag. Es ergaben sich keine Unterschiede im Vergleich zur Referenzsequenz (NM_001031726.3). Das Experiment konnte gleichzeitig das Vorhandensein der *C19orf12*-mRNA der Isoform 1 in Fibroblasten zeigen.

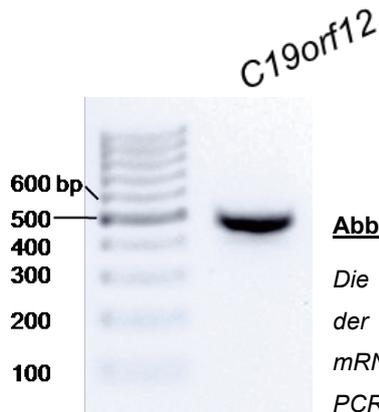


Abbildung 3.4: Gelelektrophorese der PCR der Isoform 1

Die Primer zur cDNA-Synthese der Isoform 1 wurden am Anfang und Ende der Gensequenz inklusive des Start- und Stopcodons gewählt. Template mRNA wurde aus Kontrollfibroblasten isoliert. Die Annealingtemperatur der PCR betrug 58 °C, die Produktlänge 459 bp.

PCR-Produkte mit einem 3'-Überhang der Base Adenin konnten direkt mit Hilfe der Topoisomerase mit dem Thymidinüberhang des Vektors hybridisieren. Der Adeninüberhang der PCR-Produkte wurde durch die Verwendung einer *Taq*-DNA-Polymerase produziert und durch die gewählten Primer wie oben beschrieben erleichtert.

Da sich *E. coli* TOP10 zur Aufnahme von Plasmiden und zur Expression von rekombinanten Proteinen gut eignet, wurden nach Ligation chemisch kompetente *E. coli*-TOP10 mit dem *C19orf12*-Expressionsvektor transformiert. Nach Aufnahme des Plasmids wurden die Bakterien auf eine ampicillinhaltige Agarplatte ausplattiert. Die mit TOPO[®] transformierten *E. coli* Klone konnten auf Grund ihrer Antibiotikaresistenz selektioniert werden. Es wurden 15 Kolonien zur Überprüfung der gewünschten Plasmidsequenz untersucht. Um die Plasmide zu identifizieren, in denen die *C19orf12* cDNA vollständig und in 5'→3' Leserichtung integriert wurde, wurden vier unterschiedliche PCRs durchgeführt (Abbildung 3.5 A-C). In den ersten beiden PCRs mit den Primern V1 und R1, bzw. V-TOPO[®] und R-TOPO[®] mit Lage innerhalb der Vektorsequenz wurde überprüft, dass die Ligation erfolgreich war und eine cDNA der erwarteten Größe kloniert wurde. In der Gelelektrophorese dieser PCRs fanden sich PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 480 bp, bzw. ca. 680 bp. Allerdings konnte anhand dieser zwei PCRs nur festgestellt werden, dass eine cDNA mit passender Länge in den Vektor integriert wurde. Ob die Insertion in

5'→3' Leserichtung erfolgte, lies sich durch zwei weitere PCRs feststellen. Dazu wurden die Primer V1 und R-TOPO[®], bzw. V-TOPO[®] und R1 kombiniert. Bei Insertion der *C19orf12* cDNA in 5'→3' Leserichtung erhielt man in der Gelelektrophorese dieser PCRs eine Bande bei ca. 530 bp bzw. ca. 610 bp (Abbildung 3.5 D). Bei Klonen mit 3'→5' Insert sollte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden können. Ein Drittel der überprüften Klone wiesen PCR-Produkte auf, die für eine 5'→3' Insertion von *C19orf12* sprach. Diese Klone wurden sequenziert, um PCR-Fehler zu identifizieren. Auf Grund der vollständigen Übereinstimmung der Sequenz erfolgten die weiteren Experimente mit der Kolonie des Plasmids von *E. coli* #7.

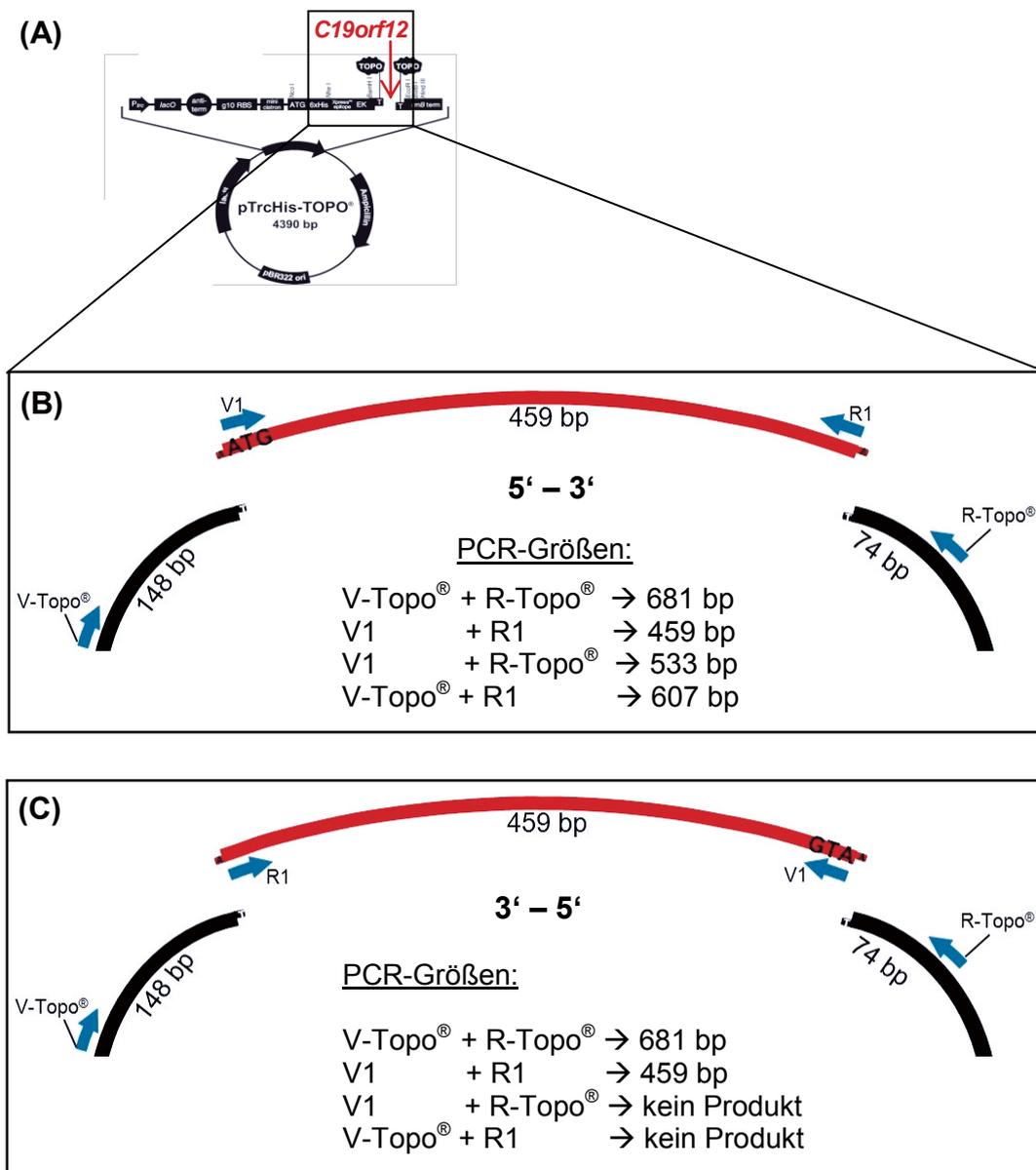




Abbildung 3.5: Insertionsmöglichkeiten der *C19orf12* cDNA in den TOPO®-Vektor und Analyse der Orientierung der Integration

(A): Übersicht. (B) und (C): Ausschnitt des Vektors mit *C19orf12*-Insertion in 5'-3'-Richtung (B) und 3'-5'-Richtung (C). Es wurden die Primer *V-Topo*® und *R-Topo*® mit Nukleotidsequenzen des TOPO®-Vektors sowie die Primer *V1* und *R1* innerhalb des *C19orf12*-Gens für die PCR verwendet. Die erwarteten Produktgrößen sind unter der jeweiligen Abbildung angegeben. Abbildung (D) zeigt die PCR-Produkte bei 5'-3' *C19orf12*-Insert nach PCR mit den vier Primerkombinationen.

3.2.3 Rekombinantes His₆:C19orf12 – Proteinexpression

Nach der Klonierung und Transformation von *C19orf12* in *E. coli* sollte das rekombinante C19orf12-Protein (His₆:C19orf12) durch die Bakterien produziert werden. Für die His₆:C19orf12-Produktion und Analyse des Wachstumsverhaltens der transformierten *E. coli* wurde eine Bakterienkultur von *E. coli* #7 angelegt. Als Kontrolle diente eine Bakterienkultur eines nicht transformierten *E. coli* TOP10-Stamms. Die Produktion eines rekombinanten Proteins kann für *E. coli* schädlich sein. Wäre das C19orf12 Protein sehr toxisch, hätte die Klonierung nicht funktioniert, da die transformierten *E. coli* nicht überlebt hätten. Das Protein kann die Bakterien aber auch in geringerem Umfang schädigen und zu einem Wachstumsnachteil und da-

mit zu einer langen Kultivierungszeit führen um ausreichend Protein zu gewinnen. Deshalb wurde eine kontrollierte Expression des Proteins durchgeführt und die Produktion des rekombinanten Proteins in der Phase des exponentiellen Wachstums mittels IPTG bei einer OD_{600} ca. 0.6 induziert (Abbildung 3.6).

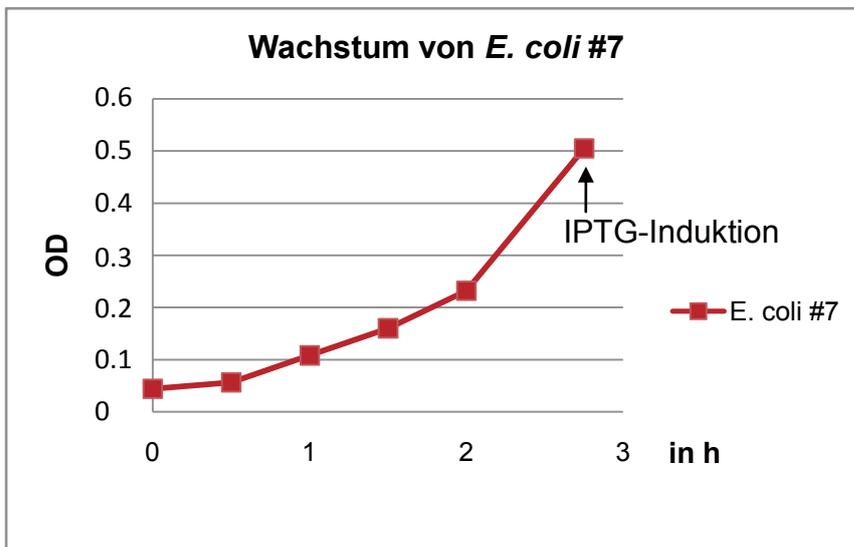


Abbildung 3.6: Wachstumskurve von *E. coli* #7 bis zu einer OD_{600} 0.5

Die Abbildung zeigt das Wachstum von *E. coli* #7 zu Beginn der Kultur. Nach zweistündigem Wachstum befand sich die Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase, so dass die IPTG-Induktion zum Zeitpunkt 2.75 h bei einer OD_{600} 0.5 erfolgte.

Nach IPTG-Zugabe wuchsen nicht transformierte *E. coli* unverändert weiter. Die transformierten Bakterienkulturen zeigten ab dem Zeitpunkt der Induktion eine etwas geringere Wachstumsrate (Abbildung 3.7). Dies lässt sich mit der vermehrten Produktion des rekombinanten Proteins erklären. Ein Absterben der Bakterien auf Grund einer möglichen Toxizität durch His₆:C19orf12 wurde innerhalb des Beobachtungszeitraumes nicht gesehen.

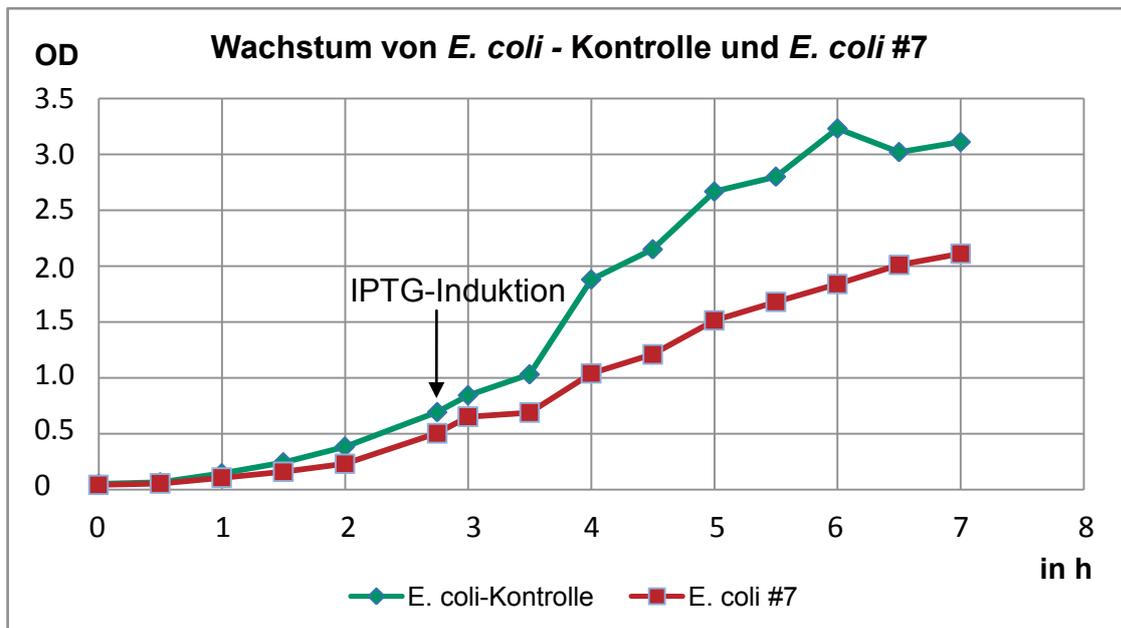


Abbildung 3.7: Wachstumskurven von transformierten *E. coli* #7 und Kontrollen

E. coli #7 und *E. coli*-Kontrolle wuchsen bis zur IPTG-Zugabe nach 2.75 h annähernd identisch. *E. coli*-Kontrolle zeigte weiterhin ein exponentielles Wachstum bis die Kultur nach ca. 6 h bei einer OD_{600} 3.2 gesättigt war. *E. coli* #7 wies ab dem IPTG-Induktionszeitpunkt eine konstante, jedoch deutlich geringere Wachstumsgeschwindigkeit auf und erreichte nach 6-7 h die stationäre Phase noch nicht.

Zum Nachweis der Proteinproduktion des rekombinanten His₆:C19orf12 und dessen zeitlichem Verlauf wurden ab dem Zeitpunkt der IPTG-Induktion stündlich Proben der *E. coli* #7 Kultur entnommen und das gesamte Zelllysate mittels SDS-PAGE nach seinem Molekulargewicht aufgetrennt. Ab einem Wachstum von mindestens zwei Stunden nach IPTG-Induktion zeigte sich anhand des Markers ein deutliches Signal in der Höhe von ca. 20 kDa (Abbildung 3.8 A). Die Größe von C19orf12 beträgt ca. 16 kDa. Der 6x Histidinanhang inklusive der Aminosäuresequenz zwischen Histidinanhang und dem Beginn von C19orf12 berechnete sich auf 3 kDa [64]. Damit lag die Bande in der SDS-PAGE in der erwarteten Größenregion. Um nachzuweisen, dass es sich um ein an den Histidin₆-Tag gebundenes Protein handelte, wurde zusätzlich ein Westernblot der SDS-PAGE durchgeführt. Nachdem das Zelllysate in der SDS-PAGE nach dem Molekulargewicht aufgetrennt

wurde, erfolgte beim anschließenden Blotvorgang durch Anlegen einer Spannung auf Grund der negativen Ladung der Proteine ein Transfer von der SDS-PAGE auf die Oberfläche einer PVDF-Membran. Dadurch standen die Proteine für die Detektion mit dem Anti-His-Antikörper zur Verfügung. Nach der Inkubation mit dem Anti-His-Antikörper und dem zweiten Anti-Kaninchen-Antikörper, der eine Peroxidase gebunden hatte, konnte das His₆-Protein über Chemolumineszenz durch Belichtung eines ECL-Films sichtbar gemacht werden. Die Proben nach mindestens zweistündiger IPTG-Induktion zeigten sowohl in der SDS-PAGE als auch im Westernblot ein deutliches Signal, was auf eine hohe Expression ab diesem Zeitpunkt schließen ließ (Abbildung 3.8 B). Nachdem die Proteinmenge nach mehr als zwei Stunden Wachstum nicht mehr zunahm, wurden die Kulturen in Zukunft nach diesem Zeitraum geerntet.

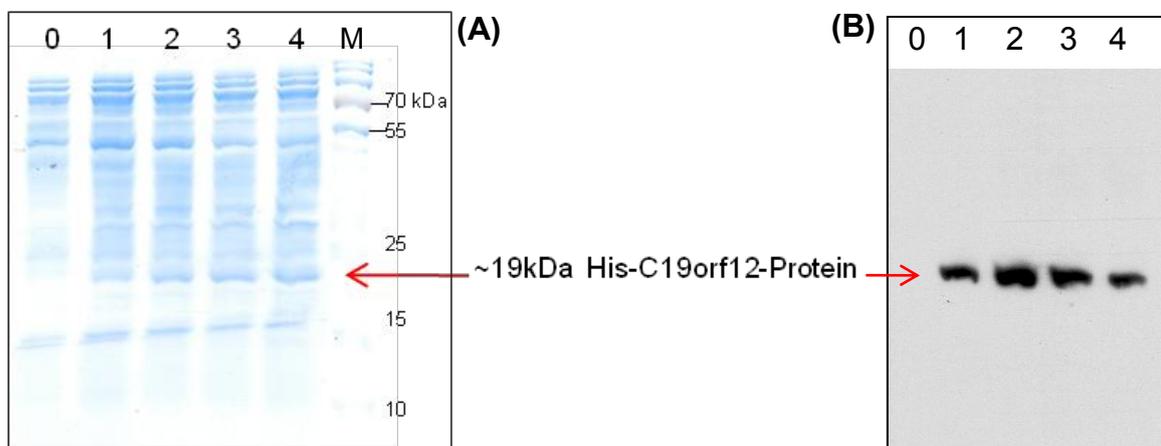


Abbildung 3.8: SDS-PAGE und Western Blot der *E.coli* #7 nach Induktion mit IPTG

Es wurde eine SDS-PAGE und ein Western Blot der Zellysate ab dem Zeitpunkt der IPTG-Induktion (0) erstellt. Die Probeentnahmen erfolgten anschließend stündlich nach 1-4 h (Spalten 1-4). (A) In der SDS-PAGE (12%-iges Gel) ist eine deutliche Proteinzunahme im Bereich von 20 kDa ab einem Wachstum von ≥ 2 h nach IPTG-Induktion zu erkennen. (B) Nach Blotten der SDS-PAGE wurde das His₆:C19orf12-Protein mittels Anti-His-Antikörper im Western Blot detektiert. Zum Zeitpunkt der IPTG-Induktion (0) zeigte sich keine Bande, da noch kein rekombinantes Protein mit His₆-Tag gebildet wurde. Eine deutliche Bande ist nach mindestens 2h Wachstum zu erkennen. M: Marker.

Zur möglichen Verbesserung der Expression des His₆:C19orf12 wurden außerdem weitere *E. coli*-Stämme (*E. coli* BL21, Rosetta, Rosetta pLysS) mit dem gleichen Plasmid transformiert und die Expression des rekombinanten His₆:C19orf12-Proteins mittels IPTG induziert. Der Stamm BL21 enthält kodierende Sequenzen für die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 [11]. Rosetta-Stämme enthalten tRNAs für in *E. coli* selten kodierte tRNAs, die in eukaryotischen Proteinen gängig sind. Diese sind für Transformationen gängige Stämme und standen im Labor zur Verfügung. Keiner der getesteten Stämme zeigte in der SDS-PAGE jedoch ein besseres Ergebnis als *E. coli* TOP10 (Abbildung 3.9).

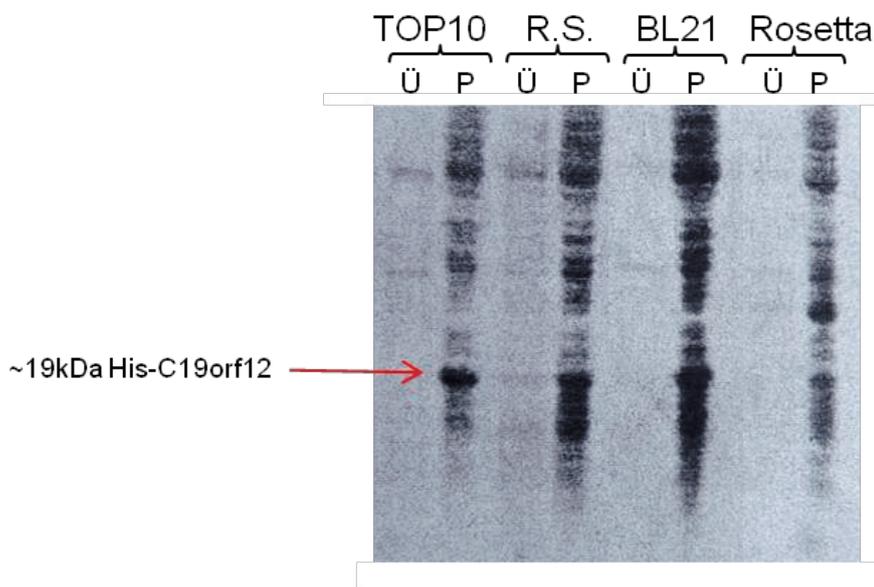


Abbildung 3.9: *E. coli* #7 TOP10, R.S., BL21, Rosetta nach zweistündigem Wachstum unter IPTG

Mit $P_{T_{rc}}His$ -TOPO[®]-Vektor transformierte *E. coli*-Stämme wurden 2 h nach IPTG-Induktion geerntet und zur Pelletierung der Zellen zentrifugiert. Überstand (Ü) und Pellet (P) wurden in einer SDS-PAGE anhand des Molekulargewichts aufgetrennt. Ein Signal bei 20 kDa ist in den Pellets der *E. coli* TOP10, Rosetta pLysS (R.S) und BL21 zu sehen. Dieses war in *E. coli* TOP10 am deutlichsten. Ponceau-Färbung.

3.2.4 His₆:C19orf12 – Proteinaufreinigung

Für die Anreicherung des rekombinanten His₆:C19orf12-Proteins wurde die Bakterienkultur des *E. coli* #7 nach zweistündiger Induktion mit IPTG geerntet. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins erfolgte auf Grund des His₆-Tag mit Hilfe von Nickelbeads. Sie ist grundsätzlich unter nativen und denaturierenden Bedingungen möglich. Vorversuche zeigten unter denaturierenden Bedingungen eine geringere Proteinausbeute als unter nativen Bedingungen. Native Bedingungen haben des Weiteren das Potential, dass möglicherweise ein gefaltetes Protein isoliert werden kann und mit diesem neben Strukturanalysen auch Aktivitätsmessungen durchgeführt werden können, falls das isolierte Protein seine enzymatische Funktion behält.

Der schematische Ablauf der Proteinaufreinigung und Proteinanreicherung ist in Abbildung 3.10 A dargestellt und wird im Folgenden genauer beschrieben.

Der His₆-Tag des rekombinanten Proteins bindet auf Grund seiner Struktur gut an Nickel (Ni²⁺) (Abbildung 3.10 B). Deshalb wurde das Zelllysate der *E. coli* #7-Kultur mit einer Suspension aus Nickelbeads inkubiert. Durch Zentrifugation konnten im Anschluss daran Proteine, die nicht an die Nickelbeads banden, von der Nickelbeads-His₆:C19orf12-Suspension getrennt werden. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschvorgänge und anschließende Zentrifugierung auf Grund geringerer Affinität zu den Nickelbeads reduziert. Durch die Strukturähnlichkeit von Imidazol und Histidin kann Imidazol Histidin kompetitiv aus Bindungen mit Nickel verdrängen, so dass das rekombinante His₆:C19orf12-Protein nach den Waschvorgängen mit Hilfe eines imidazolhaltigen Puffers wieder von den Nickelbeads getrennt werden konnte (Abbildung 3.10 C).

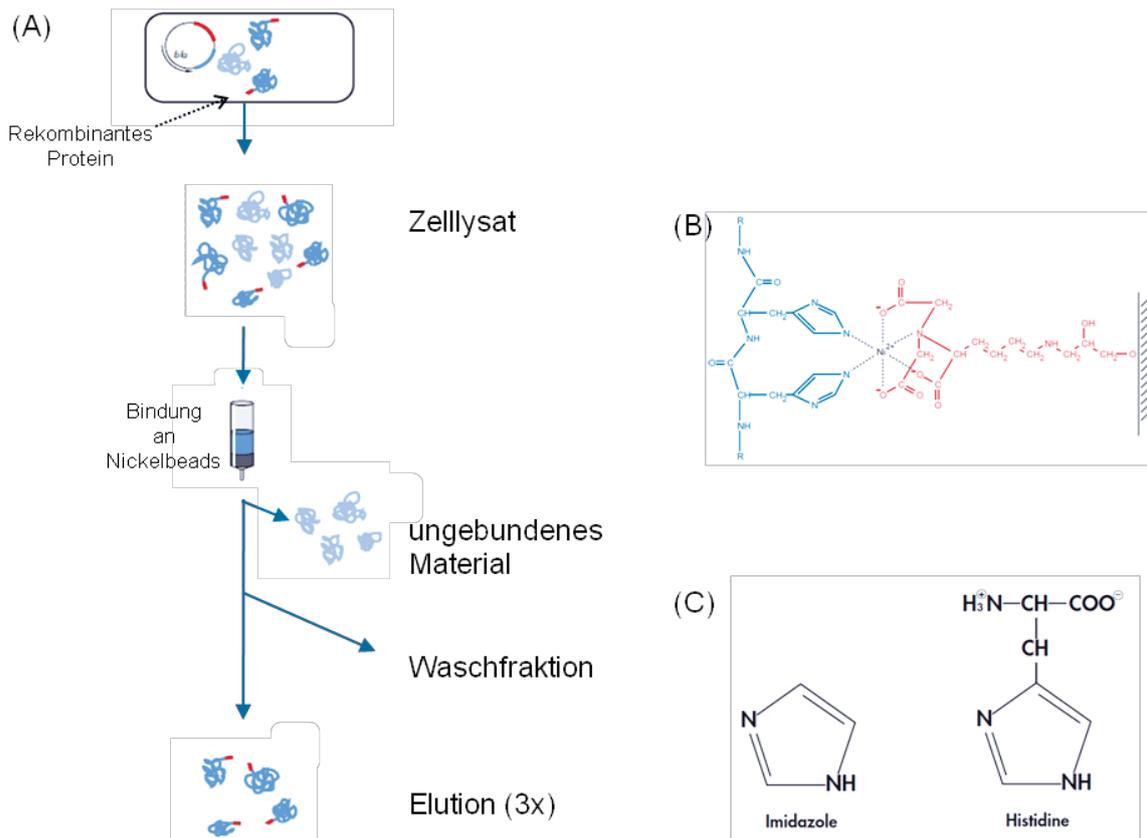


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Proteinisolierung und Reinigung mittels Nickelbeads

Abbildung (A) zeigt den Ablauf der Proteinisolierung und Reinigung, bei dem das Zelllysat mit Nickelbeads inkubiert wurde. Ungebundenes Material sowie schwach an die Nickelsäule bindende Proteine wurden durch Waschvorgänge eliminiert. Anschließend erfolgte die Isolierung des rekombinanten His₆:C19orf12-Proteins durch einen imidazolhaltigen Puffer. (B) zeigt das Prinzip der Bindung des Histidinanhangs des rekombinanten Proteins mit den Nickelbeads. In (C) ist die strukturelle Ähnlichkeit von Histidin und Imidazol dargestellt, was die Grundlage zur Verwendung eines imidazolhaltigen Puffers zur Elution ist [113] (modifiziert).

Um die Aufreinigung beurteilen zu können, wurden die Überstände der oben beschriebenen und in Abbildung 3.10 dargestellten Teilschritte in einer SDS-PAGE nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt (Abbildung 3.11). Die Spezifität der rekombinanten His₆:C19orf12-Aufreinigung wurde durch den Vergleich von *E. coli* #7 mit nicht transformierten *E. coli* deutlich. Im Zelllysate von *E. coli* #7 war ein sehr starkes Signal bei ca. 20 kDa zu erkennen, was den Rückschluss einer hohen His₆:C19orf12-Proteinproduktion in den Zellen zuließ. Ebenso konnten bei ca. 40 kDa und im Bereich von 55-70 kDa Proteinbanden im Zelllysate von *E. coli* #7 gesehen werden, die bei den Kontrollbakterien nicht nachweisbar waren. Vom Molekulargewicht könnten dies Multimere des rekombinanten Proteins gewesen sein.

In der Fraktion „ungebundenes Material“ nach Inkubation mit den Nickelbeads wurden bei beiden *E. coli* Kulturen Proteine verschiedener Größe entfernt. Bei den transformierten Bakterien wird sichtbar, dass sich auch ein Teil des His₆:C19orf12 in dieser Fraktion befand und die Aufnahmekapazität der Nickelbeads wohl gesättigt war.

Nachdem durch die Waschfraktion die Menge an Proteinen, die die His₆:C19orf12-Nickelbeads-Suspension kontaminierte, reduziert werden konnte, zeigt die SDS-PAGE der transformierten Klone in den Elutionsfraktionen eine dicke Bande bei ca. 20 kDa, sowie eine weitere Bande bei ca. 40 kDa. Die Proteine dieser Größen waren zu Beginn im Zelllysate der *E. coli* #7 bereits besonders deutlich und in den Kontrollen nicht nachzuweisen. Die Elution der Kontrollen zeigte im Gegensatz dazu sehr unspezifisch verschiedenste Proteingrößen. Unter Anwesenheit eines entsprechenden Histidinaffinitätsmarkers band fast nur dieser an die Nickelbeads.

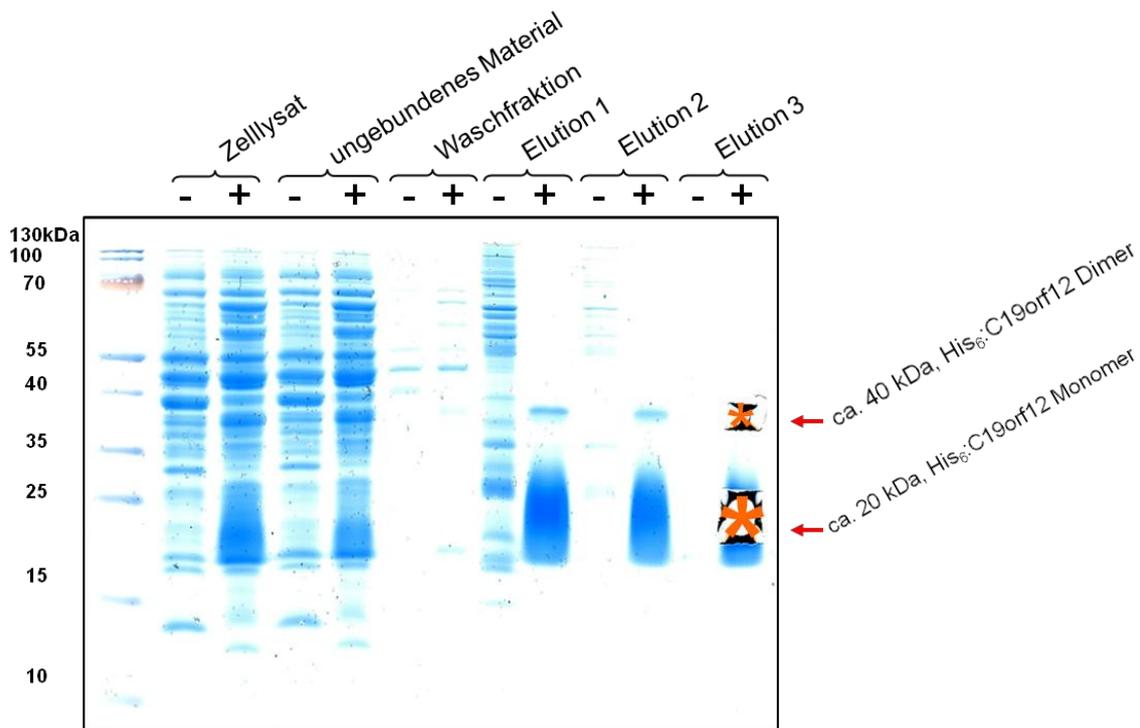


Abbildung 3.11: SDS-PAGE der His₆:C19orf12-Proteinaufreinigung und Isolierung

Aus einer IPTG-induzierten *E. coli* #7 Kultur wurde das rekombinante His₆:C19orf12-Protein in mehreren Schritten aufgereinigt. Die Überstände der einzelnen Teilschritte sowie das aufgereinigte Protein wurden in einer SDS-PAGE (15% Gel) anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Es wurden stets 20 µg Protein geladen. (+) zeigt die *E. coli* #7-Proteine. Als Kontrolle wurde eine nicht transformierte *E. coli* Kultur verwendet (-). In den Elutionsfraktionen der *E. coli* #7 Kultur ist eine sehr starke Proteinbande bei ca. 20 kDa und eine deutliche Bande bei ca. 40 kDa zu sehen. Dies entspricht dem His₆:C19orf12 Monomer, bzw. His₆:C19orf12 Dimer. Die mit * gekennzeichneten Bereiche wurden zur Proteinsequenzierung ausgeschnitten.

Wie bereits beschrieben fand sich außer der breiten Bande bei ca. 20 kDa auch bei ca. 40 kDa eine Bande in der SDS-PAGE, die nur in den transformierten *E. coli* #7 zu sehen war. Auf Grund des Molekulargewichts und des Nachweises in den Elutionsfraktionen wurde angenommen, dass es sich dabei um einen Dimer des His₆:C19orf12-Proteins handelte. Durch Massenspektrometrie in der „Core facility proteomics“ des Helmholtz Zentrum Münchens wurden der His₆:C19orf12 Monomer und der Dimer mit einem guten Reinheitsgrad bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Eine Ursache des Dimers könnten verbleibende Nickel-Ionen darstellen, die mit dem rekombinanten His₆:C19orf12 Chelate bilden [117]. Unter diesen Umständen dürfte der Dimer jedoch nicht in der Fraktion „Zellysat“ zu sehen sein, da hier noch keine Inkubation mit den Nickelbeads stattgefunden hatte.

Die wahrscheinlichere Möglichkeit ist das Vorhandensein von kovalenten Bindungen zwischen zwei C19orf12-Monomeren, die weder durch SDS noch durch Erhitzen aufgebrochen wurden. Sequenzanalysen von *C19orf12* zeigen, dass die Gensequenz ein Cystein kodiert. Cystein ist die einzige Aminosäure mit einer freien Thiolgruppe, die bei Anwesenheit von mehreren Cysteinen leicht zu Disulfidbrücken oxidieren und sehr stabil sind [80].

Das His₆:C19orf12-Dimer wurde besonders nach Aufbewahrung bei - 4 °C sichtbar. In Abbildung 3.11 konnten sowohl Monomer als auch Dimer nachgewiesen werden. Je länger die Proben aufgehoben wurden, desto intensiver wurde der Dimer sichtbar. Der Monomer konnte nach längerer Aufbewahrung nicht mehr, oder nur sehr schwach gesehen werden.

Um zu untersuchen, ob es sich um kovalente Bindungen handelte, die reduziert werden konnten, wurde die Probenzubereitung für die SDS-PAGE, die standardmäßig neben dem Protein Lämmli-puffer und Wasser enthielt, variiert. Der vorhandene Lämmli-puffer enthielt als Reduktionsmittel zwar β -Mercaptoethanol, das jedoch nicht frisch zugegeben wurde. Kurzzeitiges Erhitzen der Proben beeinflusste das His₆:C19orf12-Dimer nicht, was die Vermutung einer kovalenten Bindung bestärkte. Durch direkte Zugabe des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) bei der Probenzubereitung für die SDS-PAGE konnten die Cysteinbrücken – unabhängig von der Temperatur – teilweise reduziert werden (Abbildung 3.12). Der Dimer blieb aber meistens weiterhin sichtbar.

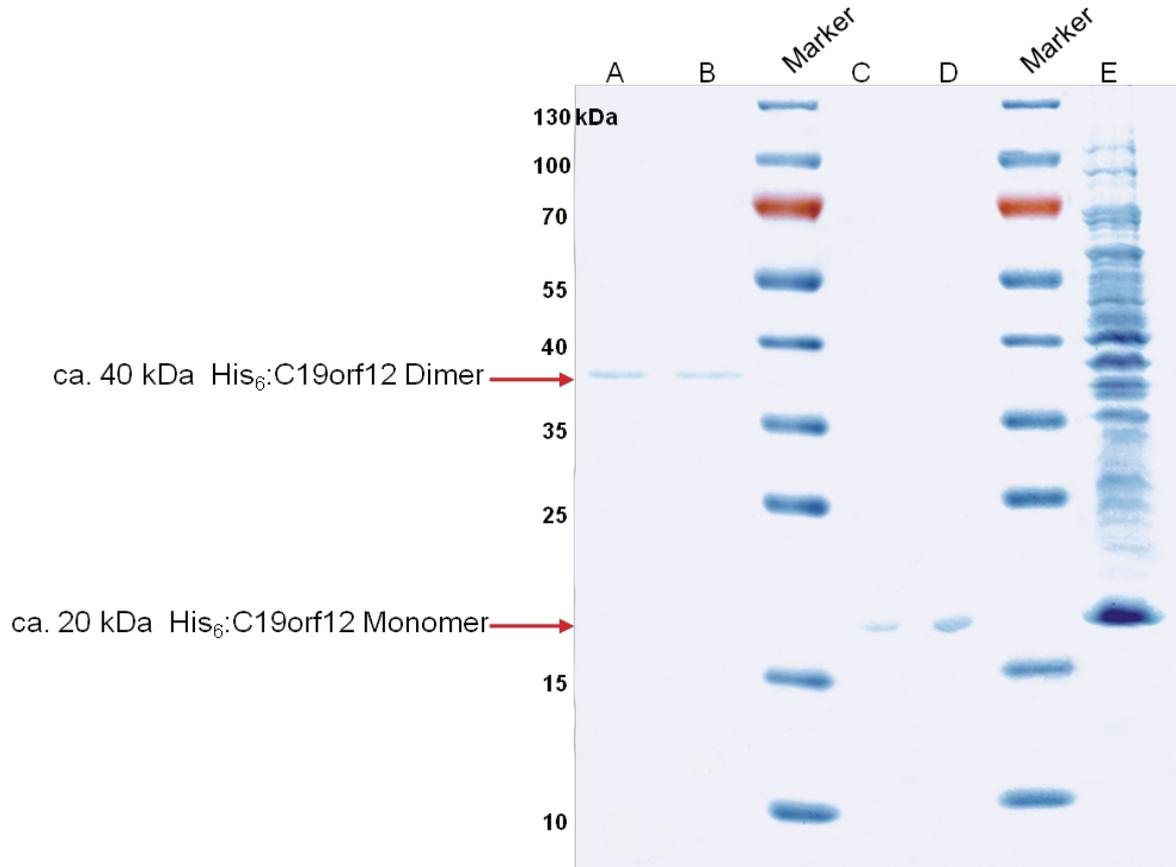


Abbildung 3.12: SDS-PAGE des isolierten His₆:C19orf12-Monomers und Dimers

In A-D wurden je 1.2 µg His₆:C19orf12-Protein aufgetragen. In Spalte A erfolgte keine weitere Probenvorbereitung. In Spalte B wurde die Probe vor der Auftragung drei Minuten bei 95 °C erhitzt. In Spalte C und D wurde den Proben jeweils DTT hinzu gefügt und Spalte D zusätzlich drei Minuten bei 95 °C erhitzt. Die SDS-PAGE zeigt in Spalte A und B den hitzestabilen His₆:C19orf12-Dimer, der durch Zugabe des Reduktionsmittels DTT in Spalte C und D unabhängig von der Temperatur zum Monomer reduziert werden konnte. In Spalte E wurden 13 µg Zellysat von *E. coli* #7 nach Induktion und Zugabe von DTT zur Probenezubereitung geladen. Auch hier konnte das His₆:C19orf12 zum Monomer reduziert werden. M – Marker.

3.3 Anti – C19orf12 – Antikörperproduktion und Antikörpertestung

Durch Immunisierung von Kaninchen sollte ein polyklonaler Antikörper gegen das C19orf12-Protein gebildet werden. Dafür wurden zwei Tiere ausgewählt, deren Präimmunsereen im Western Blot von Kontrollfibroblasten kein Signal bei ca. 15 kDa aufwiesen. Für die Immunisierung wurden ca. 500 µg rekombinantes C19orf12-Protein als Antigen pro Tier benötigt. Diese Menge an gereinigtem C19orf12-Protein konnte aus 100 ml induzierter *E. coli* #7 Kultur gewonnen werden. Dies ist eine Ausbeute von 1mg/100ml und entsprach der Menge, die bei einer optimalen Proteinisolierung erwartet werden konnte [39]. Aus der ersten Elution wurden 90 µl mit einer Konzentration von 6 µg/µl, aus der zweiten Elution 160 µl mit einer Konzentration von 3.25 µg/µl für die Antikörperbildung verwendet. Die Immunisierung wurde durch die Firma „Pineda Antikörperservice“ durchgeführt. Während des Immunisierungszeitraumes erfolgten regelmäßige Blutentnahmen der Kaninchen, deren Serumproben uns stets zugesandt wurden.

Im Western Blot von Kontrollfibroblasten wurde getestet, ob die polyklonalen Antikörper das C19orf12-Protein erkannten. In den Western Blots von Kontrollfibroblasten mit den Serumproben 60 und 90 Tage nach Immunisierung zeigten sich einige unspezifische Banden, so dass der Immunisierungsvorgang fortgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Mit dem Antikörper der Blutentnahme 120 und später 180 Tage nach Beginn der Immunisierung eines Kaninchens zeigte sich im Western Blot von Kontrollfibroblasten ein gutes Signal bei ca. 15 kDa, so dass Frau Dr. Iuso mit diesem Antikörper (180 Tage) zusätzlich eine Affinitätsreinigung durchführte. Mit dem gereinigten Antikörper wurden die Signale im Western Blot deutlich spezifischer. Dieses Signal fehlte im Western Blot von Patientenfibroblasten (Abbildung 3.13).

In Zusammenschau des Signals im Western Blot von Kontrollfibroblasten bei ca. 15 kDa, das bei der Detektion mit dem Präimmunsereum nicht vorhanden war, sich durch Affinitätsreinigung verbessern ließ und das im Western Blot von Patientenfibroblasten fehlte, konnte der Rückschluss gezogen werden, dass es sich bei den polyklonalen Antikörpern um Anti-C19orf12-Antikörper handelte.

Die verwendeten Patientenfibroblasten waren von einem Patienten mit homozygoter Mutation (c.199insG, p.Ala67Glyfs*15). Die Insertion einer Base in der Gensequenz des Patienten führte zur Verschiebung des Leserasters und damit zu einem vorzeitigen Stopcodon. Die theoretische Proteingröße betrug ca. 8 kDa. Möglicherweise wurde das Protein auf Grund der geringen Größe in den Fibroblasten abgebaut.

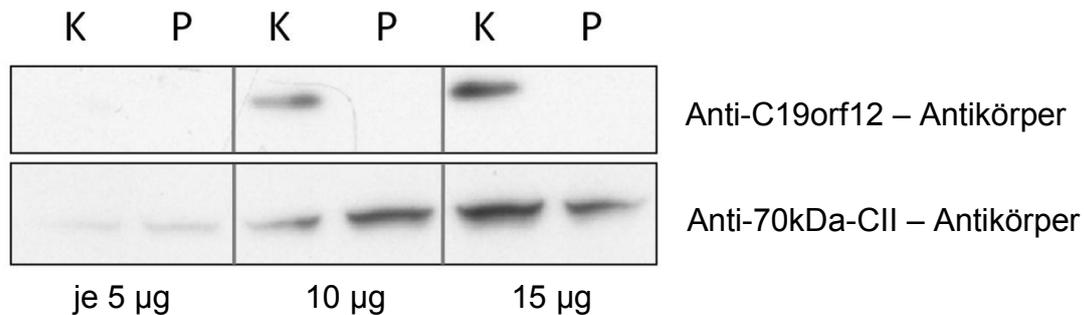


Abbildung 3.13: Nachweis von C19orf12 in Kontrollfibroblasten bzw. ausbleibender Nachweis in Patientenfibroblasten

*Es wurden steigende Konzentrationen (5 µg, 10 µg, 15 µg) an Kontroll- (K), bzw. Patientenfibroblasten (P; Mutation: p.[Ala67Glyfs*15]; p.[Ala67Glyfs*15]) geladen. Bei den Kontrollfibroblasten lässt sich mit zunehmender Konzentration eine deutliche Bande bei ca. 15 kDa mit dem Anti-C19orf12-Antikörper nachweisen. Die Patientenfibroblasten zeigen konzentrationsunabhängig keine mit dem Anti-C19orf12-Antikörper detektierbare Bande. Im Gegensatz dazu konnte als Kontrolle die 70 kDa-Untereinheit des Komplex II des Atmungskettenkomplexes sowohl in Kontroll-, als auch in Patientenfibroblasten konzentrationsabhängig nachgewiesen werden.*

3.4 Subzelluläre Lokalisation von C19orf12

Es stehen verschiedene Computerprogramme zur Verfügung, die die subzelluläre Lokalisation von Proteinen vorhersagen.

Das „Center for biological sequence analysis“ gibt beispielsweise an, dass das C19orf12-Protein eine mitochondriale Lokalisation mit einer Transmembrandomäne aufweist [15, 54].

In-silico-Prediktionen können die subzelluläre Lokalisation jedoch nur mit einer statistischen Wahrscheinlichkeit angeben.

Proteine können aber auch experimentell direkt in der Zelle nachgewiesen werden. Dafür ist ein spezifischer Antikörper gegen das zu untersuchende Protein von großem Nutzen. Das Protein kann durch den Antikörper im Western Blot bei der subzellulären Fraktionierung im entsprechenden Kompartiment nachgewiesen werden und mittels Immunfluoreszenz in der konfokalen Mikroskopie detektiert werden.

Da die Generierung des C19orf12-Antikörpers ein zeitaufwendiger Vorgang war und im Vorfeld nicht absehbar war, ob der Antikörper das Protein adäquat erkennen würde, erfolgte parallel die Bestimmung der subzellulären Lokalisation von C19orf12 mittels konfokaler Mikroskopie von transient transfizierten Fibroblasten mit einem gekauften Vektor, der die Gensequenz für ein C19orf12-GFP-Fusionsprotein enthielt.

3.4.1 Western Blot

Zum direkten Nachweis des C19orf12-Proteins in Fibroblastenmitochondrien wurden diese magnetisch mit monoklonalen Anti-TOM22-Microbeads (TOM – engl.: translocase of outer mitochondrial membrane 22) markiert. Der Anti-TOM22-Antikörper band dabei spezifisch an die Translokase der äußeren Mitochondrienmembran. Dadurch konnten die markierten Mitochondrien über eine Magnetsäule

von den übrigen Zellorganellen getrennt werden [89]. Der Westernblot der isolierten Mitochondrien nach Inkubation mit dem Anti-C19orf12-Antikörper zeigte eine deutliche Bande bei ca. 15 kDa in den Kontrollfibroblasten (Abbildung 3.14).

Bei den zur Verfügung stehenden Patientenfibroblasten (Mutation: p.[Ala67Glyfs*15]; p.[Ala67Glyfs*15]) wurden die Mitochondrien gleichfalls mit Anti-TOM22-Antikörper isoliert. Hier fehlte jegliches Signal im Immunblot mit dem Anti-C19orf12-Antikörper. Porin, ein Protein der äußeren Mitochondrienmembran, konnte als Kontrolle sowohl im Western Blot von isolierten Kontroll- als auch Patientenfibroblasten nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

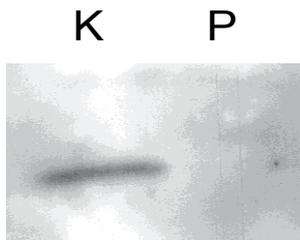


Abbildung 3.14: Nachweis von C19orf12 in isolierten Mitochondrien

*Mitochondrien von Kontroll- (K) und Patientenfibroblasten (P; Mutation: p.[Ala67Glyfs*15]; p.[Ala67Glyfs*15]) wurden mit Anti-TOM22-Antikörper isoliert und im Western Blot mit dem Anti-C19orf12-Antikörper detektiert. Das Signal bei ca. 15 kDa zeigt sich nur bei den Mitochondrien der Kontrollfibroblasten.*

Um weitere Zellorganellen isolieren zu können und diese mit dem C19orf12-Antikörper im Western Blot zu detektieren wurden die Zellkompartimente der Kontrollfibroblasten in einem weiteren Experiment mittels differentieller Zentrifugation separiert (Kap. 2.2.9). Nach Homogenisierung wurden die Zellkerne sowie noch komplette Zellen durch Zentrifugation bei 600 g pelletiert, die (angereicherte) mitochondriale Fraktion erhielt man nach Zentrifugation mit 10.000 g und nach Zentrifugation mit 100.000 g sollte sich das ER im Pellet, die zytosolische Fraktion im Überstand befinden. Nach SDS-PAGE wurden alle Kompartimente im Western Blot mit dem Anti-C19orf12-Antikörper detektiert (Abbildung 3.15).

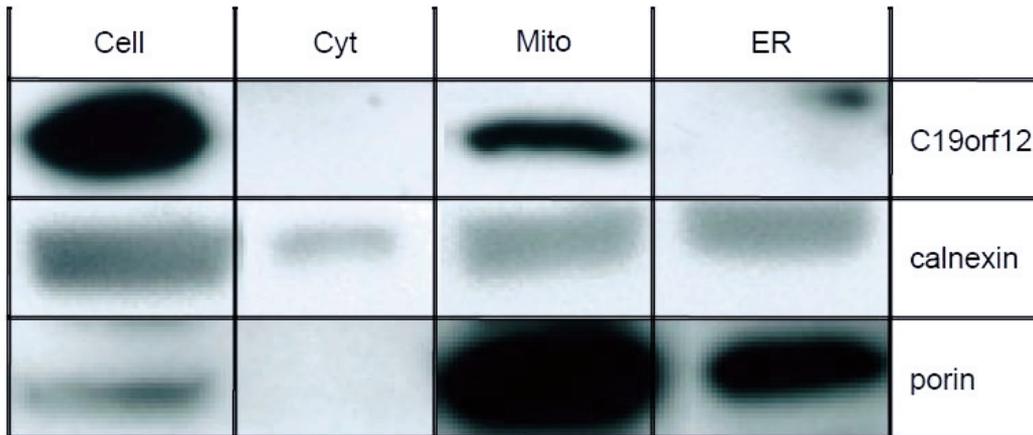


Abbildung 3.15: Subzelluläre Lokalisation von C19orf12 mittels Western Blot

Kontrollfibroblasten wurden gesammelt und Zelllysate (Cell), Mitochondrien (Mito), ER und Zytosol (Cyt) durch differentielle Zentrifugation voneinander getrennt, 20 µg pro Fraktion geladen und ein Immunblot mit dem Anti-C19orf12-Antikörper durchgeführt. Als Kontrolle wurde ein Anti-Calnexin und Anti-Porin-Antikörper verwendet. Calnexin zeigt sich im Zelllysate sowie in der mitochondrialen und der ER-Fraktion. Porin zeigt sich zusätzlich zum Zelllysate in der mitochondrialen Fraktion stark angereichert sowie in der ER-Fraktion. Bei der Detektion mit dem Anti-C19orf12-Antikörper zeigt sich bei ca. 15 kDa außer im Zelllysate auch in der mitochondrialen Fraktion ein Signal, das jedoch nicht angereichert erscheint. C19orf12 ist aber weder im ER noch im Zytosol nachweisbar.

Als Kontrolle des Experiments der differentiellen Zentrifugierung wurden Antikörper gegen Porin und Calnexin, Proteine der äußeren Mitochondrienmembran bzw. des ER verwendet.

Im Western Blot mit dem Anti-Porin-Antikörper konnte das Protein im Zelllysate nachgewiesen werden. Porin zeigte sich außerdem in der mitochondrialen Fraktion stark angereichert, und war auch in der ER-Fraktion sichtbar. Nachdem es als Protein der äußeren Mitochondrienmembran in beiden Fraktionen, nicht jedoch im Zytosol nachzuweisen war, ließ sich auf eine nicht vollständige Separierung dieser beiden Kompartimente schließen. Denkbar wäre auch, dass sich die Außenmembran der Mitochondrien bei der subzellulären Fraktionierung von den Organellen gelöst hat und deshalb bei der Zentrifugation fälschlicherweise in die ER-Fraktion gelangte.

Calnexin konnte außer im gesamten Zelllysate als Protein des ER nicht nur in dieser, sondern ebenfalls in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden.

Dies lässt den Rückschluss zu, dass das ER nicht vollständig von den Mitochondrien getrennt werden konnte. Es zeigt sich aber keine Anreicherung der ER-Fraktion.

Bei der Detektion mit dem Anti-C19orf12-Antikörper zeigte sich das stärkste Signal bei ca. 15 kDa in der Fraktion der gesamten Zellen. Ebenso konnte eine deutliche, aber schmälere Bande in der mitochondrialen Fraktion nachgewiesen werden.

Es zeigten sich trotz Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT oder TCEP zu den C19orf12 Proben vor allem in der mitochondrialen Fraktion mehrere Signale mit einem höheren Molekulargewicht, die teilweise einem Dimer, beziehungsweise Multimeren entsprechen könnten (Abbildung 3.16). Diese Banden waren jedoch nicht im Zelllysate zu sehen. Sollten diese Signale C19orf12-Multimeren entsprechen, erklärt dies, warum die mitochondriale Fraktion in Abbildung 3.15 nicht angereichert erscheint. Eindeutig zu sehen ist aber, dass das C19orf12 Protein nicht im Zytosol ist und auch kein Protein des ER zu sein scheint.

Da die einzelnen Fraktionen nicht optimal voneinander getrennt wurden und in der ER-Fraktion auf Grund fehlender Calnexinanreicherung möglicherweise zu wenig Protein aufgetragen wurde und die Ergebnisse nicht ganz eindeutig zu interpretieren waren, wurde das Experiment mehrfach durchgeführt. Dazu wurden stets neue Kontrollfibroblasten gezüchtet und das Protokoll zur Isolierung der Zellorganellen variiert. Das Experiment ist sicherlich nicht perfekt, die gezeigten Bilder stellen aber die besten Ergebnisse dar.

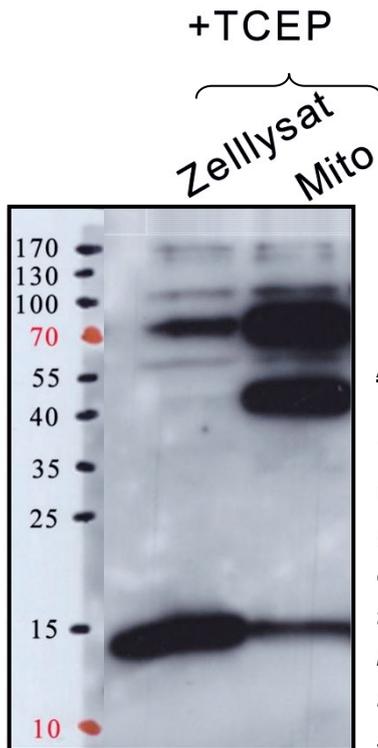


Abbildung 3.16: Nachweis von C19orf12-Monomer, -Dimer und -Multimeren in Kontroffibroblasten

Trotz TCEP-Zugabe ist im Zellysat neben dem Monomer auch ein C19orf12-Multimer nachzuweisen. In der mitochondrialen Fraktion (Mito) zeigt sich ein scheinbar nicht angereicherter Monomer sowie der C19orf12-Dimer und ein Multimer sehr deutlich, die im Zellysat teilweise nicht zu erkennen sind. Diese erklären, weshalb bei isolierter Betrachtung des C19orf12-Monomers der mitochondrialen Fraktion (Abbildung 3.15) das Protein als nicht angereichert erscheint.

3.4.2 Konfokale Mikroskopie

Bei der konfokalen Mikroskopie kann die subzelluläre Lokalisation von Proteinen auf Grund ihrer Lichtemission beurteilt werden. Dies kann über einen spezifischen Antikörper erreicht werden, indem ein zweiter spezies-spezifischer fluoreszierender Antikörper an ihn bindet und damit das gewünschte Protein sichtbar macht. Eine andere Möglichkeit ist die Zellen mit einem Plasmid zu transfizieren oder transduzieren, das die Gensequenz zur Produktion des zu untersuchenden Proteins zusammen mit einem Fluoreszenzmarker enthält. Fluoreszenzmarker sind Proteine, die nach Anregung einer bestimmten Wellenlänge zur Emission einer Wellenlänge im sichtbaren Bereich fähig sind. GFP (Grün Fluoreszierendes Protein) ist ein solches Protein. Es wurde erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* isoliert und emittiert bei Anregung der Wellenlänge im blauen Farbbereich grünes Licht [40]. In den meisten Fällen lässt es sich gut an Proteine binden ohne deren eigentliche Funktion oder

den Transport innerhalb der Zelle zu behindern und ermöglicht so die Sichtbarmachung des zu untersuchenden Proteins innerhalb der Zelle.

Zu Beginn der Arbeit war nicht klar, ob der zu generierende Antikörper das C19orf12-Protein letztendlich erkennen würde und die notwendige Spezifität zur eindeutigen Detektion mittels konfokaler Mikroskopie besitzen würde. Deshalb entschlossen wir uns die subzelluläre Lokalisation von C19orf12 mittels konfokaler Mikroskopie nicht mit dem selbst generierten C19orf12-Antikörper zu detektieren, sondern verwendeten einen käuflich zu erwerbenden Vektor der Firma Origene, der das C19orf12-Protein (Isoform 1) mit einem am C-Terminus gekoppelten GFP enthielt [114]. Mit diesem Plasmid wurden Kontrollfibroblasten transient transfiziert. Dadurch wurde die Plasmid-DNA in den Zellkern der Fibroblasten eingebracht, jedoch nicht in die Chromosomen-DNA integriert. Dies führte zu einer zeitlich begrenzten Expression des C19orf12-GFP-Fusionsproteins, das in der konfokalen Mikroskopie grün fluoreszierte. Um die Lokalisation des Fusionsproteins bestimmen zu können, wurden die Zellen nach Fixierung zusätzlich mit einem Anti-mtSSBP-anti-Kaninchen-Antikörper (engl.: Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein) als Marker für die Mitochondrien inkubiert. Dieser sollte an die mitochondriale DNA binden. Durch Verwendung eines zweiten Antikörpers – Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 568-Antikörper –, der in der Mikroskopie Wellenlängen im roten Bereich emittiert, konnten in der konfokalen Mikroskopie mitochondriale Strukturen rot gefärbt werden. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) blau gefärbt.

Zur Mikroskopie wurde ein konfokales Mikroskop der Firma Leica verwendet. Um die gefärbten Zellbestandteile erkennen zu können, beziehungsweise damit die Antikörper fluoreszieren konnten, wurden UV-Licht sowie Argonlaser mit den Wellenlängen 488 nm und 568 nm zur Anregung verwendet. Die Betrachtung der Fibroblasten erfolgte 12, 18, 24, 48 und 56 Stunden nach Transfektion. Nach 12 h zeigte sich noch keine Fluoreszenz. Die besten Ergebnisse konnten ca. 18 h nach Transfektion erhalten werden (Abbildung 3.17). Transfizierte Fibroblasten konnten in der Mikroskopie durch die Grünfärbung erkannt werden, mitochondriale Strukturen waren rot und die Zellkerne stellten sich blau dar. Bei einer Vergrößerung mit einem 63x Immersionsöl-Objektiv wies die grüne Färbung der transfizierten Fibroblasten dieselbe Lokalisation wie die durch das mtSSBP rötlich markierten Mitochondrien auf. Bei Überlappung der Signale bildete sich eine Gelbfärbung. Durch

die Färbung mit mtSSBP wurde „nur“ die mitochondriale DNA, nicht jedoch alle Bestandteile der Mitochondrien sichtbar gemacht. Dies erklärt, weshalb die Überlappung der Signale nicht perfekt war, und transfizierte Fibroblasten neben der Gelbfärbung an manchen Stellen weiterhin grün fluoreszierten. Auf Grund der Überlappung der Signale kann der Rückschluss einer Kolokalisation des GFP-gekoppelten C19orf12-Proteins mit dem mtSSBP gezogen werden. Die Kolokalisation wurde durch Frau Dr. Iuso auch bei transduzierten Kontrollfibroblasten nachgewiesen.

Es zeigte sich zwar weder im Zytosol noch im Zellkern eine eindeutige Grünfärbung, eine Lokalisation in ein weiteres Kompartiment ist aber nicht ausgeschlossen.

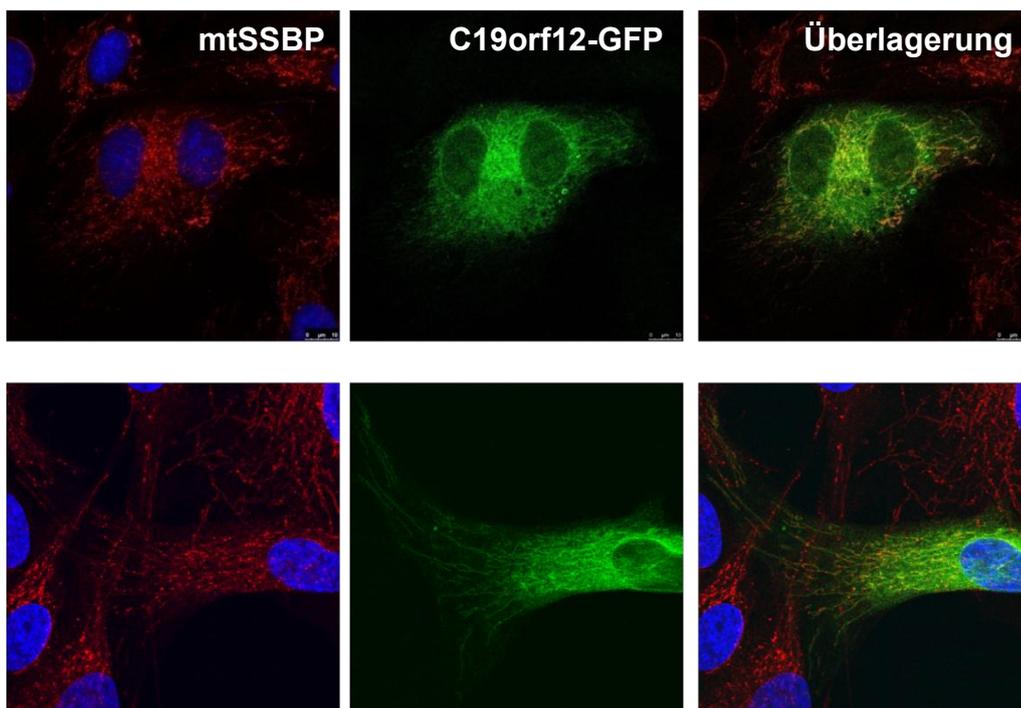


Abbildung 3.17: Subzelluläre Lokalisation von C19orf12 in der konfokalen Mikroskopie

Kontrollfibroblasten wurden transient mit einem GFP-gekoppelten C19orf12 (grün) transfiziert, die Mitochondrien mit dem 'mitochondrial single-stranded DNA-binding protein' (Anti-mtSSBP – rot) gefärbt und Zellkerne mit DAPI (blau) gefärbt. Die Mikroskopie wurde 18 h nach Transfektion durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit UV-Licht und Argonlaser der Wellenlänge 488 nm und 568 nm. In der Überlagerung des mtSSBP mit dem GFP-gekoppelten C19orf12 zeigt sich eine Kolokalisation und somit eine mitochondriale Lokalisation des GFP-gekoppelten C19orf12. Gezeigt sind zwei Kontrollfibroblasten in der Vergrößerung mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv.

Wurden die Fibroblasten nach längerer Transfektion (≥ 24 h) betrachtet, zeigte sich weiterhin die Überlappung der grün fluoreszierenden transfizierten Fibroblasten mit den rot erscheinenden Mitochondrien. Es zeigte sich jedoch eine veränderte mitochondriale Struktur. Die länglichen, tubulären Strukturen, wie in Abbildung 3.17 zu sehen, waren kaum mehr erkennbar. Es zeigten sich stattdessen kleine runde, verklumpete Strukturen. Möglicherweise führte eine Transfektion der Fibroblasten über mindestens 24 h zu einem Schaden der mitochondrialen Morphologie (Abbildung 3.18). Nicht auszuschließen ist aber auch, dass es sich lediglich um ein GFP bedingtes Artefakt handelt.

Auf Grund der mitochondrialen Lokalisation in Verbindung mit der *in silico* vorhergesagten Transmembrandomäne wurde dieser NBIA-Subtyp als MPAN (**Mitochondrial Membrane Protein associated Neurodegeneration**) bezeichnet [54].

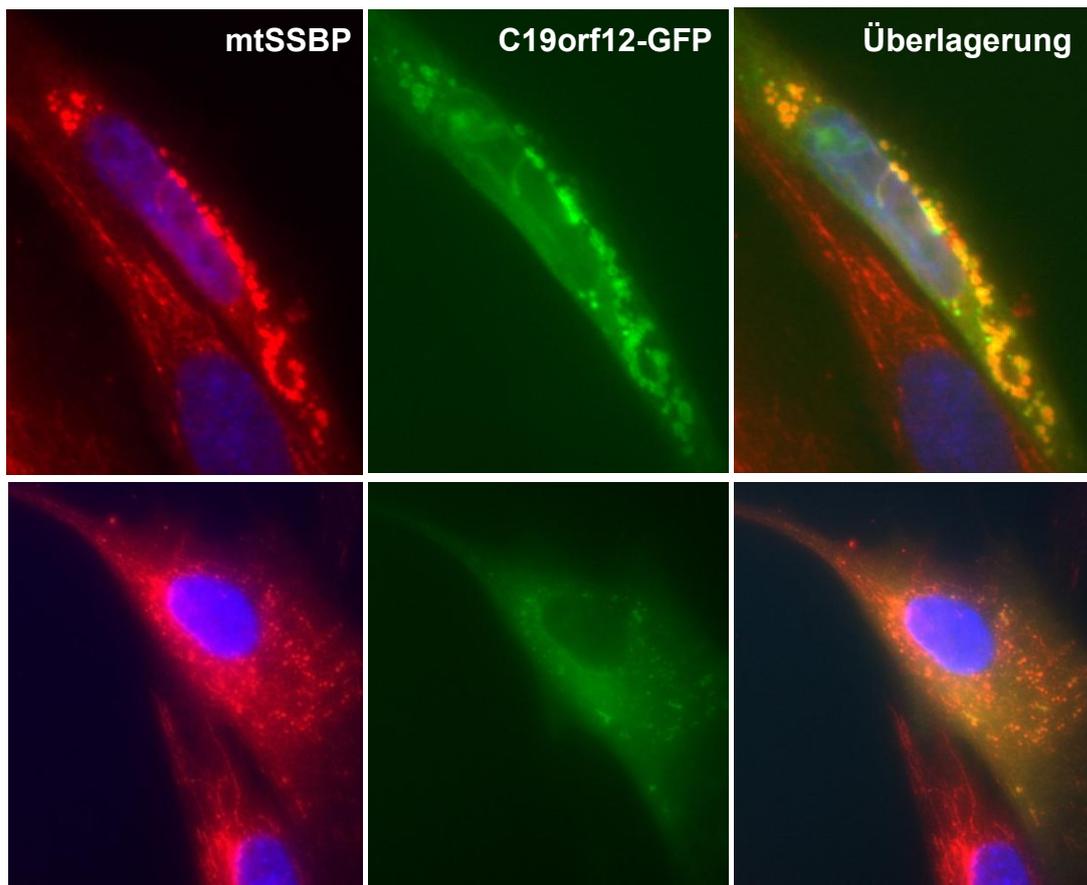


Abbildung 3.18: Veränderte mitochondriale Morphologie von *C19orf12-GFP* transfizierten Fibroblasten
Die Fibroblasten zeigen nach 48 h Transfektion mit dem GFP-*C19orf12*-Fusionsprotein (grün) eine veränderte mitochondriale Struktur. Die mit dem mtSSBP rot gefärbten Mitochondrien verklumpen und verlieren ihre übliche Morphologie. Die Anregung erfolgte mit UV-Licht und Argonlaser der Wellenlänge 488 nm und 568 nm und der Vergrößerung mit einem 63x Ölimmersionsobjektiv. Gezeigt sind zwei Kontrollfibroblasten.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die subzelluläre Lokalisation von C19orf12 in Fibroblasten bestimmt. Dies erfolgte durch differentielle Zentrifugierung und Detektion des Proteins im Westernblot mit einem neu generierten C19orf12-Antikörper. Eine weitere Herangehensweise war die konfokale Mikroskopie eines C19orf12-GFP-Fusionsproteins. Sämtliche Ergebnisse sprechen für eine mitochondriale Lokalisation von C19orf12.

4.1 Betrachtung der Methodik

4.1.1 Wahl des Expressionssystems

Um rekombinantes C19orf12 zur Immunisierung von Kaninchen zu gewinnen, wurde ein prokaryontisches Expressionssystem gewählt. Für die Generierung polyklonaler Antikörper ist ein bakterielles Expressionssystem eine gängige Methode, da sich im besten Fall in kurzer Zeit kostengünstig eine große Menge an rekombinantem Protein gewinnen lässt [60]. Der Nachteil eines bakteriellen Systems besteht vor allem in der fehlenden posttranslationalen Modifizierung [129]. Die dreidimensionale Struktur des rekombinanten Proteins entspricht somit nicht exakt der in Eukaryoten [77]. Deshalb ist im Vorfeld unklar, ob in Prokaryonten exprimierte eukaryotische Proteine, vor allem, wenn es sich um Membranproteine handelt, ihre Enzymaktivität beibehalten [65]. Ein eukaryotisches System zur Generierung eines rekombinanten Proteins wäre jedoch mit einem deutlich langsameren Wachstum und somit einer geringeren Proteinausbeute verbunden gewesen und für die Generierung polyklonaler Antikörper nicht zwingend nötig [113].

4.1.2 Wahl des Affinitätsmarkers

Auch die Verwendung eines Affinitätsmarkers zur Aufreinigung des rekombinanten C19orf12-Proteins ist ein gängiges Verfahren. Der für die Produktion von rekombinantem Protein verwendete Histidin-Tag ist mit 3 kDa ein kleiner Affinitätsmarker, der für die Antikörperproduktion im Allgemeinen keine Einschränkung darstellt und deshalb nicht zwangsläufig abgeschnitten werden muss. Es stellt sich eher die Frage, ob der verwendete N-terminale His-Tag für die Produktion von Antikörpern, die speziell gegen den Bereich vor der Transmembrandomäne gerichtet sind, hinderlich gewesen sein könnte und ein C-terminaler Affinitätsmarker besser geeignet gewesen wäre.

Bei größeren Affinitätsmarkern wie auch dem verwendeten GFP-Tag ist nicht auszuschließen, dass es mit der Funktion, bzw. auch der Lokalisation des zu untersuchenden Proteins interferiert. Um dies auszuschließen hätten die Fibroblasten statt mit dem Fusionsprotein transfiziert zu werden nach Detektion mit dem C19orf12-Antikörper mit einem spezie-spezifischen fluoreszierenden Antikörper markiert werden können. Nachdem im Vorfeld aber unklar war, ob der zu bildende Antikörper funktionsfähig sein würde entschieden wir uns den käuflich erwerbba- ren Vektor zu verwenden.

4.1.3 Proteinproduktion und Proteinaufreinigung

Die Kultivierung der transformierten *E. coli*, Induktion der C19orf12-Proteinproduktion mit anschließender Proteinaufreinigung und Auftragung mittels SDS-PAGE dauerte bei einmaliger Durchführung vier Tage. Deshalb galt es die einzelnen Schritte soweit zu optimieren, dass im Endeffekt ausreichend rekombinantes His₆:C19orf12-Protein zur Immunisierung zur Verfügung stand. Gleichzeitig musste sich der Arbeitsaufwand für die Verbesserung der Teilschritte in Grenzen halten. Der Zeitpunkt und die Zeitdauer der Induktion der Proteinproduktion wurden durch Wachstumskurven der *E. coli* und durch Detektion des produzierten His-

Tag-Proteins mittels His-Antikörper bestimmt. Allerdings wurden nur zwei Temperaturen getestet. Außer *E. coli* TOP10 wurden *E. coli* BL21, Rosetta und Rosetta pLysS mit den festgelegten Konditionen getestet. Nachdem sich hier keine bessere Proteinproduktion zeigte wurde jedoch keine weitere Optimierung hinsichtlich Induktionszeitpunkt und Induktionsdauer oder Kultivierungstemperatur getestet. Stattdessen beschränkten wir uns auf *E. coli* TOP10.

Der Vorgang der Proteinaufreinigung konnte weitgehend nach dem vorhandenen Protokoll durchgeführt werden. Das Problem hierbei bestand eher darin die handwerklichen Fertigkeiten zur Durchführung zu erlernen.

In der SDS-PAGE zeigte sich, dass auch eine bereits gesteigerte Menge an verwendeten Nickelbeads weiterhin gesättigt war und ein Teil des rekombinanten Proteins deshalb bei der Aufreinigung verloren ging. Auch nach den drei durchgeführten Elutionsschritten konnte man sehen, dass immer noch rekombinantes His₆:C19orf12 an die Nickelbeads gebunden war. Die Menge an aufgereinigtem Protein hätte somit durch die Steigerung der Menge an Nickelbeads bzw. weitere Elutionen oder Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer wahrscheinlich noch gesteigert werden können. Nachdem jedoch die Ausbeute bei einem guten Reinheitsgrad ausreichend für die Immunisierung war, wurde aus zeitlichen Gründen keine weitere Optimierung durchgeführt.

4.1.4 Antikörperproduktion und Antikörpertestung

Im Vorfeld der Antikörperproduktion, die durch die Firma Pineda durchgeführt wurde, testeten wir Präimmunseren verschiedener Kaninchen und wählten zwei Versuchstiere aus, die bei der Detektion von Fibroblasten im Western Blot kein Signal mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa aufwiesen, um mögliche Kreuzreaktionen zu vermeiden. Das Immunserum des ersten Kaninchens verbesserte sich durch mehrmalige Immunisierungen immer weiter, so dass wir letztendlich dessen Serum nach 180 Tagen Immunisierung als Antikörper verwenden konnten. Mit diesem führte Frau Dr. Iuso eine Affinitätsreinigung durch. Das Immunserum des so genannten zweiten Kaninchens lieferte über viele Monate keine, bzw. nur

unspezifische Banden. Das Signal wurde im Verlauf zwar ebenfalls besser, blieb aber immer schlechter als das von Kaninchen Nummer eins.

Der affinitätsgereinigte Antikörper wurde hinsichtlich seiner Spezifität untersucht. Im Western Blot von Kontrollfibroblasten war mit dem Antikörper eindeutig ein Signal mit einem Molekulargewicht von ca. 16 kDa zu sehen. Das Fehlen des entsprechenden Signals im Western Blot von Patientenfibroblasten konnte somit die Spezifität des generierten Antikörpers beweisen.

4.2 Kritische Betrachtung der Ergebnisse

4.2.1 Lokalisationsnachweis von C19orf12 in Fibroblasten

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation von C19orf12 wurden verschiedene Experimente durchgeführt, die in Zusammenschau dafür sprechen, dass C19orf12 in die Mitochondrien lokalisiert.

Nachweis in mittels Anti-TOM22-Antikörper isolierten Fibroblastenmitochondrien

In einem ersten Ansatz wurden die Mitochondrien durch Anti-TOM22-Antikörper aus Fibroblasten isoliert. C19orf12 konnte durch den C19orf12-Antikörper im Western Blot von Kontrollfibroblasten in dieser Fraktion nachgewiesen werden. Ebenso konnte Porin als Protein der äußeren Mitochondrienmembran detektiert werden. Dies zeigt, dass mitochondriale Proteine durch die Markierung mit dem Anti-TOM22-Antikörper isoliert werden konnten. Ob jedoch weitere Proteine aus anderen Zellorganellen ebenfalls isoliert wurden, kann nicht ausgeschlossen werden. Deshalb ist kein direkter Rückschluss auf eine mitochondriale Lokalisation von C19orf12 anhand dieses einen Ergebnisses möglich. Es zeigt aber, dass es sich zusammen mit mitochondrialen Proteinen isolieren lässt.

Lokalisationsnachweis durch differentielle Zentrifugation

Die Zellorganellen mittels differentieller Zentrifugation zu isolieren war nicht vollständig zufrieden stellend und ein aufwendiger Vorgang. Zum einen erhielten wir stets nur geringe Mengen an Protein. Zum anderen trennten die Zentrifugations-

schritte die einzelnen Organellen möglicher Weise nicht immer vollständig, weshalb immer wieder unterschiedliche Ergebnisse im Western Blot zu sehen waren. Als Kontrolle für mitochondriale Proteine wurde wiederum Porin verwendet. Es zeigte sich jedoch außer im Zelllysate und in der mitochondrialen Fraktion, in der es stark angereichert wurde, zusätzlich in der ER-Fraktion. Nachdem bekannt ist, dass Porin in die äußere Mitochondrienmembran, nicht jedoch auch ins ER lokalisiert, wurden bei der Präparation diese beiden Fraktionen nicht vollständig aufgetrennt bzw. scheint ein Teil der äußeren Mitochondrienmembran in die ER-Fraktion gelangt zu sein.

Auch Calnexin als Protein, das in das ER lokalisiert, wurde bei der Detektion im Western Blot nicht nur dort, sondern ebenfalls in der Fraktion mit mitochondrialen Proteinen gesehen. Auch die mitochondriale Fraktion scheint durch die differentielle Zentrifugation nicht vollständig rein von ER-Proteinen geworden zu sein.

Der C19orf12-Monomer lässt sich deutlich im Zelllysate nachweisen. Ein etwas schwächeres Signal zeigt sich auch in der mitochondrialen Fraktion, nicht aber im ER. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich bei entsprechend langer Belichtung auch ein schwaches Signal im ER zeigen würde und ein geringer Teil des Proteins vielleicht auch in dieses Kompartiment lokalisiert, es scheint aber kein primäres ER-Protein zu sein. Dann hätte es wie Calnexin in diesem Kompartiment stärker nachweisbar gewesen sein müssen.

Die auf den ersten Blick fehlende mitochondriale Anreicherung von C19orf12 verglichen mit Porin kann man mit einem Blick auf sämtliche Signale, die durch den C19orf12-Antikörper detektiert wurden, zu erklären versuchen. Bereits im Zelllysate zeigt sich zusätzlich zum C19orf12-Monomer ein schwaches Signal in der Größenordnung des Dimers, sowie einige weitere Signale im Bereich höheren Molekulargewichts. Möglicherweise sind auch Kreuzreaktionen des Antikörpers dabei. Durch Präparation mit verschiedenen Reduktionsmitteln wie DTT oder TCEP lassen sich einige dieser Aggregate, bzw. Multimere teilweise reduzieren. Viel deutlicher als im Zelllysate sind die Multimere in der mitochondrialen Fraktion zu sehen. Summiert man gedanklich sämtliche der in Frage kommenden Signale der mitochondrialen Fraktion, ergibt sich wie auch bei Porin eine Anreicherung von C19orf12 in dieser Fraktion.

Obwohl sich das rekombinante isolierte His₆:C19orf12 in der SDS-PAGE durch Zugabe von DTT vollständig zum Monomer reduzieren ließ, gelang dies bei der

Detektion von Fibroblasten im Western Blot unabhängig vom verwendeten Reduktionsmittel nie vollständig. Je länger das Protein aufbewahrt, bzw. mit dem Protein gearbeitet wurde, desto höher war der Anteil an Dimer und Multimeren. Diese waren wie bereits erwähnt in der mitochondrialen Fraktion stets deutlicher als im Zelllysate zu sehen.

Auch wenn das Experiment bisher nicht komplett reproduzierbar und damit nicht wirklich zufrieden stellend verlief, da sich immer wieder Multimere unterschiedlicher Größe zeigten, lässt sich C19orf12 außer im Zelllysate jedoch eindeutig in der mitochondrialen Fraktion nachweisen.

C19orf12-GFP-Fusionsprotein in der konfokalen Mikroskopie.

Ein in der konfokalen Mikroskopie betrachtetes C19orf12-GFP-Fusionsprotein wies in Kontrollfibroblasten eine Kolokalisation mit dem mitochondrialen mtSSBP auf. Die Kolokalisation war allerdings nicht komplett. Das C19orf12-Protein zeigte sich in geringerem Umfang auch außerhalb der durch mtSSBP gefärbten Strukturen. Eine Erklärung dafür ist, dass durch mtSSBP nur die mitochondriale DNA, nicht aber sämtliche Bestandteile der Mitochondrien angefärbt werden.

Andererseits muss darüber nachgedacht werden, ob der GFP-Tag den intrazellulären Transport von C19orf12 möglicherweise beeinflusst und somit zu einer Fehllokalisierung führt. Es kann auch ein Hinweis darauf sein, dass C19orf12 nicht ausschließlich in die Mitochondrien lokalisiert.

Zu sehen war jedoch eine veränderte Morphologie der transfizierten Mitochondrien nach einer längeren Transfektionszeit von mindestens 24 h. Sollten dies keine GFP bedingten Artefakte sein, scheint das Experiment den Fibroblasten möglicherweise langfristig zu schaden und wäre dann nicht für weitere Untersuchungen geeignet. Dennoch ist es ein weiteres Argument für eine mitochondriale Lokalisation von C19orf12.

Importexperiment in isolierte Mausmitochondrien.

Dass C19orf12 ein Protein des Intermembranraumes sein könnte zeigt das *in vitro* Importexperiment von radioaktiv markiertem C19orf12 in Mausmitochondrien von Frau Dr. Tiranti [54]. Sie konnte zeigen, dass das Vorläuferprotein durch Behandlung mit Proteinase K zum Teil abgebaut wurde und nur noch ein schwaches Signal im Western Blot der Mausmitochondrien sichtbar war. Nach Vorbehandlung

mit Triton-X100 wurde das radioaktiv markierte C19orf12 durch Behandlung mit Proteinase K vollständig abgebaut. Dies lässt vermuten, dass das C19orf12-Protein innerhalb der Mitochondrien lokalisiert ist.

Der Transport des radioaktiv markierten C19orf12 in die Mausmitochondrien erfolgte außerdem unabhängig vom Membranpotential [54]. Da der Transport über die innere Mitochondrienmembran im Gegensatz dazu ATP-abhängig ist und nur bei intaktem Membranpotential erfolgt, ergibt sich der Verdacht, dass C19orf12 über die äußere, nicht jedoch über die innere mitochondriale Membran transportiert wurde und sich möglicherweise im Intermembranraum der Mitochondrien befinden könnte [54, 101].

Die submitochondriale Lokalisierung könnte auch mittels differentieller Zentrifugation und Proteinase K-Behandlung verifiziert werden. Bislang konnten jedoch nicht ausreichend intakte Mitochondrien isoliert werden, um das Experiment adäquat durchführen zu können.

Zusammenschau.

Keines der Experimente für sich alleine kann eine eindeutige und ausschließliche mitochondriale Lokalisation von C19orf12 beweisen. In Zusammenschau des C19orf12-Nachweises im Western Blot von Fibroblasten in der mitochondrialen Fraktion, dem GFP-C19orf12-Fusionsprotein in der konfokalen Mikroskopie und dem Importexperiment von radioaktiv markiertem C19orf12 in Mausmitochondrien in Verbindung mit Computerprediktionen ist es sehr wahrscheinlich, dass das C19orf12 primär in die Mitochondrien lokalisiert.

4.2.2 Dimerisierung von C19orf12

Gerade in Hinblick auf die intramitochondriale Lokalisation, den Transportmechanismus und die Funktion des Proteins fällt auf, dass *C19orf12* ein Cystein kodiert. Die Aminosäure Cystein unterscheidet sich durch ihre außergewöhnliche Reaktivität und ihre chemische Vielfältigkeit von den übrigen Aminosäuren [119]. Bei Anwesenheit mehrerer Thiolgruppen oxidieren diese rasch unter Bildung von Disulfidbrücken. Diese kovalente Bindung wirkt sich stabilisierend auf die Struktur des

Proteins aus und ist wichtig für dessen native Konformation. Kommt es andererseits zu ungewünschten Disulfidbrücken kann es zu Interaktionen mit dem bereits gefalteten Protein kommen und auch zur Aktivitätsminderung führen [119]. Aus diesem Grund kommt Cystein seltener in Proteinen vor als viele andere Aminosäuren, ist meistens von der Evolution her konserviert und hat oft eine spezifische Funktion innerhalb des Proteins [50, 119].

Humanes *C19orf12* kodiert nur ein Cystein, das sich im Abschnitt vor der vorhergesagten Transmembrandomäne befindet. An dieser Position ist das Protein bis zum Zebrafisch konserviert. Auch *Drosophila* weist ein Cystein am Anfang der Transmembrandomäne auf. Humanes *C19orf12* kann zwar keine intramolekularen Disulfidbrücken bilden, da nur ein Cystein kodiert wird, in der SDS-PAGE und auch im Western Blot zeigten sich jedoch *C19orf12*-Dimere, die sich durch intermolekulare Disulfidbrücken zweier *C19orf12*-Proteine erklären lassen. Diese kovalente Bindung des rekombinanten His₆:*C19orf12*-Proteins in *E. coli* war unabhängig von der Temperatur der Probenzubereitung, ließ sich aber teilweise durch Zugabe des Reduktionsmittels DTT auflösen. Im Western Blot der Kontrollfibroblasten konnten die *C19orf12*-Aggregate bzw. Multimere durch DTT oder TCEP nur geringfügig reduziert werden.

Um weitere Erkenntnis zu erlangen, ob die Dimerisierung und auch die intramitochondriale Lokalisation von *C19orf12* tatsächlich abhängig sind von der Aminosäure Cystein, könnte durch eine Mutagenese ein Plasmid generiert werden, in dem das Cystein durch eine andere Aminosäure ausgetauscht wird. Anhand des anschließend in *E. coli* produzierten Proteins könnte untersucht werden, ob die Fähigkeit zur Dimerisierung in der SDS-PAGE und auch im Western Blot verloren gegangen ist. Besonders interessant wäre dann der subzelluläre Nachweis dieses mutierten *C19orf12*-Proteins in den Kontrollfibroblasten durch Detektion mit dem Antikörper wie auch nach Transfektion in der konfokalen Mikroskopie. Sollte sich zeigen, dass das mutierte Protein nicht in die Mitochondrien lokalisiert, hätte das Cystein wohl eine tragende Funktion bezüglich der intrazellulären Lokalisation von *C19orf12*.

Letztendlich entscheidend ist die Frage, ob die Disulfidbrücken erst durch die Präparation zustande gekommen sind, oder ob *C19orf12* *in vivo* dimerisiert vorliegt und das Cystein bzw. die Disulfidbrücken funktionell wichtig sind.

In der mitochondrialen Matrix wird die Oxidation von Proteinen soweit wie möglich durch Reduktionsmittel wie beispielsweise Glutathion verhindert [35, 119]. Im ER und auch im Intermembranraum der Mitochondrien befinden sich im Gegensatz dazu durchaus Proteine, die in ihrer aktiven Form Disulfidbrücken aufweisen und deren Funktion in der Oxidation und Reduktion von Thiolgruppen anderer Proteine bestehen [118]. Die Aminosäuresequenz von C19orf12 enthält zwar nicht die typische Sequenz C_xC, bzw. C₉C dieser Intermembranproteine, allerdings hat es mit 16 kDa wie die meisten Intermembranproteine ein relativ kleines Molekulargewicht, und es hat, wie ebenfalls die meisten Intermembranproteine, keine charakteristische N-terminale mitochondriale Zielsequenz [128].

Insgesamt gibt es somit mehrere Hinweise auf eine transmembranäre Lokalisation von C19orf12 in die Mitochondrien bzw. deren Intermembranraum.

4.2.3 C19orf12-Tiermodell

Ein adäquates Tiermodell für C19orf12 zu generieren wird bereits durch das Vorhandensein von mindestens zwei Isoformen erschwert. Außer dem Menschen weisen nur Schimpanse und Huhn ebenfalls die längere Isoform auf. Von dieser wird aber angenommen, dass es die krankheitsverursachende Isoform ist, da die Patientenkohorte von Hartig et al. (2011) Mutationen in dieser Isoform aufwies. Weder Huhn noch Schimpanse sind gängige Tiermodelle, so dass es kein wirklich geeignetes Tiermodell gibt.

Für PKAN existieren bereits Tiermodelle. Dabei zeigen transgene Mäuse im Gegensatz zu einem Drosophila-Modell (dPANK/fumble) keine charakteristische neurologische Symptomatik [12, 74, 139]. Für *C19orf12* können mittels Datenbank zwei orthologe Gene, *cg3740* und *cg11671*, für Drosophila gefunden werden [131]. Mit Hilfe eines „knock down“ Drosophila-Modells, an dessen Etablierung Frau Dr. Iuso arbeitet, könnten möglicherweise eine neurologische Symptomatik sowie Gen- und Proteininteraktionen untersucht werden.

5 Ausblick – Gemeinsamkeiten von NBIA

Durch die Entdeckung neuer NBIA-Gene wie *C19orf12* oder *FA2H* nimmt das Wissen um die genetische Heterogenität der NBIA-Erkrankung immer weiter zu. Genaue Prozentangaben der einzelnen Subtypen sind auf Grund der Seltenheit der Erkrankung nur abzuschätzen und durch die örtliche Häufung recht unterschiedlich.

In den Kohorten aus Deutschland und Polen (Institut für Humangenetik der Technischen Universität München), Italien (Center for the study of Mitochondrial Disorders in Children, Mailand) und in den USA (Department of Molecular and Medical Genetics, Oregon Health and Science University, Portland, Oregon) fallen ca. 50% der NBIA-Patienten in die Gruppe PKAN, von drei Prozent in Italien bis 30% in der polnischen Kohorte in MPAN und zwischen 12-20% in PLAN [43, 54].

FA2H war bisher weder bei den italienischen noch bei den polnischen Patienten mutiert. Für den verbleibenden Prozentsatz sind bisher bereits fünf weitere Gene bekannt. Dies ermöglicht aber noch nicht allen Patienten eine molekulargenetische Diagnose [42].

Neben der reinen Mutationsdiagnostik ist besonders die Kenntnis der entsprechenden Proteine und deren Funktionen zum besseren Verständnis der Krankheiten und möglicher kurativer Therapieansätze wichtig. Dabei fallen mehrere Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen NBIA-Genen auf.

Nachdem auch *C19orf12* ein mitochondriales Protein kodiert, weisen die drei Proteine, die am häufigsten bei NBIA mutiert sind – PANK2, PLA2G6 und *C19orf12* –, eine mitochondriale Lokalisation auf.

Des Weiteren konnten erste funktionelle Ergebnisse von Hartig et al. (2011) zeigen, dass *C19orf12* wie PANK2, PLA2G6 und *FA2H* eine Rolle im Lipidmetabolismus spielen könnte [54]. Dies impliziert neben der gleichen subzellulären Lokalisation eine weitere grundlegende Gemeinsamkeit mit den anderen bekannten „childhood-NBIA“-Genen (NBIA mit Beginn im Kindesalter). Es wird postuliert, dass dies der zentrale Prozess in der NBIA-Pathogenese ist. Die Störung der Lipidhomöostase führt möglicherweise zur mitochondrialen Dysfunktion, verminderter Reaktion auf Stressoren und folglich zu einer Neurodegeneration betroffener Gewebe [43, 79, 94].

Klinisch sind ähnliche Symptome nicht nur zwischen den verschiedenen NBIA-Subtypen, sondern teilweise auch mit bekannten neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson zu sehen. Nachdem es Patienten mit Parkinsonsymptomatik und Mutation in *PLA2G6* und *ATP13A2* gibt, sind diesen jeweils ein Parkinsonlokus (PARK 14, bzw. PARK 9) zugeordnet worden [94, 107, 115]. Auch bei einem *C19orf12*-Mutationsscreening bei 676 Patienten mit sporadischem Parkinson wurde eine Mutation in *C19orf12* gefunden. Es bleibt abzuwarten, ob sich bei weiteren Patienten mit ‚idiopathischem‘ Parkinson Mutationen in *C19orf12* zeigen. Genauere Untersuchungen der Proteinfunktionen der NBIA-Gene werden zeigen, ob und an welchem Punkt sich eine gemeinsame pathologische Endstrecke innerhalb von NBIA, aber gerade auch in Hinblick auf Morbus Parkinson finden lässt. NBIA als seltene, monogenetische Erkrankung kann möglicherweise als Modell für häufige neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson herangezogen werden und zu einem besseren Verständnis der pathologischen Vorgänge weit verbreiteter Krankheiten beitragen.

6 Zusammenfassung

NBIA (Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn) ist eine seltene, genetisch bedingte neurodegenerative Erkrankung des ZNS. Die typischen Kennzeichen sind vermehrte Eisenablagerungen in den Basalganglien in Verbindung mit progressiver neurologischer Symptomatik.

Je nach Krankheitsbeginn werden die typischen NBIA-Subtypen des Kindesalters – Pantothenatkinase assoziierte Neurodegeneration (PKAN, ca. 50%), Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration (MPAN, 3-30%), PLA2G6-assoziierte Neurodegeneration (PLAN, 12-20%), Fettsäurehydroxylase assoziierte Neurodegeneration (FAHN) – von den NBIA-Subtypen mit Beginn im Erwachsenenalter – Aceruloplasminämie, Neuroferritinopathie, Kufor-Rakeb-Syndrom, Woodhouse-Sakati-Syndrom – unterschieden.

Im Vordergrund stehen meist extrapyramidalmotorische Störungen, oft in Verbindung mit Pyramidenbahnzeichen. Neben Dystonie, Spastik, Hyperreflexie, Dysarthrie und Ataxie treten bei späterem Symptombeginn zusätzlich Sprachstörungen und Persönlichkeitsveränderungen auf. Eine Dystonie-Parkinsonismus-Symptomatik zeigt sich oftmals bei Krankheitsbeginn im Erwachsenenalter.

Die Diagnostik, früher post mortem oder per Hirnbiopsie, erfolgt heutzutage mittels MRT (T2 gewichtet) und genetischem Mutationsscreening. In der Schädel-MRT der Patienten erscheint der Globus pallidus und die Substantia nigra auf Grund der Eisenablagerungen hypointens. Bei PKAN-Patienten zeigt sich in diesem Areal zusätzlich eine hyperintense Struktur, die als ‚Tigerauge‘ bezeichnet wird und ein pathognomonisches Merkmal dieses Subtyps ist.

Genetische Untersuchungen beziehen sich auf Sequenzierung der in Frage kommenden Gene *PANK2*, *C19orf12*, *PLA2G6*, *FA2H*, *CP*, *FTL*, *ATP13A2* und *C2orf37*. Dennoch verbleibt immer noch ein Rest von Patienten mit idiopathischer NBIA. Bei diesen kann bisher trotz der großen Fortschritte in der Genetik keine Mutation in den bisher bekannten Genen gefunden werden. Die Therapie bei NBIA ist bis zum heutigen Tag rein symptomatisch.

Um in Zukunft eventuell kausale Therapieansätze erarbeiten zu können, muss die Pathogenese von NBIA genauer verstanden werden und die einzelnen NBIA-

Gene, bzw. deren Proteine in ihrem Aufbau, ihrer Funktion und Interaktion mit anderen Genen untersucht werden. Durch die Erstbeschreibung von Mutationen im Gen *C19orf12* bei NBIA-Patienten steht ein gänzlich neues Protein zur Verfügung. *C19orf12* ist bisher weder mit einer Erkrankung assoziiert noch wurde es von seiner Funktion her untersucht.

Als Voraussetzung für funktionelle und strukturelle Analysen von *C19orf12* wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals ein polyklonaler Antikörper gegen *C19orf12* generiert, experimentell validiert und bereits für erste zellbiologische Versuche verwendet.

Dabei wurden Experimente zur subzellulären Lokalisation des Proteins durchgeführt. Mit Hilfe eines rekombinanten His₆-tag-*C19orf12*-Proteins konnten Kaninchen immunisiert und ein polyklonaler *C19orf12*-Antikörper generiert werden. Anhand des Antikörpers ließ sich das *C19orf12*-Protein in Kontrollfibroblasten nachweisen. Der fehlende Nachweis des Signals in Patientenfibroblasten sprach für die Spezifität des Antikörpers.

Anschließend wurden aus Kontrollfibroblasten mittels TOM22-Antikörper mitochondriale Proteine isoliert und *C19orf12* konnte in dieser Fraktion mit Hilfe des Antikörpers nachgewiesen werden.

In einem weiteren Experiment erfolgte durch differentielle Zentrifugation die Auftrennung verschiedener Zellorganellen. *C19orf12* ließ sich auch in diesem Versuch außer im Zellysate in der mitochondrialen Fraktion nachweisen. Dabei zeigten sich vor allem in der mitochondrialen Fraktion außer dem Monomer auch ein Dimer des Proteins. Ursächlich für die Dimerisierung scheint ein hoch konserviertes Cystein in der Aminosäuresequenz von *C19orf12* im Bereich vor der vorhergesagten Transmembrandomäne zu sein. Inwiefern diese Aminosäure eine entscheidende Rolle bezüglich der Proteinstruktur und -funktion spielt, ist aktuell Gegenstand intensiver Forschung.

Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der subzellulären Lokalisation mittels konfokaler Mikroskopie. Ein *C19orf12*-GFP-Fusionsprotein zeigte nach Transfektion von Fibroblasten eine Kolo-kalisation mit dem die mitochondriale DNA markierenden mtSSBP (Mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding Protein), was weitere Rückschlüsse auf eine mitochondriale Lokalisation zulässt.

In Kooperation mit einer italienischen Forschungsgruppe konnten durch ein Importexperiment von radioaktiv markiertem *C19orf12* mit Hilfe des Antikörpers erste

Hinweise auf eine suborganelle Zuordnung in den Intermembranraum von Mitochondrien gewonnen werden.

Sämtliche Versuche konnten mit dem in dieser Arbeit generierten und getesteten C19orf12-Antikörper durchgeführt werden. Dieser wird auch in Zukunft für weitere Experimente eingesetzt werden.

Keines der durchgeführten Experimente allein kann die subzelluläre Lokalisation von C19orf12 eindeutig bestimmen. Jedes Experiment enthält jedoch mehr oder wenig starke Hinweise auf eine mitochondriale Lokalisation; im Western Blot von Kontrollfibroblasten lässt sich C19orf12 in den Mitochondrien detektieren und auch das C19orf12-GFP-Fusionsprotein zeigt in der konfokalen Mikroskopie dieselbe Lokalisation wie ein bereits bekanntes mitochondriales Protein. Dies wird durch Computeranalysen, die eine Transmembrandomäne vorhersagen und durch ein Importexperiment in den Intermembranraum der Mausmitochondrien unterstützt. Deshalb wurde dieser NBIA-Subtyp auch MPAN – Mitochondriales Membranprotein assoziierte Neurodegeneration – genannt.

Gerade durch die Erstbeschreibung von C19orf12 mit bisher noch ungeklärtem Wirkmechanismus und eines zur Verfügung stehenden validierten Antikörpers erhofft man sich neue Erkenntnis zum pathogenetischen Verständnis von NBIA zu erhalten. Darüber hinaus kann NBIA auf Grund der überlappenden klinischen Symptomatik, der pathologischen Ähnlichkeiten und der teilweise identischen Genetik trotz der Seltenheit der Erkrankung möglicherweise als monogenetisches Modell zum besseren pathophysiologischen Verständnis und zu neuen Therapieansätzen bekannter neurodegenerativer Erkrankungen wie Morbus Parkinson beitragen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abiko, Y., *Investigations on pantothenic acid and its related compounds. IX. Biochemical studies. 4. Separation and substrate specificity of pantothenate kinase and phosphopantothenoylcysteine synthetase.* J. Biochem. (Tokyo), 1967. **61**: p. 290-299.
2. Afshar, K., P. Gonczy, S. DiNardo and S.A. Wasserman, *Fumble encodes a pantothenate kinase homolog required for proper mitosis and meiosis in Drosophila melanogaster.* Genetics, 2001. **157**: p. 1267-1276.
3. Aicardi, J. and P. Castelein, *Infantile neuroaxonal dystrophy.* Brain, 1979. **102**(4): p. 727-48.
4. Al-Semari, A. and S. Bohlega, *Autosomal-recessive syndrome with alopecia, hypogonadism, progressive extra-pyramidal disorder, white matter disease, sensory neural deafness, diabetes mellitus, and low IGF1.* Am J Med Genet A, 2007. **143**(2): p. 149-60.
5. Alazami, A.M., A. Al-Saif, A. Al-Semari, S. Bohlega, S. Zlitni, F. Alzahrani, P. Bavi, N. Kaya, D. Colak, H. Khalak, A. Baltus, B. Peterlin, S. Danda, K.P. Bhatia, S.A. Schneider, N. Sakati, C.A. Walsh, F. Al-Mohanna, B. Meyer and F.S. Alkuraya, *Mutations in C2orf37, encoding a nucleolar protein, cause hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, and extrapyramidal syndrome.* Am J Hum Genet, 2008. **83**(6): p. 684-91.
6. Alderson, N.L., B.M. Rembiesa, M.D. Walla, A. Bielawska, J. Bielawski and H. Hama, *The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase.* J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 48562-8.
7. Baburina, I. and S. Jackowski, *Cellular responses to excess phospholipid.* J Biol Chem, 1999. **274**(14): p. 9400-8.
8. Balsinde, J. and M.A. Balboa, *Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells.* Cellular Signalling, 2005. **17**(9): p. 1052-1062.
9. Baumeister, F.A., D.P. Auer, K. Hortnagel, P. Freisinger and T. Meitinger, *The eye-of-the-tiger sign is not a reliable disease marker for Hallervorden-Spatz syndrome.* Neuropediatrics, 2005. **36**(3): p. 221-2.
10. Beaumont, C., P. Leneuve, I. Devaux, J.Y. Scoazec, M. Berthier, M.N. Loiseau, B. Grandchamp and D. Bonneau, *Mutation in the iron responsive element of the L ferritin mRNA in a family with dominant hyperferritinaemia and cataract.* Nat Genet, 1995. **11**(4): p. 444-6.
11. Boesler, B., *Überexpression rekombinanter Proteine,* in *Biologie in unserer Zeit.* 2008. p. 287.
12. Bosveld, F., A. Rana, P.E. van der Wouden, W. Lemstra, M. Ritsema, H.H. Kampinga and O.C. Sibon, *De novo CoA biosynthesis is required to maintain DNA integrity during development of the Drosophila nervous system.* Hum Mol Genet, 2008. **17**(13): p. 2058-69.

13. Bull, P.C., G.R. Thomas, J.M. Rommens, J.R. Forbes and D.W. Cox, *The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene*. Nat Genet, 1993. **5**(4): p. 327-37.
14. Carrilho, I., M. Santos, A. Guimaraes, J. Teixeira, R. Choraó, M. Martins, C. Dias, A. Gregory, S. Westaway, T. Nguyen, S. Hayflick and C. Barbot, *Infantile neuroaxonal dystrophy: what's most important for the diagnosis?* Eur J Paediatr Neurol, 2008. **12**(6): p. 491-500.
15. Center-for-biological-sequence-analysis, www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/. [aufgerufen am 15.08. 2012]
16. Chelly, J., Z. Tumer, T. Tonnesen, A. Petterson, Y. Ishikawa-Brush, N. Tommerup, N. Horn and A.P. Monaco, *Isolation of a candidate gene for Menkes disease that encodes a potential heavy metal binding protein*. Nat Genet, 1993. **3**(1): p. 14-9.
17. Ching, K.H., S.K. Westaway, J. Gitschier, J.J. Higgins and S.J. Hayflick, *HARP syndrome is allelic with pantothenate kinase-associated neurodegeneration*. Neurology, 2002. **58**(11): p. 1673-4.
18. Chinnery, P.F., D.E. Crompton, D. Birchall, M.J. Jackson, A. Coulthard, A. Lombes, N. Quinn, A. Wills, N. Fletcher, J.P. Mottershead, P. Cooper, M. Kellett, D. Bates and J. Burn, *Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the FTL1 460InsA mutation*. Brain, 2007. **130**(Pt 1): p. 110-9.
19. Crandall, B.F., L. Samec, R.S. Sparkes and S.W. Wright, *A familial syndrome of deafness, alopecia, and hypogonadism*. J Pediatr, 1973. **82**(3): p. 461-5.
20. Crompton, D.E., P.F. Chinnery, D. Bates, T.J. Walls, M.J. Jackson, A.J. Curtis and J. Burn, *Spectrum of movement disorders in neuroferritinopathy*. Mov Disord, 2005. **20**(1): p. 95-9.
21. Curtis, A.R., C. Fey, C.M. Morris, L.A. Bindoff, P.G. Ince, P.F. Chinnery, A. Coulthard, M.J. Jackson, A.P. Jackson, D.P. McHale, D. Hay, W.A. Barker, A.F. Markham, D. Bates, A. Curtis and J. Burn, *Mutation in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease*. Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 350-4.
22. Daimon, M., K. Yamatani, M. Igarashi, N. Fukase, T. Kawanami, T. Kato, M. Tominaga and H. Sasaki, *Fine structure of the human ceruloplasmin gene*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **208**(3): p. 1028-35.
23. Defendini, R., W.R. Markesbery, A.R. Mastri and P.E. Duffy, *Hallervorden-Spatz disease and infantile neuroaxonal dystrophy. Ultrastructural observations, anatomical pathology and nosology*. J Neurol Sci, 1973. **20**(1): p. 7-23.
24. Deschauer, M., C. Gaul, C. Behrmann, H. Prokisch, S. Zierz and T.B. Haack, *C19orf12 mutations in neurodegeneration with brain iron accumulation mimicking juvenile amyotrophic lateral sclerosis*. J Neurol, 2012.
25. Devos, D., P.J. Tchofo, I. Vuillaume, A. Destee, S. Batey, J. Burn and P.F. Chinnery, *Clinical features and natural history of neuroferritinopathy caused by the 458dupA FTL mutation*. Brain, 2009. **132**(Pt 6): p. e109.
26. Dick, K.J., M. Eckhardt, C. Paisan-Ruiz, A.A. Alshehhi, C. Proukakis, N.A. Sibtain, H. Maier, R. Sharifi, M.A. Patton, W. Bashir, R. Koul, S. Raeburn, V. Gieselmann, H. Houlden and A.H. Crosby, *Mutation of FA2H underlies a*

- complicated form of hereditary spastic paraplegia (SPG35)*. Hum Mutat, 2010. **31**(4): p. E1251-60.
27. Dooling, E.C., W.C. Schoene and E.P. Richardson, *Hallervorden-Spatz syndrome*. Arch. Neurol., 1974. **30**: p. 70-83.
 28. Edvardson, S., H. Hama, A. Shaag, J.M. Gomori, I. Berger, D. Soffer, S.H. Korman, I. Taustein, A. Saada and O. Elpeleg, *Mutations in the fatty acid 2-hydroxylase gene are associated with leukodystrophy with spastic paraparesis and dystonia*. Am J Hum Genet, 2008. **83**(5): p. 643-8.
 29. Egan, R.A., R.G. Weleber, P. Hogarth, A. Gregory, J. Coryell, S.K. Westaway, J. Gitschier, S. Das and S.J. Hayflick, *Neuro-ophthalmologic and electroretinographic findings in pantothenate kinase-associated neurodegeneration (formerly Hallervorden-Spatz syndrome)*. Am J Ophthalmol, 2005. **140**(2): p. 267-74.
 30. Ensembl, www.ensembl.org ->C19orf12 ->human, . [aufgerufen am 19.09. 2011]
 31. Farina, L., N. Nardocci, M.G. Bruzzone, L. D'Incerti, G. Zorzi, L. Verga, M. Morbin and M. Savoiaro, *Infantile neuroaxonal dystrophy: neuroradiological studies in 11 patients*. Neuroradiology, 1999. **41**(5): p. 376-80.
 32. Ferrer, I., I. Fabregues, M. Pineda, E. Fernandez Alvarez, V. Cusi and J. Vila, *Diagnosis of infantile neuro-axonal dystrophy by conjunctival biopsy*. Neuropediatrics, 1983. **14**(1): p. 53-5.
 33. Freeman, K., A. Gregory, A. Turner, P. Blasco, P. Hogarth and S. Hayflick, *Intellectual and adaptive behaviour functioning in pantothenate kinase-associated neurodegeneration*. J Intellect Disabil Res, 2007. **51**(Pt. 6): p. 417-26.
 34. Galvin, J.E., B. Giasson, H.I. Hurtig, V.M. Lee and J.Q. Trojanowski, *Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein neuropathology*. Am J Pathol, 2000. **157**(2): p. 361-8.
 35. Garcia, J., D. Han, H. Sancheti, L.P. Yap, N. Kaplowitz and E. Cadenas, *Regulation of mitochondrial glutathione redox status and protein glutathionylation by respiratory substrates*. J Biol Chem, 2010. **285**(51): p. 39646-54.
 36. Gelman, N., J.M. Gorell, P.B. Barker, R.M. Savage, E.M. Spickler, J.P. Windham and R.A. Knight, *MR imaging of human brain at 3.0 T: preliminary report on transverse relaxation rates and relation to estimated iron content*. Radiology, 1999. **210**(3): p. 759-67.
 37. Genecards, www.genecards.org ->C19orf12, . [aufgerufen am 19.09. 2011]
 38. Gerlach, M., K.L. Double, M.B. Youdim and P. Riederer, *Potential sources of increased iron in the substantia nigra of parkinsonian patients*. J Neural Transm Suppl, 2006(70): p. 133-42.
 39. Gerstein, A.S. (Hg.), *Molecular Biology Problem Solver: A Laboratory Guide*. 2001.
 40. GFP, <http://gfp.conncoll.edu/>. [aufgerufen am 30.05. 2012]
 41. Gregory, A. and S.J. Hayflick, *Neurodegeneration with brain iron accumulation*. Folia Neuropathol, 2005. **43**(4): p. 286-96.

42. Gregory, A. and S.J. Hayflick, *Genetics of neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2011. **11**(3): p. 254-61.
43. Gregory, A., B.J. Polster and S.J. Hayflick, *Clinical and genetic delineation of neurodegeneration with brain iron accumulation*. *J Med Genet*, 2009. **46**(2): p. 73-80.
44. Gregory, A., S.K. Westaway, I.E. Holm, P.T. Kotzbauer, P. Hogarth, S. Sonek, J.C. Coryell, T.M. Nguyen, N. Nardocci, G. Zorzi, D. Rodriguez, I. Desguerre, E. Bertini, A. Simonati, B. Levinson, C. Dias, C. Barbot, I. Carrilho, M. Santos, I. Malik, J. Gitschier and S.J. Hayflick, *Neurodegeneration associated with genetic defects in phospholipase A(2)*. *Neurology*, 2008. **71**(18): p. 1402-9.
45. Guimaraes, J. and J.V. Santos, *Generalized freezing in Hallervorden-Spatz syndrome: case report*. *Eur J Neurol*, 1999. **6**(4): p. 509-13.
46. Gutteridge, J.M. and G.J. Quinlan, *Antioxidant protection against organic and inorganic oxygen radicals by normal human plasma: the important primary role for iron-binding and iron-oxidising proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1156**(2): p. 144-50.
47. Hallervorden, J. and H. Spatz, *Eigenartige Erkrankung im extrapyramidalen System mit besonderer Beteiligung des Globus pallidus und der Substantia nigra: Ein Beitrag zu den Beziehungen zwischen diesen beiden Zentren*. *Z Ges Neurol Psychiat*, 1922. **79**: p. 254 –302.
48. Halliday, W., *The nosology of Hallervorden-spatz disease*. *J Neurol Sci*, 1995. **134 Suppl**: p. 84-91.
49. Hama, H., *Fatty acid 2-Hydroxylation in mammalian sphingolipid biology*. *Biochim Biophys Acta*, 2010. **1801**(4): p. 405-14.
50. Hansen, R.E., D. Roth and J.R. Winther, *Quantifying the global cellular thiol-disulfide status*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(2): p. 422-7.
51. Hardy, J., P. Lewis, T. Revesz, A. Lees and C. Paisan-Ruiz, *The genetics of Parkinson's syndromes: a critical review*. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. **19**(3): p. 254-65.
52. Harris, Z.L., Y. Takahashi, H. Miyajima, M. Serizawa, R.T. MacGillivray and J.D. Gitlin, *Aceruloplasminemia: molecular characterization of this disorder of iron metabolism*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(7): p. 2539-43.
53. Hartig, M.B., K. Hortnagel, B. Garavaglia, G. Zorzi, T. Kmiec, T. Klopstock, K. Rostasy, M. Svetel, V.S. Kostic, M. Schuelke, E. Botz, A. Weindl, I. Novakovic, N. Nardocci, H. Prokisch and T. Meitinger, *Genotypic and phenotypic spectrum of PANK2 mutations in patients with neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Ann Neurol*, 2006. **59**(2): p. 248-56.
54. Hartig, M.B., A. Iuso, T. Haack, T. Kmiec, E. Jurkiewicz, K. Heim, S. Roeber, V. Tarabin, S. Dusi, M. Krajewska-Walasek, S. Jozwiak, M. Hempel, J. Winkelmann, M. Elstner, K. Oexle, T. Klopstock, W. Mueller-Felber, T. Gasser, C. Trenkwalder, V. Tiranti, H. Kretschmar, G. Schmitz, T.M. Strom, T. Meitinger and H. Prokisch, *Absence of an orphan mitochondrial protein, c19orf12, causes a distinct clinical subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Am J Hum Genet*, 2011. **89**(4): p. 543-50.

55. Hayflick, S.J., M. Hartman, J. Coryell, J. Gitschier and H. Rowley, *Brain MRI in neurodegeneration with brain iron accumulation with and without PANK2 mutations*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(6): p. 1230-3.
56. Hayflick, S.J., J.M. Penzien, W. Michl, U.M. Sharif, N.P. Rosman and P.G. Wheeler, *Cranial MRI changes may precede symptoms in Hallervorden-Spatz syndrome*. Pediatr Neurol, 2001. **25**(2): p. 166-9.
57. Hayflick, S.J., S.K. Westaway, B. Levinson, B. Zhou, M.A. Johnson, K.H. Ching and J. Gitschier, *Genetic, clinical, and radiographic delineation of Hallervorden-Spatz syndrome*. N Engl J Med, 2003. **348**(1): p. 33-40.
58. Heimbach, A., *Identifizierung und Charakterisierung von ATP13A2-Varianten und ihre Bedeutung für neurodegenerative Erkrankungen*. Mathematisch-naturwissenschaftliche Doktorarbeit, Universität Köln, 2009.
59. Hermann, W., P. Günther, S. Hahn and A. Wagner, *Zerebrales MRT und evozierte Potenziale bei Morbus Wilson*. Der Neurologe, 2002. **73**: p. 349-354.
60. Hermey, G., Mahlke, Claudia, Schwake, Michael, Sommer, Tobias, *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. 2010.
61. Herold, G., *Innere Medizin*. 2009.
62. Hortnagel, K., N. Nardocci, G. Zorzi, B. Garavaglia, E. Botz, T. Meitinger and T. Klopstock, *Infantile neuroaxonal dystrophy and pantothenate-kinase-associated neurodegeneration: locus heterogeneity*. Neurology, 2004. **63**(5): p. 922-4.
63. Hortnagel, K., H. Prokisch and T. Meitinger, *An isoform of hPANK2, deficient in pantothenate kinase-associated neurodegeneration, localizes to mitochondria*. Hum Mol Genet, 2003. **12**(3): p. 321-7.
64. Invitrogen (Hg.), *pTrcHis and pTrcHis2 TOPO® TA Expression Kits (User Manual)*. Version J.
65. Invitrogen, www.invitrogen.com ->Protein Expression ->Overview. [aufgerufen am 11.08. 2012]
66. Johnson, M.A., Y.M. Kuo, S.K. Westaway, S.M. Parker, K.H. Ching, J. Gitschier and S.J. Hayflick, *Mitochondrial localization of human PANK2 and hypotheses of secondary iron accumulation in pantothenate kinase-associated neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2004. **1012**: p. 282-98.
67. Kaneko, K., K. Yoshida, K. Arima, S. Ohara, H. Miyajima, T. Kato, M. Ohta and S.I. Ikeda, *Astrocytic deformity and globular structures are characteristic of the brains of patients with aceruloplasminemia*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(12): p. 1069-77.
68. Koeppen, A.H. and A.C. Dickson, *Iron in the Hallervorden-Spatz syndrome*. Pediatr Neurol, 2001. **25**(2): p. 148-55.
69. Kotzbauer, P.T., A.C. Truax, J.Q. Trojanowski and V.M. Lee, *Altered neuronal mitochondrial coenzyme A synthesis in neurodegeneration with brain iron accumulation caused by abnormal processing, stability, and catalytic activity of mutant pantothenate kinase 2*. J Neurosci, 2005. **25**(3): p. 689-98.
70. Krueger, M.C., N. Boddaert, S.A. Schneider, H. Houlden, K.P. Bhatia, A. Gregory, J.C. Anderson, W.D. Rooney, P. Hogarth and S.J. Hayflick, *Neuroimaging*

- Features of Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation.* AJNR Am J Neuroradiol, 2011.
71. Kruer, M.C., M. Hiken, A. Gregory, A. Malandrini, D. Clark, P. Hogarth, M. Grafe, S.J. Hayflick and R.L. Woltjer, *Novel histopathologic findings in molecularly-confirmed pantothenate kinase-associated neurodegeneration.* Brain, 2011. **134**(Pt 4): p. 947-58.
 72. Kruer, M.C., C. Paisan-Ruiz, N. Boddaert, M.Y. Yoon, H. Hama, A. Gregory, A. Malandrini, R.L. Woltjer, A. Munnich, S. Gobin, B.J. Polster, S. Palmeri, S. Edvardson, J. Hardy, H. Houlden and S.J. Hayflick, *Defective FA2H leads to a novel form of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA).* Ann Neurol, 2010. **68**(5): p. 611-8.
 73. Kubota, A., A. Hida, Y. Ichikawa, Y. Momose, J. Goto, Y. Igeta, H. Hashida, K. Yoshida, S. Ikeda, I. Kanazawa and S. Tsuji, *A novel ferritin light chain gene mutation in a Japanese family with neuroferritinopathy: description of clinical features and implications for genotype-phenotype correlations.* Mov Disord, 2009. **24**(3): p. 441-5.
 74. Kuo, Y.M., J.L. Duncan, S.K. Westaway, H. Yang, G. Nune, E.Y. Xu, S.J. Hayflick and J. Gitschier, *Deficiency of pantothenate kinase 2 (Pank2) in mice leads to retinal degeneration and azoospermia.* Hum Mol Genet, 2005. **14**(1): p. 49-57.
 75. Kurian, M.A., A. McNeill, J.P. Lin and E.R. Maher, *Childhood disorders of neurodegeneration with brain iron accumulation (NBIA).* Dev Med Child Neurol, 2011. **53**(5): p. 394-404.
 76. Kurian, M.A., N.V. Morgan, L. MacPherson, K. Foster, D. Peake, R. Gupta, S.G. Philip, C. Hendriksz, J.E. Morton, H.M. Kingston, E.M. Rosser, E. Wassmer, P. Gissen and E.R. Maher, *Phenotypic spectrum of neurodegeneration associated with mutations in the PLA2G6 gene (PLAN).* Neurology, 2008. **70**(18): p. 1623-9.
 77. Laborjournal, www.biotech-europe.de/rubric/produkte/products_08/2008_12.lasso. [aufgerufen am 10.08. 2012]
 78. Larsson, P.K., H.E. Claesson and B.P. Kennedy, *Multiple splice variants of the human calcium-independent phospholipase A2 and their effect on enzyme activity.* J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 207-14.
 79. Leoni, V., L. Strittmatter, G. Zorzi, F. Zibordi, S. Dusi, B. Garavaglia, P. Venco, C. Caccia, A.L. Souza, A. Deik, C.B. Clish, M. Rimoldi, E. Ciusani, E. Bertini, N. Nardocci, V.K. Mootha and V. Tiranti, *Metabolic consequences of mitochondrial coenzyme A deficiency in patients with PANK2 mutations.* Mol Genet Metab, 2012. **105**(3): p. 463-71.
 80. Loeffler, G., Petrides, P., Heinrich, P., *Biochemie und Pathobiochemie.* 1975. 8. Auflage 2007. p.75-78.
 81. Logan, J.I., K.B. Harveyson, G.B. Wisdom, A.E. Hughes and G.P. Archbold, *Hereditary caeruloplasmin deficiency, dementia and diabetes mellitus.* QJM, 1994. **87**(11): p. 663-70.
 82. Lyoo, C.H., H. Prokisch, T. Meitinger, S.Y. Lee, H. Kim do and M.S. Lee, *Anticholinergic-responsive gait freezing in a patient with pantothenate kinase-associated neurodegeneration.* Mov Disord, 2008. **23**(2): p. 283-4.

83. Maciel, P., V.T. Cruz, M. Constante, I. Iniesta, M.C. Costa, S. Gallati, N. Sousa, J. Sequeiros, P. Coutinho and M.M. Santos, *Neuroferritinopathy: missense mutation in FTL causing early-onset bilateral pallidal involvement*. *Neurology*, 2005. **65**(4): p. 603-5.
84. Malandrini, A., T. Cavallaro, G.M. Fabrizi, G. Berti, R. Salvestroni, C. Salvadori and G.C. Guazzi, *Ultrastructure and immunoreactivity of dystrophic axons indicate a different pathogenesis of Hallervorden-Spatz disease and infantile neuroaxonal dystrophy*. *Virchows Arch*, 1995. **427**(4): p. 415-21.
85. Mancuso, M., G. Davidzon, R.M. Kurlan, R. Tawil, E. Bonilla, S. Di Mauro and J.M. Powers, *Hereditary ferritinopathy: a novel mutation, its cellular pathology, and pathogenetic insights*. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2005. **64**(4): p. 280-94.
86. McNeill, A., D. Birchall, S.J. Hayflick, A. Gregory, J.F. Schenk, E.A. Zimmerman, H. Shang, H. Miyajima and P.F. Chinnery, *T2* and FSE MRI distinguishes four subtypes of neurodegeneration with brain iron accumulation*. *Neurology*, 2008. **70**(18): p. 1614-9.
87. McNeill, A., M. Pandolfo, J. Kuhn, H. Shang and H. Miyajima, *The neurological presentation of ceruloplasmin gene mutations*. *Eur Neurol*, 2008. **60**(4): p. 200-5.
88. Metafratzi, Z., M.I. Argyropoulou, D.N. Kiortsis, C. Tsampoulas, N. Chaliassos and S.C. Efremidis, *T(2) relaxation rate of basal ganglia and cortex in patients with beta-thalassaemia major*. *Br J Radiol*, 2001. **74**(881): p. 407-10.
89. Miltenyi-Biotec, www.miltenyibiotec.com/mitochondria. [aufgerufen am 24.06.2013]
90. Miszkiel, K.A., M.N. Paley, I.D. Wilkinson, M.A. Hall-Craggs, R. Ordidge, B.E. Kendall, R.F. Miller and M.J. Harrison, *The measurement of R2, R2* and R2' in HIV-infected patients using the prime sequence as a measure of brain iron deposition*. *Magn Reson Imaging*, 1997. **15**(10): p. 1113-9.
91. Miyajima, H., *Aceruloplasminemia, an iron metabolic disorder*. *Neuropathology*, 2003. **23**(4): p. 345-50.
92. Miyajima, H., Y. Nishimura, K. Mizoguchi, M. Sakamoto, T. Shimizu and N. Honda, *Familial apoceruloplasmin deficiency associated with blepharospasm and retinal degeneration*. *Neurology*, 1987. **37**(5): p. 761-7.
93. Miyajima, H., Y. Takahashi and S. Kono, *Aceruloplasminemia, an inherited disorder of iron metabolism*. *Biometals*, 2003. **16**(1): p. 205-13.
94. Morgan, N.V., S.K. Westaway, J.E. Morton, A. Gregory, P. Gissen, S. Sonek, H. Cangul, J. Coryell, N. Canham, N. Nardocci, G. Zorzi, S. Pasha, D. Rodriguez, I. Desguerre, A. Mubaidin, E. Bertini, R.C. Trembath, A. Simonati, C. Schanen, C.A. Johnson, B. Levinson, C.G. Woods, B. Wilmot, P. Kramer, J. Gitschier, E.R. Maher and S.J. Hayflick, *PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron*. *Nat Genet*, 2006. **38**(7): p. 752-4.
95. Morita, H., S. Ikeda, K. Yamamoto, S. Morita, K. Yoshida, S. Nomoto, M. Kato and N. Yanagisawa, *Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family*. *Ann Neurol*, 1995. **37**(5): p. 646-56.

96. Morphy, M.A., J.A. Feldman and G. Kilburn, *Hallervorden-Spatz disease in a psychiatric setting*. J Clin Psychiatry, 1989. **50**(2): p. 66-8.
97. Mubaidin, A., E. Roberts, D. Hampshire, M. Dehyyat, A. Shurbaji, M. Mubaidien, A. Jamil, A. Al-Din, A. Kurdi and C.G. Woods, *Karak syndrome: a novel degenerative disorder of the basal ganglia and cerebellum*. J Med Genet, 2003. **40**(7): p. 543-6.
98. Mülhardt, C., *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*. 1999. 6. Auflage 2009, 6. Kapitel.
99. Najim al-Din, A.S., A. Wriekat, A. Mubaidin, M. Dasouki and M. Hiari, *Pallido-pyramidal degeneration, supranuclear upgaze paresis and dementia: Kufor-Rakeb syndrome*. Acta Neurol Scand, 1994. **89**(5): p. 347-52.
100. Nardocci, N., G. Zorzi, L. Farina, S. Binelli, W. Scaioli, C. Ciano, L. Verga, L. Angelini, M. Savoiaro and O. Bugiani, *Infantile neuroaxonal dystrophy: clinical spectrum and diagnostic criteria*. Neurology, 1999. **52**(7): p. 1472-8.
101. Neupert, W. and M. Brunner, *The protein import motor of mitochondria*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(8): p. 555-65.
102. Ohta, E., T. Nagasaka, K. Shindo, S. Toma, K. Nagasaka, K. Ohta and Z. Shiozawa, *Neuroferritinopathy in a Japanese family with a duplication in the ferritin light chain gene*. Neurology, 2008. **70**(16 Pt 2): p. 1493-4.
103. Oide, T., K. Yoshida, K. Kaneko, M. Ohta and K. Arima, *Iron overload and antioxidative role of perivascular astrocytes in aceruloplasminemia*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(2): p. 170-6.
104. OMIM, www.omim.org/entry/234200, /241080, /256600, /604290, /606159, /606693, /610217, /611026, /612953, /614298. [aufgerufen am 24.06. 2013]
105. Orrell, R.W., P.J. Amrolia, A. Heald, P.G. Cleland, J.S. Owen, J.A. Morgan-Hughes, A.E. Harding and C.D. Marsden, *Acanthocytosis, retinitis pigmentosa, and pallidal degeneration: a report of three patients, including the second reported case with hypoprebetalipoproteinemia (HARP syndrome)*. Neurology, 1995. **45**(3 Pt 1): p. 487-92.
106. Osaki, S., D.A. Johnson and E. Frieden, *The possible significance of the ferrous oxidase activity of ceruloplasmin in normal human serum*. J Biol Chem, 1966. **241**(12): p. 2746-51.
107. Paisan-Ruiz, C., K.P. Bhatia, A. Li, D. Hernandez, M. Davis, N.W. Wood, J. Hardy, H. Houlden, A. Singleton and S.A. Schneider, *Characterization of PLA2G6 as a locus for dystonia-parkinsonism*. Ann Neurol, 2009. **65**(1): p. 19-23.
108. Paisan-Ruiz, C., A. Li, S.A. Schneider, J.L. Holton, R. Johnson, D. Kidd, J. Chataway, K.P. Bhatia, A.J. Lees, J. Hardy, T. Revesz and H. Houlden, *Widespread Lewy body and tau accumulation in childhood and adult onset dystonia-parkinsonism cases with PLA2G6 mutations*. Neurobiol Aging, 2010.
109. Panteghini, C., G. Zorzi, P. Venco, S. Dusi, C. Reale, D. Brunetti, L. Chiapparini, F. Zibordi, B. Siegel, B. Garavaglia, A. Simonati, E. Bertini, N. Nardocci and V. Tiranti, *C19orf12 and FA2H mutations are rare in Italian patients with neurodegeneration with brain iron accumulation*. Semin Pediatr Neurol, 2012. **19**(2): p. 75-81.

110. Pellecchia, M.T., E.M. Valente, L. Cif, S. Salvi, A. Albanese, V. Scarano, U. Bonuccelli, A.R. Bentivoglio, A. D'Amico, C. Marelli, A. Di Giorgio, P. Coubes, P. Barone and B. Dallapiccola, *The diverse phenotype and genotype of pantothenate kinase-associated neurodegeneration*. Neurology, 2005. **64**(10): p. 1810-2.
111. Perry, T.L., M.G. Norman, V.W. Yong, S. Whiting, J.U. Crichton, S. Hansen and S.J. Kish, *Hallervorden-Spatz disease: cysteine accumulation and cysteine dioxygenase deficiency in the globus pallidus*. Ann Neurol, 1985. **18**(4): p. 482-9.
112. Pineda, www.pineda-abservice.de/Protein-Ak/ProtAkBeschreibung/protakbeschreibung.html. [aufgerufen am 29.09. 2011]
113. Qiagen (Hg.), *The QIAexpressionist, (Handbook)*. 5. Auflage.
114. Qiagen (Hg.), *Effectene^(R) Transfection Reagent Handbook*. 2002.
115. Ramirez, A., A. Heimbach, J. Grundemann, B. Stiller, D. Hampshire, L.P. Cid, I. Goebel, A.F. Mubaidin, A.L. Wriekat, J. Roeper, A. Al-Din, A.M. Hillmer, M. Karsak, B. Liss, C.G. Woods, M.I. Behrens and C. Kubisch, *Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase*. Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1184-91.
116. Refseq, www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/83636. [aufgerufen am 24.06. 2013]
117. Rehm, H., Letzel, T., *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*. 1996. 6. Auflage 2010, 5. Kapitel.
118. Riemer, J., N. Bulleid and J.M. Herrmann, *Disulfide formation in the ER and mitochondria: two solutions to a common process*. Science, 2009. **324**(5932): p. 1284-7.
119. Riemer, J., M. Fischer and J.M. Herrmann, *Oxidation-driven protein import into mitochondria: Insights and blind spots*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1808**(3): p. 981-9.
120. Saito, Y., M. Kawai, K. Inoue, R. Sasaki, H. Arai, E. Nanba, S. Kuzuhara, Y. Ihara, I. Kanazawa and S. Murayama, *Widespread expression of alpha-synuclein and tau immunoreactivity in Hallervorden-Spatz syndrome with protracted clinical course*. J Neurol Sci, 2000. **177**(1): p. 48-59.
121. Schneider, S.A., C. Paisan-Ruiz, N.P. Quinn, A.J. Lees, H. Houlden, J. Hardy and K.P. Bhatia, *ATP13A2 mutations (PARK9) cause neurodegeneration with brain iron accumulation*. Mov Disord, 2010. **25**(8): p. 979-84.
122. Seleznev, K., C. Zhao, X.H. Zhang, K. Song and Z.A. Ma, *Calcium-independent phospholipase A2 localizes in and protects mitochondria during apoptotic induction by staurosporine*. J Biol Chem, 2006. **281**(31): p. 22275-88.
123. Sethi, K.D., R.J. Adams, D.W. Loring and T. el Gammal, *Hallervorden-Spatz syndrome: clinical and magnetic resonance imaging correlations*. Ann Neurol, 1988. **24**(5): p. 692-4.
124. Shevell, M.I. and J. Peiffer, *Julius Hallervorden's wartime activities: implications for science under dictatorship*. Pediatr Neurol, 2001. **25**(2): p. 162-5.
125. Swaiman, K.F., *Hallervorden-Spatz syndrome and brain iron metabolism*. Arch. Neurol., 1991. **48**: p. 1285-1293.

126. Tanfani, G., M. Mascalchi, G.C. Dal Pozzo, N. Taverni, A. Saia and C. Trevisan, *MR imaging in a case of Hallervorden-Spatz disease*. J Comput Assist Tomogr, 1987. **11**(6): p. 1057-8.
127. Taylor, T.D., M. Litt, P. Kramer, M. Pandolfo, L. Angelini, N. Nardocci, S. Davis, M. Pineda, H. Hattori, P.J. Flett, M.R. Cilio, E. Bertini and S.J. Hayflick, *Homozygosity mapping of Hallervorden-Spatz syndrome to chromosome 20p12.3-p13*. Nat Genet, 1996. **14**(4): p. 479-81.
128. Terziyska, N., T. Lutz, C. Kozany, D. Mokranjac, N. Mesecke, W. Neupert, J.M. Herrmann and K. Hell, *Mia40, a novel factor for protein import into the intermembrane space of mitochondria is able to bind metal ions*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 179-84.
129. Thermo-Scientific, www.piercenet.com ->Protein Expression ->Overview of Protein Expression. 10.08.2012.
130. Thomas, M., S.J. Hayflick and J. Jankovic, *Clinical heterogeneity of neurodegeneration with brain iron accumulation (Hallervorden-Spatz syndrome) and pantothenate kinase-associated neurodegeneration*. Mov Disord, 2004. **19**(1): p. 36-42.
131. Treefam, www.treefam.org/ ->C19orf12. [aufgerufen am 13.08. 2012]
132. Tripathi, R.C., B.J. Tripathi, S.C. Bauserman and J.K. Park, *Clinicopathologic correlation and pathogenesis of ocular and central nervous system manifestations in Hallervorden-Spatz syndrome*. Acta Neuropathol., 1992. **83**: p. 113-119.
133. Uniprot, www.uniprot.org/uniprot/P00450. [aufgerufen am 18.09. 2011]
134. Universität Marburg-Biologie (Hg.), *Das lac-Operon von Escherichia coli als klassisches Beispiel für Genregulation*. 2005.
135. Vidal, R., B. Ghetti, M. Takao, C. Brefel-Courbon, E. Uro-Coste, B.S. Glazier, V. Siani, M.D. Benson, P. Calvas, L. Miravalle, O. Rascol and M.B. Delisle, *Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(4): p. 363-80.
136. Wakabayashi, K., T. Fukushima, R. Koide, Y. Horikawa, M. Hasegawa, Y. Watanabe, T. Noda, I. Eguchi, T. Morita, M. Yoshimoto, T. Iwatsubo and H. Takahashi, *Juvenile-onset generalized neuroaxonal dystrophy (Hallervorden-Spatz disease) with diffuse neurofibrillary and lewy body pathology*. Acta Neuropathol, 2000. **99**(3): p. 331-6.
137. Wills, A.J., G.V. Sawle, P.R. Guilbert and A.R. Curtis, *Palatal tremor and cognitive decline in neuroferritinopathy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **73**(1): p. 91-2.
138. Woodhouse, N.J. and N.A. Sakati, *A syndrome of hypogonadism, alopecia, diabetes mellitus, mental retardation, deafness, and ECG abnormalities*. J Med Genet, 1983. **20**(3): p. 216-9.
139. Wu, Z., C. Li, S. Lv and B. Zhou, *Pantothenate kinase-associated neurodegeneration: insights from a Drosophila model*. Hum Mol Genet, 2009. **18**(19): p. 3659-72.
140. Yang, F., S.L. Naylor, J.B. Lum, S. Cutshaw, J.L. McCombs, K.H. Naberhaus, J.R. McGill, G.S. Adrian, C.M. Moore, D.R. Barnett and et al., *Characterization*,

- mapping, and expression of the human ceruloplasmin gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(10): p. 3257-61.
141. Yoshino, H., H. Tomiyama, N. Tachibana, K. Ogaki, Y. Li, M. Funayama, T. Hashimoto, S. Takashima and N. Hattori, *Phenotypic spectrum of patients with PLA2G6 mutation and PARK14-linked parkinsonism.* Neurology, 2010. **75**(15): p. 1356-61.
142. Zhou, B., S.K. Westaway, B. Levinson, M.A. Johnson, J. Gitschier and S.J. Hayflick, *A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome.* Nat Genet, 2001. **28**(4): p. 345-349.

8 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Meitinger möchte ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit an seinem Lehrstuhl durchführen zu können herzlich danken.

Bei Herrn Dr. Holger Prokisch möchte ich mich für die Überlassung des interessanten Themas meiner Doktorarbeit und die Betreuung während des gesamten Verlaufs der Arbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Arcangela Iuso für die Einarbeitung im Labor, die stete Unterstützung mit wertvollen Tipps und der ständigen Hilfestellung bei Problemen jeder Art.

Anne Löschner und Rosa Hellinger danke ich für die grundlegende Einarbeitung und die allgemeine Hilfe im Labor, Frau Dr. Monika Hartig für wertvolle klinische Informationen.

Meinem damaligen Arbeitskreis möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gemeinschaftliche Unternehmungen danken.

9 Publikation

C. Panteghini, G. Zorzi, P. Venco, S. Dusi, C.Reale, D. Brunetti, L.Chiapparini, F. Zibordi, B. Siegel, B.Garavaglia, A. Simonati, E. Bertini, N. Nardocci, V. Tiranti *C19orf12 and FA2H mutations are rare in Italian patients with neurodegeneration with brain iron accumulation*. Semin Pediatr Neurol, 2012. 19(2): p. 75-81.

Anhang

1. Geräte und Software

Geräte/ Software	Firma
Allgemein	
Kühlschränke und Gefriertruhen (-25°C)	Liebherr Premium
Gefriertruhe -80°C	Heraeus, Thermo Scientific
Gefriertruhe -75°C	Kendro
Autoklav	Bioclav von Schütt
Bakterienkolben, diverse Größen	Schott
Rotator SB3	Stuart
Eismaschine	Scotsman AF30
Vakuum-Filtrationssystem, ultra pure H ₂ O	Millipore
Flaschen, diverse Größen	Schott
Neo-BlockI (Heizblock)	NeoLab
Duomax 1030	Heidolph
Magnetmixer	NeoLab
pH-Meter	Inolab pHLevel1 WTW
Pipetten	Gilson pipetman Einkanal (2µl; 20µl; 200µl; 1000µl), Gilson pipetman ultra 12 Multikanal (1-20µl; 20-300µl), Brand 8 Multikanal Pipette (0,5-10µl; 10-20µl)
Pipet-aid	Drummond Scientific
Cryo-Tank, Nr.0092	Messer
Heizthermomixer HTML 133	HLC-Haep Labor Consult
Waage BP2100, BP221S	Sartorius
Vortexer/Zentrifuge FVL-2400 CombiSpin	PeqLab
Zentrifuge 3K30	Sigma Laboratories Zentrifugen
Zentrifuge 4K15C	Sigma Laboratories Zentrifugen
Zentrifuge 6K15	Sigma Laboratories Zentrifugen
Zentrifuge Mikro20	Hettich Zentrifugen
Sicherheitswerkbank	BDK-Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Ultrazentrifuge TLS 55	Sigma Laboratories Zentrifugen

Konfokales Mikroskop TCS SP5, Objektiv x63	Leica
Scaffold Software	Core facility Proteomics, Helmholtz Zentrum München
Fibroblastenkultur und Bakterienkultur	
Bunzenbrenner (Fireboy plus)	IBS-Integra Biosciences
Inkubator(36°C)/Trockenschrank	Memmert
Schüttelinkubator	GFL
Inkubationsschüttler Multitron	Infors
Lichtmikroskop, DMIL	Leica
Neubauerzählkammer, Tiefe 0.100mm	Marienfield
Wasserbad	Polyscience
Zentrifuge Rotanta 46 RS	Hettich Zentrifugen
CO2 Incubator - MCO 17AIC	Sanyo
DNA-/Proteinkonzentrationsmessung	
Spektrophotometer, V-550	Jasco
Software Spectra Manager for Windows™	Jasco
ND-1000 Spektrophotometer Nanodrop®	Thermo Scientific Abgene
Software ND-1000, Version 3.5.2	Thermo Scientific Abgene
PCR	
MJ Research PTC-225 Thermal Cycler (96er, Tube system)	GMI
Primer design software – ExonPrimer	T.Strom, Helmholtz Zentrum München
Agarose-Gelelektrophorese	
Gelelektrophoresese Kammer	Bio-Rad Lab Equipment
Heizschrank für Agarosegel (60°C)	Memmert
E.A.S.Y. 440K Kamera	Herolab
Kämme und Gelwannen	Bio-Rad Lab Equipment
Mikrowelle	Siemens
Power supply unit - Power-Pac®	300Bio-Rad Lab Equipment
Software zu E.A.S.Y. 440K Kamera	Herolab
UVT-40M; UV-Licht	Herolab

Proteinisolierung, Antikörper-Reinigung, Isolierung der Zellkompartimente	
Homogenisator Potter S	B. Braun Biotech International
Potter S, 2ml	B. Braun Biotech International
Digital Sonifier®/ Ultraschallprozessor	Branson
SDS-Page, Westernblot und Detektion	
Blottingapparatur	Peqlab Biotechnologie GmbH
ECL Plus Western Blotting Detection System RPN2132	GE Healthcare
Elektrophorese-Kammer P8DS	Owl Seperation Systems Inc.
Röntgenentwicklungsmaschine Curix 60	AGFA

2. Produkte und Reagenzien

Produkte, Reagenzien, Medien-/Pufferbezeichnung	Ggf. genaue Beschreibung, Medien-/Pufferzusammensetzung, Produktnummer	Firma
Allgemeine Produkte		
Ampicillin	Nr.A9518	Sigma-Aldrich
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Nr.223506	Sigma-Aldrich
EDTA	Nr.E5391	Sigma-Aldrich
EGTA	Nr.E3889	Sigma-Aldrich
Einmal-Spritze Omnifix®	5ml, Nr.REF4616057V; 10ml, Nr.REF4617100V; 50ml, Nr.REF4616502F	Braun
Eppendorftubes	0.5ml, Nr.0030121.023; 1.5ml, Nr.0030120.086	Eppendorf
Essigsäure	Nr.1-00063-2500	Merck
Ethanol	Nr.1-00983-2500	Merck
Falcontubes	14ml, Nr.4-2059-3; 15ml, Nr.REF352096; 50ml, Nr.REF352070	BD Bioscience Becton Dickinson Labware
Glaspipetten/Serological pipettes Cellstar®	1ml, Nr.604181; 2ml, Nr.710180; 5ml, Nr.606180; 10ml, Nr.607180; 25ml, Nr.760180; 50ml, Nr.768180	Greiner Bio-one
Glycerol	Nr.1-09634-2500	Merck
Glycine	Nr.3908-3	Roth
Hydrogenchlorid (HCl)	Nr.1-04936-1000	Merck
Handschuhe	Größe S, M, L	Kimberly Clark/Kimtech Science Brand
Imidazol	Nr.56750	Sigma-Aldrich
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Nr.1-04873-1000	Merck

Allgemeine Produkte (Fortsetzung)		
Kaliumchlorid (KCL)	Nr. 1-04936-1000	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Nr. M8266	Sigma-Aldrich
Methanol	Nr. 1-06009-2500	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Nr. 1-06404-1000	Merck
Einmal-Kanülen, Sterican®	21Gx2", Nr.REF4665503; 27G1¼, Nr.305136	Braun; Becton Dickinson
Natriumcarbonat (NaCO ₃ .)	Nr.6329	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Nr.1-06580-1000	Merck
Pasteurpipetten	Nr.747755	Brand
PBS	Gibco - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Nr. 14190	Invitrogen
PMSF	Nr.78830	Sigma-Aldrich
Pipettenspitzen	D10, Nr.REF167101; DL10, Nr.REF167102; D200, Nr.REF167103; D1000, Nr.REF167104	Gilson Diamond
Pursept-AXpress	Nr.41789	Merz
SDS-Pellets	Nr.CN30.2	Roth
Saccharose	Nr.1.07687.1000	Roth
Sucrose	Nr. 1-07687-1000	Merck
Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)	Nr. 1-08382-2500	Merck
Tris-HCL 1M, pH=7.8	Nr.MB-004	Rockland
Tris-HCL 1M, pH=8.0	Nr.MB-005	Rockland
Triton X-100	Nr. 1-08603-1000	Merck
Trizma base	Nr.T1503	Sigma-Aldrich
Ultra pure H ₂ O	Vakuum-Filtrationssystem	Millipore

Fibroblastenkultur		
Cryotubes	1.8ml, Nr.377267	Nunc
Deckgläser	20x20mm, Nr.H873	Roth
Einfriermedium	Fibroblastenmedium Dimethylsulfoxid, Nr.D5879, 10%	s.u. Sigma-Aldrich
Fibroblastenmedium	DMEM (Gibco - Dulbecco's Modified Eagle Medium) - High glucose, 1% Glutamin, Nr. 41966, 500ml Gibco-Fetal Bovine Serum, Nr.10270, 10% Gibco-Penicillin, Streptomycin, Nr.15070-063, 1%	Invitrogen Invitrogen Invitrogen
GFP-gekoppelter C19orf12 Vektor	GFP-tagged C19orf12, transcript variant 1, Nr. RG216851	Origene
Kontrollfibroblasten	NHDF-Neo, Nr.CC-2509	Lonza
Objektträger	Nr.2407/1	Glaswarenfabrik K.Hecht KG
Patientenfibroblasten	Fibroblasten mit Mutation in C19orf12:C.199insG, homozygot,	aus Polen von Dr. T.Kmiecz
Transfektionskit	Effectene® Transfection Reagent, Nr.301425 (enthält TE-Puffer, DNA-Kondensierungspuffer, Enhancer, Transfektionsreagenz)	Qiagen
Trypsin	Gibco - 0,05%-Trypsin-EDTA, Nr.25300	Invitrogen
Zellkulturplatten	TC Dish 60x15, Nr.150288	Nunc
	TC Dish 92x17, Nr.150350	Nunc
	TC Dish 140x20, Nr.168381	Nunc
	Falcon 6-well Platten, Nr.REF353046	Becton Dickinson
	Glass Bottom Culture Dishes, Nr.P35GGC-1.5-14-C	MatTek
Bakterienkultur		
Agar-Agar, Kobe I	Agar-Agar für LB-Medium, Nr.5210.4	Roth
Ampicillin	Nr.A9518	Sigma-Aldrich
IPTG	Nr.15502	Sigma-Aldrich
LB-Medium	10g Bacto-Trypton (Pepton), Nr.8952.4	Roth
	5g Bacto-Yeast Extrakt, Nr.2363.4	Roth
	10g NaCl	Merck
	Mit ultra pure H ₂ O auf 1l auffüllen	s.o. (Allgemeine Produkte)

Bakterienkultur (Fortsetzung)	
LB-Plattenmedium	1l LB-Medium Agar-Agar, Kobel, Nr.5210.4 1ml Ampicillin Nr.8177CSR40H
Impföse	s.o. Roth Roth Copan
DNA/RNA-Isolierung, cDNA-Synthese	
cDNA-Synthesekit	First Strand cDNA Synthesis Kit, Nr. K1611 (enthält Oligo-dT ¹⁸ -Primer, M-MuLV, RNase freies H ₂ O, cDNA-Reaktionspuffer, RiboLock ^{RM} RNase Inhibitor)
DNA/RNA-Extraktionskit	AIIPrep RNA/ DNA Mini Kit, Nr.80204 (enthält Puffer RL T, AW 1, AW2, EB, RW1, RPE, RNase freies H ₂ O, QIAshredder-spin-Säule, AIIPrepDNA-spin-Säule, RNeasy-spin-Säule)
	Fermentas Qiagen
PCR	
PCR Platten	ABgene® PCR Plates, Nr.AB-0600
DNA Ladder, 1kb	GeneRuler 1kb DNA Ladder, Nr.SM1163
DNA Ladder, niedrige Molekülgröße	GeneRuler DNA Ladder, low range, Nr.SM1191
PCR-Kit	Thermo-Start Taq DNA -Polymerase, 10x Puffer, 25mM MgCl ₂ , Nr. AB-0908/B, Konz. 5 U/µl
Klebefolien für PCR-Platten	Adhesive PCR Film, Nr.AB-0558
Primer, vorwärts und rückwärts	Bestellte Primer, Konz. 20ng/µl
	Thermo Scientific Metabion
Agarose-Gelelektrophorese	
Agarosegel, 1%	1g Biozym DNA Agarose für Gelelektrophorese, Nr.870055 100ml 1xTBE-Puffer
Ethidiumbromid	Nr.7870.1, Konz. 10mg/ml
Ficolllösung, 15%	1.5g Ficoll™ PM 400, Nr.17-0300-10 Spatelspitze Orange G (Sodium Salt), Nr.O3756 10ml TE-Puffer
	Biozym s. u. (TBE-Puffer, 10x) Roth GE Healthcare Sigma-Aldrich s.u. (TE-Puffer, pH 7.4)

Agarose-Gelelektrophorese (Fortsetzung)		
TBE-Puffer, 10x	102g Tris	Merck
	55g EDTA	Sigma-Aldrich
	7g Borsäure, Nr.B6768	Roth
	Mit ultra pure H ₂ O auf 2L auffüllen	s.o. (Allgemeine Produkte)
TE-Puffer, pH 7.4	Tris, 10mM	Merck
	EDTA, 1mM	Sigma-Aldrich
Klonierung		
E.coli-Stämme	E.coli TOP10 One Shot®, Nr. C4040-10	Invitrogen
	E.coli BL21, Rosetta, Rosetta pLysS, Tuner pLysS	Helmholtz Zentrum München, Protein expression and purification facility (pepf)
His-Klonierungsvektor-Kit	pTrcHis TOPO2® TA Expression Kit, Nr.K4410-01 (enthält Vektor, E.coli TOP10 One Shot®)	Invitrogen
S.O.C.-Medium	Nr. 15544-034	Invitrogen
Proteinisolierung und -reinigung		
Elutionspuffer, pH=8.0	Tris-HCl, 50mM	Rockland
	NaCl, 0.3M	Merck
	Imidazol, 250mM	Sigma-Aldrich
Lyse-Puffer-1, pH=8.0	Tris-HCl, 50mM	Rockland
	NaCl, 0.3M	Merck
	Triton X-100, 2%	Merck
	PMSF, 1mM	Sigma-Aldrich
Ni-NTA Agarose beads	Nr. 1018244	Qiagen
Waschpuffer, pH=8.0	Tris-HCL, 50mM	Rockland
	NaCl, 0.3M	Merck
Proteinisolierung/ -reinigungs-Anleitung	http://wolfson.huji.ac.il/purification/Purification_Protocols.html	Wolfson Centre for Applied Structural Biology

Protein-Konzentrationsmessung		
Bradford	Bio-Rad Protein Assay, Nr. 500-0006	Bio-Rad Laboratories GmbH
Bovines Serumalbumin	Nr. K41-001	PAA Laboratories GmbH
Einmalküvetten	Nr. 759015	Brand
Antikörper-Affinitätsreinigung		
Azetat	Nr. 3863	Sigma-Aldrich
Ethanolamin	Nr. 411000	Sigma-Aldrich
Kopplungspuffer	NaHCO ₃ , 0.1M, pH=8.3 NaCl, 0.5M	Merck Merck
Na-Phosphat (Na ₃ PO ₄)	Nr. 342483	Sigma-Aldrich
Natriumzitratlösung	Nr. 71497	Sigma-Aldrich
PD-Säule	Nr. 17-0851-01	GE Healthcare
Chromatographiesäulen	PolyPrep Chromatographic Columns, Nr. 731-1550	Bio-Rad
O-Phe	Tabletten, 1M	Roche
Leupeptin	Nr. 25001327	HE Healthcare
CNBr-aktivierte Sepharose 4B beads	Nr. 17-0430-01	GE Healthcare
SDS-Page		
Coomassie-Färbelösung	Comassie (R) Brilliant Blue R-250, Nr. 87215, 0.25% Methanol: Essigsäure:H ₂ O = 45:10:45	Fluka s.o. (Allgemeine Produkte)
DL-Dithiothreitol (DTT)	Nr. D0632	Sigma-Aldrich
Entfärbelösung	Methanol:Essigsäure:H ₂ O = 50:10:40	s.o. (Allgemeine Produkte)
Proteingrößenmarker	PageRuler Prestained Protein Ladder, Nr. SM0441	Fermentas

SDS-Page (Fortsetzung)		
Lämmli-Puffer, 4 x:	SDS-Pellets, 8%	Roth
	Glycerol, 40 %	Merck
	Bromophenol blue, Nr.18040, 0.008 %	Fluka
	Tris HCl, 250 mM, pH=6.8	Rockland
	β – Mercaptoethanol, Nr.M6250, 20 %	Sigma-Aldrich
	3.03g Trizma base	Sigma-Aldrich
Laufpuffer, pH=8.9	14.41g Glycin	Roth
	1g SDS	Roth
	Mit ultra pure H ₂ O bis auf 1l auffüllen	s.o. (Allgemeine Produkte)
Polyacrylamidgele	PAGEr Precast gels (10-20%), 16 Well, 10x10cm, Nr.59518	Lonza
	Westernblot	
Anti-Calnexin-Antikörper	Nr.C7617 (Maus)	Sigma-Aldrich
Anti-C19orf12-Antikörper	(Kanninchen)	Pineda
Anti-Kaninchen-Antikörper	Nr.RPN4301	GE Healthcare
Anti-Maus-Antikörper	Nr.RPN4201	GE Healthcare
Anti-Porin-Antikörper	Nr.MSA-03 (Maus)	Mito Sciences
Blottingpapiere	Hybond™ Blotting Paper, Nr.RPN6101M	GE Healthcare
	Hybond™ -P, Nr.RPN303F	GE Healthcare
	Hybond™-ECL™ Nitrocellulose membrane, Nr.RPN78D	GE Healthcare
ECL-Chemilumineszenzfilm	Hyperfilm™ ECL High performance chemiluminescence film, Nr.92645	GE Healthcare
ECL-Detektionssystem	ECL Plus Western Blotting Detection System, Nr.RPN2132	GE Healthcare
Milch, 5%	5g Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk, Nr.170-6404	BioRad Laboratories
	100ml T-TBS	s.u.
Ponceau-Färbelösung	ATX Ponceau S red staining solution, Nr.0-9276, 0.1%	Fluka
	Essigsäure, 5%	Merck

Westernblot (Fortsetzung)	
Transfer-Puffer	3.03g Trizma-base 14.4g Glycine 200ml Methanol Mit ultra pure H ₂ O auf 1l auffüllen
T-TBS, pH=7.6	2.42g Trizma-base 8g NaCl 1ml Tween TM 20, Nr.P7949 Mit ultra pure H ₂ O auf 1l auffüllen
Isolierung von Zellorganellen	
Kit zur Isolierung von Mitochondrien mittels Anti-TOM22-Antikörper	Mitochondria Isolation Kit human, Nr.130-094-532 (enthält Anti-TOM22 Mikrobeads, MACS-Separator, Lysepuffer-2, Trennungspuffer, Aufbewahrungspuffer)
Puffer-1, pH=7.4	Saccharose, Konz. 300mM EGTA, Konz. 1mM MOPS, Nr.M9381, Konz. 20mM
Immunzytochemie	
Anti-Kaninchen-Alexa Fluor 568 – Antikörper	Nr.A11011 Invitrogen
Anti-mtSSBP-Antikörper	Dr.Zeviani, Italien
DAPI	ProLong® Gold antifade reagent with 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI), Nr.36931 Invitrogen
Igepal Ca-630 (NP-40)	Nr.13021 Sigma-Aldrich
Formaldehyd 37%	Nr.1-04002-10001 Merck