

## 1. Summary

Hereditary Spastic Paraplegias (HSPs) are genetically diverse and clinically characterized by lower limb weakness and spasticity. Several point mutations of human strumpellin (Str), a member of the hetero-pentameric WASH (Wiskott–Aldrich Syndrome Protein and SCAR Homologue) complex, have been shown to cause HSP number 8 (SPG8). The other four core members of the WASH complex are WASH (also known as WASHC1), FAM21 (WASHC2, KIAA0592), CCDC53 (WASHC3, Coiled coil domain containing 53) and SWIP (WASHC4, strumpellin and WASH-interacting protein KIAA1033). I set out to investigate the functions of strumpellin and the Str<sup>N471D</sup> mutation in *Dictyostelium discoideum* and mouse.

For the analysis of mouse strumpellin, I generated rabbit polyclonal antibodies against aa 254 – 343 of strumpellin and used wild-type, previously generated heterozygous Str knock-out as well as heterozygous and homozygous knock-in mice expressing Str<sup>N471D</sup> and heterozygous knock-in mice expressing VCP<sup>R155C</sup>. Real-time PCR with brain, heart and skeletal muscle cDNA from these mouse strains revealed no significant transcriptional changes for the other WASH complex subunits and the strumpellin binding protein VCP. Western blot analyses with these tissues showed that VCP protein stability was affected in Str<sup>N471D</sup> knock-in mice. The analyses also revealed tissue-specific expression of strumpellin isoforms in mouse and human.

In *D. discoideum* I analysed Str<sup>-</sup> cells and ectopically expressed Str<sup>WT</sup>-GFP or Str<sup>N471D</sup>-GFP in Str<sup>-</sup> and AX2 wild-type cells. Expression of both proteins in AX2 apparently caused a defect in cell division as I observed a strong increase of cells with three or more nuclei. Real-time PCR analyses revealed no transcriptional changes in the other WASH complex subunits in Str<sup>-</sup> cells, but quantitative Western blots showed a two-fold decrease in SWIP. GFP-trap experiments in conjunction with mass-spectrometric analysis revealed many previously known as well as new strumpellin interacting proteins and also proteins that did no longer bind to Str<sup>N471D</sup>. On the cellular level, Str<sup>-</sup> cells displayed defects in cell growth, phagocytosis, macropinocytosis, exocytosis and lysosomal functions. Expression of Str<sup>WT</sup>-GFP in Str<sup>-</sup> cells rescued all of the observed defects, while expression of Str<sup>N471D</sup>-GFP could only rescue some of the defects, indicating the fundamental role of the Str N471 residue for maintaining lysosome morphology and dynamics. The results underscore a key role

for the WASH complex and its core subunit strumpellin in the endo-lysosomal system and highlight the fundamental importance of the Str N471 residue. The data indicate that the N471D mutation causes a partial loss of strumpellin function in the endo-lysosomal system and thus, provide a basis for a better understanding of the molecular mechanism of SPG8.

## 2. Zusammenfassung

Erbliche spastische Paraplegien (HSPs) sind genetisch vielfältig und klinisch durch Spastik sowie eine Schwäche der unteren Extremitäten charakterisiert. Es wurde gezeigt, dass mehrere Punktmutationen von menschlichem Strumpellin (Str), einem Mitglied des hetero-pentameren WASH („Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein and SCAR Homologue“) Komplexes, HSP Nummer 8 (SPG8) verursachen. Die anderen vier Hauptproteine des WASH-Komplexes sind WASH (oder auch WASHC1), FAM21 (WASHC2, KIAA0592), CCDC53 (WASHC3, „Coiled Coil Domain Containing 53“) und SWIP (WASHC4, Strumpellin und WASH interagierendes Protein KIAA1033). Mein Ziel war es, die Funktionen von Strumpellin und der Str<sup>N417D</sup>-Mutation in *Dictyostelium discoideum* und Mäusen zu untersuchen.

Für die Analyse von Strumpellin in der Maus habe ich polyklonale Kaninchenantikörper gegen die Str Aminosäuren 254-343 generiert und bereits vorhandene heterozygote Str knock-out und heterozygote und homozygote Str<sup>N417D</sup> knock-in-Mäuse, sowie heterozygote VCP<sup>R155C</sup> knock-in Mäuse untersucht. Eine Echtzeit PCR mit cDNA dieser Mausstämmen aus Hirn, Herz und Skelettmuskel zeigte keine signifikanten transkriptionellen Änderungen für die anderen WASH Komplex Untereinheiten und das Str Bindeprotein VCP. Western Blot Analysen mit diesen Geweben zeigten, dass die Proteinstabilität von VCP in Str<sup>N471D</sup> knock-in Mäusen beeinträchtigt war. Die Analysen ergaben weiterhin eine gewebespezifische Expression von Str Isoformen in Maus und Mensch.

In *D. discoideum* analysierte ich Str<sup>-</sup> Zellen und exprimierte Str<sup>WT</sup>-GFP oder Str<sup>N471D</sup>-GFP ektopisch in Str<sup>-</sup> und in AX2 Wildtyp Zellen. Die Expression beider Proteine in AX2 Zellen führte offensichtlich zu einem Zellteilungsdefekt, da ich einen starken Anstieg von Zellen mit drei oder mehr Kernen beobachten konnte. Echtzeit PCR Analysen zeigten keine transkriptionellen Änderungen der anderen WASH Komplex Untereinheiten in Str<sup>-</sup>-Zellen. Auf Proteinebene fand ich jedoch in quantitativen Western Blots eine Halbierung in SWIP. In „GFP-trap“ Experimenten in Verbindung mit massenspektrometrischer Analyse identifizierte ich viele bereits bekannte, sowie neue, mit Str interagierende Proteine und darüber hinaus Proteine, die nicht mit Str<sup>N471D</sup> immunpräzipitiert wurden. Auf zellulärer Ebene zeigten Str<sup>-</sup> Zellen Defekte im Zellwachstum, in der Phagozytose, Makropinozytose, Exozytose und in lysosomalen

Funktionen. Die Expression von Str<sup>WT</sup>-GFP in Str<sup>-</sup> Zellen heilte alle beobachteten Defekte, während die Expression von Str<sup>N471D</sup>-GFP nur einige der beobachteten Defekte heilen konnte, was auf eine grundlegende Bedeutung von Str-N471 für die Morphologie und Dynamik der Lysosomen hindeutet. Meine Ergebnisse unterstreichen die Schlüsselrolle des WASH-Komplexes und seiner Proteinuntereinheit Str im endo-lysosomalen System, sowie die fundamentale Bedeutung von Str-N471. Meine Daten weisen darauf hin, dass die N471D Mutation einen teilweisen Verlust der Funktion von Str im endo-lysosomalen System verursacht und bilden damit eine Grundlage für ein besseres Verständnis des molekularen Mechanismus von SPG8.