Die Cul-4-Hemmung rettet den Spastinspiegel und reduziert Defekte in Modellen der erblichen spastischen Querschnittlähmung

Francesca Sardina,1,† Claudia Carsetti,1,2,† Ludovica Giorgini,1 Gaia Fattorini,1,2 Gianluca Cestra1,2,3,‡ und Cinzia Rinaldo1,‡

†,‡**Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.**

Abstrakt

Hereditäre spastische Paraplegien (HSPs) sind degenerative Motoneuronerkrankungen, die durch fortschreitende Spastik und Schwäche der unteren Gliedmaßen gekennzeichnet sind. Die häufigste Form der HSP ist auf die Haploinsuffizienz des SPG4-Gens zurückzuführen. SPG4 kodiert für das Mikrotubuli-durchtrennende Enzym Spastin. Obwohl es keine Heilung für SPG4-HSP gibt, entwickeln sich Strategien zur Induktion einer Spastin-Erholung als vielversprechende therapeutische Ansätze. Der Spastinproteinspiegel wird durch Polyubiquitinierung und proteasomalen vermittelten Abbau in einer neddylierungsabhängigen Weise reguliert. Die molekularen Akteure, die an dieser Regulierung beteiligt sind, sind jedoch unbekannt.

In dieser Arbeit zeigen wir, dass der Cullin-4-Ring E3 Ubiquitin-Ligase-Komplex (CRL4) die Spastinstabilität reguliert. Die Hemmung von CRL4 erhöht den Spastinspiegel, indem sie seine Polyubiquitinierung und den anschließenden Abbau in Spastin-kompetenten und patienteneigenen SPG4-haploinsuffizienten Zellen verhindert. Um die Rolle des CRL4-Komplexes bei der Spastinregulation in vivo zu evaluieren, haben wir ein *Drosophila melanogaster-Modell* der SPG4-Haploinsuffizienz entwickelt, das Veränderungen der Synapsenmorphologie und der lokomotorischen Aktivität zeigt, die die bei Patienten beobachteten phänotypischen Defekte rekapitulieren. Die Herunterregulierung des CRL4-Komplexes, der in Drosophila hochkonserviert ist, rettet den Spastinspiegel und die phänotypischen Defekte, die bei Fliegen beobachtet werden. Als Proof-of-Concept möglicher pharmakologischer Behandlungen zeigen wir eine Wiederherstellung des Spastinspiegels und eine Verbesserung der SPG4-HSP-assoziierten Defekte sowohl im Fliegenmodell als auch in patienteneigenen Zellen durch chemische Inaktivierung des CRL4-Komplexes mit NSC1892.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass CRL4 zur Stabilitätsregulation von Spastin beiträgt und dass es möglich ist, eine Spastin-Erholung und -Rettung von SPG4-HSP-Defekten zu induzieren, indem der CRL4-vermittelte Spastinabbau blockiert wird.

© Der/die Autor(en) 2024. Herausgegeben von Oxford University Press im Auftrag der Garanten des Gehirns. Dies ist eine offene
Zugang zu Artikeln, die unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution License vertrieben werden (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), die die uneingeschränkte Weiterverwendung, Verbreitung und Vervielfältigung in
jedes Medium, sofern das Originalwerk ordnungsgemäß zitiert wird.

Autoren-Affiliationen:

1 Institut für Molekularbiologie und Pathologie (IBPM), Nationaler Forschungsrat (CNR), c/o Universität Rom Sapienza, 00185 Rom, Italien

2 Universität Rom Sapienza, Fakultät für Biologie und Biotechnologie,00185, Rom, Italien 3 Fondazione Santa Lucia IRCCS, c/o CERC, 00179, Rom, Italien

Korrespondenz an: Cinzia Rinaldo

IBPM-CNR, 00185 Rom, Italien

E-Mail: cinzia.rinaldo@uniroma1.it

Laufender Titel: Cul-4-Hemmung rettet HSP-Defekte

Schlüsselwörter: Spastin; hereditäre spastische Querschnittslähmung; Polyubiquitinierung; CRL4; Neurodegeneratives Modell von Drosophila

Abkürzungen: Antikörper (Ab); Antisense-Oligonukleotid (ASO); beliebige Einheit (a.u.); Rinderserumalbumin (BSA); Bruchpilot (BRP); cullin (Cul); Cullin-assoziiertes NEDD8-dissoziiertes 1 (CAND1); Cullin-Ring E3 Ubiquitin-Ligasen (CRLs); Cycloheximid (CHX); DDB1-Cul4-assoziierte Faktoren (DCAFs); Dimethylsulfoxid (DMSO); Abstand zwischen Zell- und Kernschwerpunkten (DCNC); dominant-negativ (DN); fötales Kälberserum (FBS); Glas-Mehrfachreporter (GMR); HA-markiertes Ubiquitin (Ub-HA); Hereditäre spastische Querschnittslähmung (HSP); Meerrettichperoxidase (HRP); Stunde (h); Immunfluoreszenz (IF);

Immunpräzipitation (IP); Kilodalton (kDa); neuromuskuläre Verbindung (NMJ); lymphoblastoide Zelllinien (LCLs); Mikrotubuli (MT); MT-assoziiertes Protein 1 (MAP1); Molekulargewicht (MW), reverse Transkriptase (RT); RNA-Interferenz (RNAi); Raumtemperatur (RT); kurze Interferenz (siRNA); Standardabweichung (SD); Gesamtzellextrakt (TCE); Westlicher Blot (WB); Wiener Drosophila-Forschungszentrum (VDRC).

Einleitung

HSPs sind neurodegenerative Erkrankungen, die durch eine fortschreitende Spastik der unteren Extremitäten aufgrund einer axonalen Degeneration der kortikospinalen motorischen Bahnen gekennzeichnet sind [1,2]. Der SPG-Typ 4 (SPG4, OMIM #182601) ist die häufigste Form und macht 40-60% der autosomal-dominanten und 20% der sporadischen HSPs aus. SPG4-HSP wird durch heterozygote Loss-of-Function-Mutationen im SPG4-Gen verursacht, das für Spastin kodiert [3-5]. Spastin ist ein Enzym, das Mikrotubuli (MT) durchtrennt, das den Umbau und die Dynamik von MT reguliert [5-7] und die Zytokinese und den Membrantransport kontrolliert, mit relevanten Auswirkungen auf den axonalen Transport[6-9]. Es wurden mehr als 250 Mutationen des SPG4-Gens beschrieben, darunter Missense-Mutationen (Clusterbildung hauptsächlich in der katalytischen Domäne) und Trunkierungsmutationen (Frameshift, Nonsense und Insertionen/Deletionen), die häufig mit reduzierten Spastin-Proteinspiegeln als Folge des mRNA-Nonsense-vermittelten Zerfalls in Verbindung gebracht werden. Daher wird angenommen, dass SPG4-HSP hauptsächlich auf eine Spastin-Haploinsuffizienz und eine reduzierte MT-Trennaktivität zurückzuführen ist [10-13]; andere Mechanismen, wie z. B. dominante negative Effekte und Gain-of-Toxic-Funktion, scheinen nur für eine Subpopulation von Patienten potenziell relevant zu sein[14,15]. Humanes Spastin hat zwei Hauptisoformen, M1 und M87, die von unterschiedlichen Translationsstartstellen auf derselben mRNA kodiert werden, und beide Isoformen können Exon 4 überspringen[16]. M87 ist die am häufigsten vorkommende ubiquitäre Variante, während M1 zwar in vielen Geweben vorhanden ist, aber hauptsächlich in neuronalen Geweben angereichert ist. Das Vorhandensein verschiedener Spastin-Proteinvarianten wurde bei Wirbeltieren und Wirbellosen berichtet und ist in *Drosophila melanogaster konserviert17*. Es wurde angenommen, dass Veränderungen in der Dosierung von Spastin für die Entwicklung der Krankheit entscheidend sind[12]. Eine Rettung von Neuritendefekten durch die Gendosis wurde in Neuronen berichtet, die aus induzierten pluripotenten Stammzellen

von Patienten mit Nonsense-Mutationen differenziert wurden[18]. In diesen Neuronen stellt die lentivirale Expression der M1- oder M87-Isoformen den paraphysiologischen Spastinspiegel wieder her und reduziert pathologische Defekte[18]. Daher kristallisieren sich Spastin-erhöhende Strategien als vielversprechende Therapieansätze heraus. Es konnte gezeigt werden, dass die Spastinstabilität durch das Ubiquitin-Proteasom-System in einer neddylierungsabhängigen Weise reguliert wird[19,20]. Die Neddylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die die kovalente Konjugation eines Ubiquitin-ähnlichen Peptids, NEDD8, mit Zielproteinen beinhaltet. Diese Modifikation reguliert mehrere zelluläre Prozesse, einschließlich des Ubiquitin-Proteasom-Systems, indem sie die Stabilität, Konformation, Aktivität und Bindungsaffinität ihrer Ziele beeinflusst [21-24]. Die Hemmung der Neddylierung induziert eine Spastin-Regeneration in Spastin-defizienten Zellen, in primären Neuronen von Mäusen mit heterozygoter SPG4-HSP-Mutation und in lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) von Patienten mit verschiedenen haploinsuffizienten SPG4-Mutationen[19,25]. Funktionell führt die durch Hemmung der Neddylierung induzierte Spastin-Regeneration zur Rettung von Neuritendefekten in neuronalen Spastin-RNAi-Zellmodellen[19] und MT-Zytoskelettdefekten in LCLs von SPG4-HSP-Patienten[25], was Hinweise darauf zeigt, dass die Blockierung der Spastin-Polyubiquitinierung/-abbau eine Strategie zur Entwicklung von Spastin-erhöhenden Therapieansätzen ist. Die Neddylierungshemmung blockiert jedoch den Abbau einer Vielzahl von Proteinen neben Spastin. Insbesondere verhindert eine breite Hemmung der Neddylierung die Assemblierung und Aktivität der großen Klasse von Ring-E3-Ubiquitin-Ligasen mit mehreren Untereinheiten, die als Cullin-Ring E3-Ubiquitin-Ligasen (CRLs)-Komplexe bekannt sind und den Abbau von etwa 20% der Proteasom-regulierten Proteine [regulieren 23,24].

Um eine spezifischere Strategie zur Blockierung des Spastinabbaus zu identifizieren und deren Auswirkungen *in vivo in geeigneten* Tiermodellen zu bewerten, untersuchten wir die molekularen Akteure, die an der neddylierungsabhängigen Regulation von Spastin beteiligt sind, und testeten sie in *Drosophila melanogaster*. Die Hauptsubstrate der Neddylierung sind die Cullin-Proteine, die molekularen Gerüste der CRLs. Ein typisches CRL besteht aus vier Untereinheiten: einem Cullin (ein Familienprotein mit acht Mitgliedern, Cul-1, 2, 3, 4a, 4b, 5, 7 oder 9), einem Ringfingerprotein (Roc1 oder Roc2) für die katalytische Aktivität, einem Cul-spezifischen Proteinadapter und einem aus einer Vielzahl verschiedener Rezeptoren für die Substraterkennung. Verschiedene Unterklassen von CRLs (z. B. CRL1, CRL2...) können je nach Art des verwendeten Cullin-Elements zusammengesetzt werden. Jede CRL verwendet einen einzigartigen Satz von

Substratrezeptoren, die die Substratspezifität eines bestimmten Komplexes bestimmen. Die Cullin-Neddylierung ist eine wichtige posttranslationale Modifikation, die die Assemblierung von CRLs auslöst und deren E3-Ligaseaktivität aktiviert, wodurch die Polyubiquitinierung von Substraten gefördert[wird 23,24].

Hier identifizieren wir CRL4 als einen kritischen Regulator des Spastinproteinspiegels, indem wir seine Polyubiquitinierung und den daraus resultierenden Abbau kontrollieren. Wir zeigen, dass eine Herunterregulierung oder chemische Hemmung von CRL4 eine Erholung des Spastinspiegels und der HSP-assoziierten Phänotypen in einem Drosophila-Modell der SPG4-Haploinsuffizienz und patienteneigenen Zellen induziert.

Material und Methoden

Menschliche Zellen, Kulturbedingungen und Behandlungen

HeLa (ein Geschenk von N. Corbi, IBPM-CNR, Italien) und HCT116 (ein Geschenk von B. Vogelstein, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA) wurden bei 37 °C und 5 % kultiviert

CO2 in DMEM GlutaMAX ergänzt mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FBS) (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Patienteneigene lymphoblastoide Zellen, die die pathogenetische haploinsufficient heterozygote c.864865dupTC SPG4-Mutation tragen, die wie in Sardina et al. 2023[21 erhalten] wurde, wurden bei 37 °C und 5 % CO2 in RPMI kultiviert, ergänzt mit 10 % FBS. Die Zellen wurden routinemäßig auf Mykoplasmen-Kontamination getestet. MG132, Cycloeximid (CHX) und NSC1892/Urazol stammten von Sigma-Aldrich (MERCK, Frankfurter, Deutschland). Die Ethikkommission der Asl Roma 2, Rom, Italien, hat diese Studie an patienteneigenen Zellen genehmigt (0074975/2020). Es wurde eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt und die Datenanalyse anonym durchgeführt.

Menschliche Expressionsvektoren

Die folgenden Plasmide wurden verwendet: myc-markiertes DN-Cul1, myc-markiertes DN-Cul2, myct-markiertes DN-Cul3, myc-markiertes DN-Cul4a, myc-markiertes DN-Cul5 und myc-

markierter Wildtyp-Cul4a (Geschenke von A. Peschiaroli, IFT-CNR, Rom, Italien); pEF-HA-Ub (ein Geschenk von A. Pollice,
Universität Federico II, Neapel, Italien). Die Vektoren wurden mit Lipofectamine LTX und Plus-Reagenz (Life Technologies) transfiziert.

RNA-Interferenz (RNAi) in menschlichen Zellkulturen

Roc1 RNAi wurde wie in Migita et al., 2014[26] erhalten. Cul4a-RNAi und DDB1-RNAi wurden unter Verwendung einer Mischung aus spezifischen, validierten Stealth-siRNAs von Life Technologies erhalten; Spastin-RNAi wurde unter Verwendung spezifischer Stealth-siRNAs erhalten, die ausgewählt wurden, darunter Zielsequenzen, die allen Spastin-Isoformen gemeinsam sind, wie in Pisciottani et al., 2009[27]. SiRNAs wurden mit Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies) transfiziert. Die Sequenzen der verwendeten siRNAs sind die folgenden:

siCul4a □1 GagCGGAGAGAGAGAGAGA, □2: DAS WORT DES WORTES

siDDB1-KARTON □1 UGGAGGAGAUAACUCGGAUUUA, □2 AUGCAGAAUCGACUCAAUAU

siSpastin □1 Der Thron des Thrones, □2 CGGACGUCUAUAACGAAGUACUAA

Fliegenstämme und Behandlungen

Drosophila-Bestände und -Kreuzungen wurden, sofern nicht anders angegeben, auf Drosophila-Standardmedium (Nutri-fly, Genesee Scientific) gehalten. RNAi-Fliegenlinien, die auf die Spastinexpression abzielen (v108739 (P{KK107786}VIE-260B)) und (v33110 (w1118; P{GD563}v33110)) wurden vom Wiener Drosophila-Forschungszentrum (VDRC, Wien, Österreich) bezogen. Das Bloomington Stock Center (http://flybase.bio.indiana.edu/) stellte alle GAL4-Treiber und andere verwendete Stämme zur Verfügung: RNAi-Fliegenlinien, die auf die Spastinexpression abzielen (27570 (y1 v1; P{TRiP.JF02724}attP2)) und (53331 (y1 sc* v1 sev21; P{TRiP.HMC03560}attP40)); RNAi-Linie, die auf das Cul4-Gen abzielt (50614 ([1] v[1];

P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMC02981}attP2); *elav-GAL4 auf dem X-Chromosom eingefügt (458 (P{w[+mW.hs]=GawB}*elav*[C155]);* eyeless-GAL4 auf dem zweiten Chromosom (5534 (w[*]; P{w[+m*]=GAL4-ey.H}3-8); GMR-GAL4 (9146 w[1118]; P{GMRGAL4.w[-]}2/CyO). Die Effizienz jeder RNAi-Linie, die Expression des entsprechenden Ziels herunterzuregulieren, wurde mittels Echtzeit-Reverse-Transkriptase (RT)-PCR und/oder Western Blot (WB)-Analyse an RNAs bzw. Proteinen getestet und aus verschiedenen Fliegengeweben extrahiert.

Für die NSC1892/Urazol-Behandlung wurden die Fliegen in wasserlöslichem Formula 4-24® Instant Drosophila Medium (Carolina Biological Supply, Burlington, NC, USA) gezüchtet, das frisch bei Raumtemperatur (RT) mit den angegebenen Konzentrationen des Arzneimittels zubereitet wurde.

RT-PCR

Die Gesamt-RNA wurde mit Trizol (Life Technologies) extrahiert und mit dem iScriptTM cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) reverse transkribiert. Echtzeit-RT-PCRs wurden mit dem Luna® Universal qPCR Master Mix (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) und dem angewandten Biosystem Quantstudio3 (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Die relative Faltungsänderung wurde mit der 2-ΔΔCt-Methode unter Verwendung von *Giotto* oder GAPDH mRNA als Normalisierer in Fliegen bzw. menschlichen Zellen bestimmt. Alle Reaktionen wurden in technischer Dreifachausfertigung durchgeführt. Die RT-PCR wurde mit der Traum-Taq-Polymerase (Life Technologies) durchgeführt, die PCR-Produkte wurden mit einem 3%igen Agarose-Gel betrieben.
Die Spastin- oder cul4-Amplifikationsbanden wurden mit *Giotto* als Referenzgen normalisiert.

Folgende Primer wurden verwendet:

DmSpastin Fw: 5'-GAGAACGAAGGTCAAGAGC-3'

DMSPASPestin RV: 5'-GCTCACGCAGAGCTAGAAAATGGAG-3'

DmSpastin3 Fw: 5'-CGCTACCTATACGGTGCGAGC-3'

DMSPASPSTEIN3 Wohnmobil: 5'-Oktakake-3'

DmCul4 Fw: 5'-Aggatagtxy-3'

DmCul4 Rv: 5'- GTGCATCCATCTTGTGGCTAC-3'

Kyoto PV: 5'-Katkakat für Katkakat-3' Kyoda RV: 5'-DGACKactic-3'
Hrag1-PV: 5'-DJTIJAtaqTagAt-3' Hrag1-Rev: 5'-Kakkatkadi-3'
DTB1-PV: 5'-Takakattatku-3' DTP1-Rev: 5'-Adkakatkudg-3' Kapt-PV: 5′-Dick-3'
hGAPDH-Rev: 5'-GGAGGAGTGGGTCGCTGT-3'

WB und Immunpräzipitation (IP)

Die Gesamtzellextrakte (TCEs) wurden in Lysepuffer (50 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 1 % NP40 und 1 mM EDTA) hergestellt, die mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren (Roche, Basel, Schweiz) ergänzt wurden. Die Proteine wurden mit Bolt Novex Bis-Tris Gels 4-12% Gradient (Life Technologies) aufgelöst. Die Immunreaktivität wurde mit ECL-Prime (Amersham, GE HealthCare, Chicago, IL, USA) bestimmt, die Bildaufnahme und die densitometrische Analyse wurden mit der Software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durchgeführt. Für Ubiquitinierungsassays führten wir zunächst eine WB-Analyse mit Anti-Spastin bei 1/10 unserer IP-Reaktionen durch, um die Effizienz von IP in jeder Probe zu bestimmen. Nach dieser Quantifizierung luden wir ähnliche Mengen an immunpräzipitiertem Spastin und führten WB mit Anti-HA Ab durch.

Folgende Abs wurden eingesetzt: Anti-GAPDH #sc-32233 (1:1000), Anti-Alpha-Tubulin #sc5286 (1:1000), Anti-Vinculin #73614 (1:1000); anti-Cul4a #sc-377188 (1:500); Anti-p27 #sc-528 (1:200), Anti-Myc #sc-40 (zur Immunpräzipitation von Myc-Cul4a), monoklonales Anti-Spastin-Maus-Abs (1:100; sp3G11/1 #sc-53443 oder sp6c6 #sc-81624) von Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) und polyklonales Anti-Spastin-Kaninchen-Ab #PA5-53581 (1:1000) von Life Technologies (monoklonale Anti-Spastin-Abs wurden indifferentiell verwendet, da sie vergleichbare Ergebnisse lieferten, während polyklonales Anti-Spastin-Ab von WB zum Nachweis von immunpräzipitiertem Spastin verwendet wurde); Anti-Myc #2276 (1:500, Maus monoklonal), Anti-Cul4a #2699 (1:1000, Kaninchen polyklonal) Anti-DDB1#5428 (1:1000 Kaninchen polyklonal) Abs durch Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA); anti-HA #11583816001 (1:1000) Maus monoklonales Ab von Roche; anti-Cul2 #51-1800 Kaninchen polyklonales Ab (1:1000) von Life Technologies, Anti-HRPkonjugiertes Ziegen-Anti-Maus #7076 und Anti-Kaninchen #7074 (Cell Signaling Technology). Normale Maus-IgG #sc-2025 von Santa Cruz Biotechnology wurden als Immunglobuline zur Isotypkontrolle in IP-Experimenten verwendet.

Für Fliegen wurden TCEs in RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 1 % NP40 und 1 mM EDTA) hergestellt, der mit Protease- und Phosphatase-Inhibitoren ergänzt wurde. Die Proteine wurden mit dem BCA-Protein-Assay-Kit (Pierce, Life Technologies) quantifiziert und dann mittels SDS-PAGE unter Verwendung von 10%igen Polyacrylamidgelen (Bio-Rad) aufgelöst. Die Immunreaktivität wurde mit dem Chemilumineszenz-Substratkit SuperSignal TM west Pico PLUS (Pierce) bestimmt, und die Bildaufnahme und densitometrische Analyse wurden mit dem Gel Doc XR+ Gel-Dokumentationssystem und der Image Lab-Software (Bio-Rad) durchgeführt.

Herstellung eines polyklonalen Ab-anti-Dm-Spastins für Kaninchen

Die polyklonale Ab-Produktion von Kaninchen wurde von ThermoFisher Scientific durchgeführt. Kaninchen wurden mit dem KLH-konjugierten Peptid CSLNSYEKWSQDYGDITI (Dm Spastin 742:758). Auf die Serumentnahme folgte ein Reinigungsprotokoll mit positiver Selektion mit dem Peptid 742:758 als immobilisiertes Antigen.

Immunfluoreszenz (IF)

LCls wurden auf Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich) beschichtete Deckgläser gesät, wie in Sardina et al.,

202325, fixiert in 2% Formaldehyd, permeabilisiert in PBS-T (PBS 0,25% Triton-X 100) 10' bei RT und dann in 5% Rinderserumalbumin (BSA) in PBS blockiert, bevor das primäre Ab (Anti-Tubulin-cy3 #C4585, Sigma-Aldrich) appliziert wurde. Die Zellkerne wurden mit Hoechst (SigmaAldrich) markiert. LCLs wurden unter dem inversen Mikroskop (Eclipse Ti, Nikon, Tokio, Japan) mit einer Clara-Kamera (ANDOR-Technologie) untersucht. Belfast, Nordirland). Die Bilder für jede Probe wurden parallel mit identischen Mikroskopeinstellungen von Nis-Elements H.C. 5.11 und unter Verwendung des JOBS-Moduls für automatisierte Aufnahmen aufgenommen. Die Analyse wurde mithilfe von benutzerdefinierten Bildanalyse-Pipelines in CellProfiler durchgeführt, wie in Sardina et al., 2023[25]. Der Abstand zwischen Zell- und Zellkernschwerpunkten (dcnc) wird als Länge des Liniensegments berechnet, das zwei Punkte

verbindet (d. h. die Kern- und Zellschwerpunkte, die auf die Hoechst- bzw. Beta-Tubulin-Region von Interesse eingestellt sind).

Muskelfilets von Drosophila-Larven wurden gemäß den Standardprotokollen[28,29] präpariert. Kurz gesagt, die Larven wurden in PBS seziert und in 4% Paraformaldehyd und 4% Saccharose für 45' bei RT fixiert. Nach dem Waschen in PBS wurden die Filets in PBST permeabilisiert (0,25 % Triton-X

100) 10' bei RT, und dann 1h im Blockpuffer (PBS, 0,1 % Triton-X 100, 3% BSA) bei
RT, vor der Inkubation mit primärem Abs, verdünnt in Blockierungspuffer (PBS, 0,1 % Triton-X 100, 3 % BSA) für 1 Stunde bei RT in einer Nasskammer. Die Proben wurden mit PBS gewaschen und mit sekundärem Abs (Jackson ImmunoResearch, Ely, UK) für 1 h bei RT inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Präparate in ein Antifade-Eindeckmedium mit DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Newark, CA, USA) eingefasst. Die konfokale Bildgebung wurde mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop LSM700 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) durchgeführt, das mit vier abstimmbaren Lichtlaserquellen ausgestattet ist: 405, 488, 561 und 639 nm. Die sequentiellen konfokalen Bilder des LSM700 wurden mit einem 63-fachen Ölimmersionsobjektiv mit einem Format von 1.024 × 1.024, einer Z-Schrittweite von 0,5-1 µm und einer elektronischen Zoomvergrößerung von bis zu 2,0 aufgenommen. Die Bilder wurden in die Software ZEN 3.1 Blue Edition (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) importiert, um optimale Maximalprojektionen zu erhalten, die mit der Freeware NHI ImageJ FIJI analysiert wurden, um die Signalintensität der synaptischen Marker zu messen oder Unterschiede in der Morphologie der neuromuskulären Verbindungen (NMJ) in verschiedenen genetischen Hintergründen zu bewerten. Die maximalen Projektionen wurden dann in Adobe Photoshop CS4 zusammengefügt. Die quantitative Analyse der NMJ-Marker wurde mit einer manuellen Methode durchgeführt, die auf der Abgrenzung von prä- und postsynaptischen Rändern basierte, wobei die Freeware NHI ImageJ FIJI verwendet wurde.

Folgende Abs kamen zum Einsatz: Anti-Scheiben große #4F3 (1:100); anti Futsch #22C10 (1:100) und anti Bruchpilot (BRP) #NC82 (1:100) von Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB, Iowa City, IA USA); Anti-Meerrettich-Peroxidase (HRP)-FITC #123-545-021 (1:300) und Anti-Maus-TRITC #715-025-150 (1:300) stammten von Jackson ImmunoResearch.

Kletternder Assay

Negative Geotaxis-Assays wurden gemäß den Standardprotokollen[30] durchgeführt. Männliche erwachsene Fliegen wurden gesammelt und für 24 Stunden in neue Fläschchen gelegt, um den Effekt der CO2-Anästhesie zu eliminieren. Die Fliegen wurden dann für 1 Stunde in leere Fläschchen umgefüllt, bevor sie in den Climbing-Assay-Halter gelegt wurden. Die Kletterfähigkeit wurde gewertet, indem Fliegen auf den Boden der Phiole getippt wurden und gewertet wurde, wie viele Fliegen nach 5 Sekunden die Ziellinie (4 cm) erreicht haben. Die Fliegen wurden in Chargen von 10-15 getestet und es wurden drei Versuche mit jeder Analyse durchgeführt.

Analyse der Augenmorphologie

Die Bilder der Fliegenaugen wurden mit dem Stereomikroskop (ZEISS Semi 508, 50X) aufgenommen, das mit der Axiocam Kamera 105 ausgestattet ist und die ZEISS ZEN-Software (Blue Edition 3.1) nutzt. Die Augenpartie wurde dann mit der Freeware-Software NHI ImageJ FIJI gemessen.

Statistische Analyse

Die Datenanalysen wurden mit der GraphPad Prism Software 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.) durchgeführt. Alle Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Um zwei Proben zu vergleichen, haben wir die Normalverteilung mit dem Shapiro-Wilk-Test bestimmt. Für Normalverteilungen haben wir den ungepaarten t-Test verwendet, ansonsten den Mann-Whitney-Test. Für Mehrfachvergleiche haben wir die Einweg-ANOVA und den Tukey-Test verwendet. Eine Möglichkeit, wie die ANOVA mit dem Post-hoc-Test von Dunnett angewendet wurde, wurde angewendet, wenn zwei oder mehr Versuchsgruppen mit einer einzigen Kontrollgruppe verglichen wurden. Jeder Test wurde verwendet, um die statistische Signifikanz zu bewerten, die auf $P<0,05$ festgelegt und mit Sternchen gemäß dem folgenden Schema angegeben wurde: ***$P<0,001$, **$P<0,01$ und *$P<0,05$.

Befund

Der Spastinproteinspiegel wird durch CRL4a-vermittelte Polyubiquitinierung reguliert

CRLs werden durch die Neddylierung der Cullin-Untereinheit aktiviert und durch die Bindung von Cullin-assoziiertem NEDD8-dissoziiertem 1 (CAND1) gehemmt, das als Substratrezeptor-Austauschfaktor für verschiedene Cullins fungiert [24,25,31,32]. Basierend auf unseren früheren Ergebnissen, die zeigten, dass Spastin mit CAND1 interagiert und in einer neddylierungsabhängigen Weise polyubiquitiniert/abgebaut wird[19,21], untersuchten wir, ob CRLs an der Regulation des Spastinproteinumsatzes beteiligt sind. Durch Überexpression der dominant-negativen (DN) Formen der wichtigsten CAND1-kontrollierten Cullins, Cul 1-5, fanden wir heraus, dass nur die Expression der DN-Form von Cul4a zu einem signifikanten Anstieg der Spastinspiegel in HeLa-Zellen führte (Abb. 1A). In ähnlicher Weise erhöht die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Cul4a den Spastinspiegel (Abb. 1B). Als reziproker Ansatz konnten wir beobachten, dass die Überexpression von Wildtyp-Cul4a zu einer Abnahme des Spastinspiegels führt (Ergänzende Abb. 1A). Als nächstes untersuchten wir, ob Cul4a den Spastin-Proteinspiegel reguliert, indem es seine Poly-Ubiquitinierung fördert, indem wir in vivo Ubiquitinierungsassays durchführten, wobei ein Vektor verwendet wurde, der HA-markiertes Ubiquitin (UbHA) exprimiert (Abb. 1C und ergänzende Abb. 1B,C). Wie in Abb. 1C berichtet, wird eine signifikante Abnahme der Spastin-Polyubiquitinierung bei RNAi-vermittelter Herunterregulierung von Cul4a beobachtet. Ähnliche Ergebnisse für die Polyubiquitinierung von Spastin werden bei der Überexpression der DN-Form von Cul4a beobachtet (Ergänzende Abb. 1B), während eine Zunahme der Polyubiquitinierung in Zellen beobachtet wird, die Wildtyp-Cul4a überexprimieren (Ergänzende Abb. 1C). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass ein CRL4a-Komplex den Spastinproteinspiegel negativ reguliert, indem er seine Polyubiquitinierung und den anschließenden Abbau kontrolliert.

CRL4a besteht aus einem trimeren Kern (Cul4a), dem einzigartigen Adapter DDB1 und der katalytischen Untereinheit

Roc1), das in Kombination mit mehreren Substratrezeptoren, den sogenannten DDB1-Cul4-Associated Factors (DCAFs), die Polyubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von Substraten orchestriert. Um den Beitrag eines CRL4a-Komplexes zur Regulation des

Spastinproteins zu untermauern, haben wir untersucht, ob die RNAi-vermittelte Herunterregulierung der anderen Mitglieder des trimeren Kerns, d.h. DDB1 oder Roc1, den Spastinspiegel beeinflusst. Wie in Abb. 1D und Ergänzende Abb. 1 D berichtet, wird ein Anstieg des Spastinspiegels nach der Herunterregulierung von DDB1 bzw. Roc1 beobachtet. Dementsprechend wird eine Erhöhung der Stabilität von Spastin durch die Behandlung von DDB1-siRNA-Zellen mit dem Proteinsynthese-Inhibitor Cycloheximid (CHX) beobachtet (Abb. 1E und ergänzende Abb. 1E,G). Als nächstes zeigen wir, dass Cul4a mit Spastin interagiert (Abb. 1F-G und ergänzende Abb. 1H,I). Die Interaktion zwischen Spastin und Cul4a wird durch co-IP mit anschließender WB-Analyse in Zellen gezeigt, die mit Myc-markiertem Wildtyp-Cul4a oder einem leeren Vektor transfiziert wurden (Abb. 1F und ergänzende Abb. 1H,I). Darüber hinaus wurde die Interaktion von endogenen Spastin- und Cul4a-Proteinen durch co-IP aus murinen Gehirnlysaten untersucht, was das Vorhandensein von Cul4a in der immunpräzipitierten Spastin-Fraktion zeigte (Abb. 1G) und unterstützte, dass Spastin in vivo mit CRL4a im Gehirn einen Komplex bilden könnte.

Der CRL4-Inhibitor erhöht NSC1892 den Spastinspiegel und rettet MT-Zytoskelettdefekte in Patientenzellen

Um die Beteiligung von CRL4 an der Regulierung des Spastinproteinspiegels weiter zu bestätigen, verwendeten wir die chemische Verbindung NSC1892 (auch bekannt als Urazol), die die Wechselwirkung zwischen

DDB1 und Cul4, die die Bildung eines aktiven CRL4-Komplexes verhindern und den Abbau von DDB1 und die Stabilisierung von CRL4-Zielen[verursachen 33]. Zunächst analysierten wir die Auswirkungen dieses Inhibitors auf die Regulation des Spastinproteins. Wir beobachteten eine Abnahme der Spastin-Polyubiquitinierung

(Abb. 2A) und einem Anstieg des Spastinspiegels (Abb. 2B) nach der Behandlung von Zellen mit 2 µM NSC1892. Die Abnahme von DDB1 und der Anstieg von p27 wurden als Positivkontrollen der Behandlung gezeigt (Abb. 2B). Als nächstes testeten wir, ob NSC1892 einen Anstieg des Spastinspiegels in einem pathologischen SPG4-Kontext induzieren können, indem wir patienteneigene LCLs verwenden, die SPG4-HSP-heterozygote haploinausreichende Trunkierungsmutationen tragen. Im Gegensatz zu gesunden Spender-LCLs, die mit einem

zentralen Kern abgerundet sind, der von einer dünnen Schicht des MT-Zytoskeletts umgeben ist, zeigen SPG4-LCLs eine Verringerung der Spastinexpression um etwa 50%, die mit einer polarisierten Organisation des MT-Zytoskeletts einhergeht, ein Defekt, der durch eine Erhöhung des Spastinproteinspiegels gerettet werden kann[25]. Wie in Abb. 2C gezeigt, führt die NSC1892-vermittelte Hemmung von CRL4 zu einer signifikanten Erholung des Spastinspiegels in diesen Zellen. Um die funktionellen Auswirkungen der NSC1892-induzierten Spastin-Erholung in Patientenzellen zu bewerten, analysierten wir schließlich die Organisation des MT-Zytoskeletts in diesen Zellen. Eine auf Zellbildgebung basierende Methode, die wir kürzlich entwickelt haben, um das polarisierte MT-Zytoskelett von SPG4-LCLs zu quantifizieren, wurde eingesetzt. Insbesondere haben wir mit dieser Methode gezeigt, dass SPG4-LCLs im Vergleich zu Kontroll-LCLs von gesunden Spendern eine signifikante Vergrößerung des Abstands zwischen Zell- und Zellkernschwerpunkten (dcnc) aufweisen[25]. Wie in Abb. 2D,E und in der ergänzenden Abb. 2 berichtet, beobachteten wir eine signifikante Rettung der MT-Organisation bei SPG4LCLs, die im Vergleich zu Kontrollen mit NSC1892 behandelt wurden. Insgesamt stützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Hemmung der CRL4-vermittelten Regulation von Spastin es ermöglicht, seine Spiegel wiederherzustellen und SPG4-HSP-assoziierte Defekte in präklinischen Modellen zu reduzieren.

Cul4 RNAi-vermittelte Herunterregulierung rettet HSP-assoziierte Phänotypen in einem Drosophila-Modell der SPG4-Haploinsuffizienz

Um den Einfluss der CRL4-Hemmung auf die Spastin-Regeneration funktionell zu validieren und pathologische Defekte im Zusammenhang mit HSP *in vivo zu reduzieren*, konnten wir keine Mausmodelle verwenden, da nur SPG4-homozygote Knockout-Mäuse, denen das Spastinprotein fehlt, eine neurologische Erkrankung aufweisen[34,35]. Basierend auf den Phänotypen von Spastin-Loss-of-Function-Drosophila-Modellen, die den pathologischen Defekten der HSP beim Menschen ähneln 36-38, nutzten wir ein Modell der SPG4-Haploinsuffizienz in Drosophila, indem wir das GAL4-UAS-System39 einsetzten, um eine RNA-vermittelte Herunterregulierung von Spastin in verschiedenen Geweben durchzuführen. Wir verwendeten einen pan-neuronalen Treiber (*elavGAL4),* um verschiedene UAS-Spastin-RNAi-transgene Linien zu exprimieren, und wir

testeten ihre Effizienz bei der Herunterregulierung von Spastin durch RT-PCR. Daher wählten wir den Stamm aus, bei dem die Reduktion der Spastin-mRNA (#108739, VDRC; im Folgenden UAS-Spastin-RNAi genannt) (Abb. 3A) nicht vollständig und mit einem pathogenen Mechanismus der Haploinsuffizienz vereinbar war.

Humane CRL4s können zwei Gerüste, Cul4a oder Cul4b, enthalten, die vom gleichen gemeinsamen Vorfahren abstammen und viele überlappende Funktionen teilen, während bei wirbellosen Tieren wie Drosophila nur ein hochkonserviertes *Cul4-Gen vorhanden ist* (64% Identität). Daher untersuchten wir die Beteiligung von Drosophila Cul4 am Spastinabbau durch RNAi-vermittelte Cul4-Herunterregulierung. Zunächst wurde die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Cul4 mittels RT-PCR bestätigt (Abb. 3B). Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi in allen Neuronen exprimieren, zeigen einen unexpandierten Flügelphänotyp (Abb. 3C-E). Als nächstes untersuchten wir das Bewegungsverhalten dieser Fliegen. Ein Climb-Assay zeigte, dass Spastin-RNAi-Fliegen eine starke Beeinträchtigung der Bewegungsfähigkeit aufweisen (Abb. 3C). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Linien erzielt, die unterschiedliche UAS-Spastin-RNAi exprimierten (Ergänzende Abb. 3A,B), gemäß verschiedenen Fliegenmodellen, die Spastin-Mutationen trugen und den bei SPG4-HSP-Patienten beobachteten motorischen Defiziten ähnelten[17,34-36]. Tatsächlich erreicht nur ein kleiner Prozentsatz der Spastin-RNAi-Fliegen den Zielpunkt in der definierten Zeit. Durch die Herunterregulierung von Cul4 werden die Kletterfehler bei diesen Fliegen deutlich gerettet (Abb. 3C).

Darüber hinaus untersuchten wir die Auswirkungen der Spastin-Herunterregulierung auf die Entwicklung des Fliegenauges als allgemeines Modell der Neurodegeneration, indem wir die RNAi-Konstrukte früh oder spät während der Augenentwicklung exprimierten. Die meisten Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi früh während der Augenentwicklung exprimieren (*eyeless-GAL4* driver40), entwickeln überhaupt keine Augen oder zeigten eine signifikante Verkleinerung der Augenpartie (Fig. 3D). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in anderen Linien erzielt, die unterschiedliche UAS-Spastin-RNAi exprimierten, was die Spezifität des Augenphänotyps unterstützt (Ergänzende Abb. 3C,D), was mit dem kleinen Auge übereinstimmt, das in Zebrafisch-Spastin-Mutanten beobachtet wurde[41]. Interessanterweise wurde die Augenpartie signifikant gerettet, wenn sowohl Spastin als auch Cul4 durch RNAi (Fig. 3D,E) herunterreguliert wurden. Wir exprimierten die RNAi-Konstrukte unter der Kontrolle eines Glasmultiple-Reporters (GMR-GAL4-Treiber), der spät während der Augenentwicklung und posterior der morphogenetischen

Furche[42] exprimiert. Damit konnten wir bestätigen, dass die Cul4-Herunterregulierung die Netzhautdegeneration aufgrund der Spastin-RNAi-vermittelten Herunterregulierung unterdrückt (Ergänzende Abb. 4A-C). Insbesondere berechneten wir den Grad der Degeneration, indem wir die Ausdehnung des depigmentierten Bereichs jedes Auges maßen (Ergänzende Abb. 4B).

Um die Auswirkungen der Cul4-Herunterregulierung auf die Spastin-Rückgewinnung zu überprüfen, führten wir schließlich eine WB-Analyse von Fliegenkopfextrakten durch. Da ein kommerzielles Ab zur Erkennung von Drosophila-Spastin nicht verfügbar war, haben wir ein maßgeschneidertes polyklonales Ab gegen ein synthetisches Peptid von Drosophila-Spastin entwickelt. Nach den in vitro erzielten Ergebnissen (Abb. 1 und ergänzende Abb. 1) werden die Spastinproteinspiegel durch die Cul4-Herunterregulierung in Spastin-RNAi-Fliegen signifikant wiederhergestellt (Abb.
3F,G).

Die Cul4-Hemmung rettet Veränderungen der NMJ-Morphologie, stellt den Spastinspiegel wieder her und reduziert HSP-Defekte *in vivo*

Unter Berücksichtigung des positiven Einflusses der Cul4-Herunterregulierung auf den Spastinspiegel und lokomotorische Defekte untersuchten wir ihre Wirkung auf die Morphologie des larvalen NMJ[43,44] der Muskeln 6 und 7. Die NMJs der dritten Larve von Fliegen, die entweder UAS-Spastin-RNAi, UAS-Cul4RNAi oder beides exprimieren, wurden mit Anti-HRP markiert, das die präsynaptische neuronale Membran färbt und es ermöglicht, die synaptische Bouton-Morphologie zu untersuchen. Bei Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi exprimieren, beobachten wir eine Zunahme der Fläche abnormaler Boutons, die durch die Cul4-Herunterregulierung wiederhergestellt wird (Abb. 4A-B). Als nächstes untersuchten wir, ob morphologische Veränderungen von synaptischen Boutons mit der Fehllokalisierung synaptischer Marker assoziiert sind. NMJs wurden mit Anti-HRP und Anti-Discs large kogefärbt, was die postsynaptische Spezialisierung als subsynaptisches Retikulum bezeichnet. Die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Spastin reduziert den postsynaptischen Spiegel der Discs large[45,46], der durch die Cul4-Herunterregulierung signifikant wiederhergestellt wird (Abb. 4C-D). Während der

embryonalen Entwicklung von NMJs, nachdem axonale Wachstumszapfen Kontakt mit Zielmuskeln hergestellt haben, differenzieren NMJs präsynaptische Terminals, die die Clusterbildung von postsynaptischen Adapterproteinen fördern. Da die NMJ-Bildung auf einer intimen zeitlich regulierten Interaktion zwischen prä- und postsynaptischen Spezialisierungen beruht, analysierten wir NMJs weiter, indem wir untersuchten, ob die präsynaptische Seite aktiver Zonen durch die Spastin-Herunterregulierung beeinflusst und durch die Cul4-Herunterregulierung wiederhergestellt wird. Wir markierten NMJs mit Antibruchpilot (BRP), der die präsynaptischen Spezialisierungen, die sogenannten T-Bars, färbt. UAS-Spastin-RNAi-Fliegen zeigen eine Verringerung der BRP-Signalintensität, die durch die Cul4-Herunterregulierung signifikant wiederhergestellt wird (Abb. 4E-F). Da die neuronale MT-Verteilung an den NMJs anderer SPG4-HSP-Fliegenmodelle[36-38,47 als defekt gemeldet wurde], untersuchten wir die MT-Verteilung in unseren UASspastin-RNAi-Fliegen, indem wir NMJs mit einem Ab-erkennenden Futsch, dem Fliegenortholog des Säugetier-MT-assoziierten Proteins 1 (MAP1), markierten. Wir beobachten eine Abnahme der Futsch-Spiegel in Spastin-RNAi-Fliegen im Vergleich zur Kontrolle, die durch die Cul4-Herunterregulierung signifikant wiederhergestellt wird (Abb.
4G,H).

Schließlich haben wir als Proof of Concept einer pharmakologischen Behandlung, die CRL4 hemmt, die Wirkung von NSC1892 *in vivo in* UAS-Spastin-RNAi-Fliegen getestet . Wir züchteten Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi früh während der Augenentwicklung exprimierten (eyeless-GAL4) in Lebensmitteln, die steigende Dosen von NSC1892 enthielten. Bei einer Konzentration von 3 □M NSC1892 beobachten wir eine deutliche Erholung der Augenpartie (Abb.
5A,B und ergänzende Abb. 5A) und ein signifikanter Anstieg der Spastinproteinspiegel (Abb.
5C,D). In ähnlicher Weise verbesserten Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi unter der Kontrolle des panneuronalen Treibers (*elav-GAL4) exprimierten und mit NSC1892 haltiger Nahrung gezüchtet wurden, ihre Fortbewegungsaktivität signifikant (Abb. 5E und ergänzende Abb. 5B), was bestätigt, dass die Hemmung des CRL4-Kernkomplexes den Spastinspiegel wiederherstellt und SPG4-HSP-Defekte* in vivo reduziert.

Diskussion

HSP ist eine neurodegenerative Erkrankung des Motoneurons, die häufig mit einer Haploinsuffizienz des SPG4-Gens einhergeht. Strategien zur Induktion einer Wiederherstellung des Spastinproteinspiegels gelten als neuartige vielversprechende Therapieansätze. In der Vergangenheit haben wir gezeigt, dass der Spastinspiegel durch Neddylierungs-abhängige Polyubiquitinierung und proteasomal vermittelten Abbau reguliert wird. Hier haben wir gezeigt, dass der CRL4-Komplex die Stabilität von Spastin reguliert. Insbesondere zeigen wir, dass der Spastinspiegel durch CRL4a-vermittelte Polyubiquitinierung reguliert wird und dass Spastin mit dem CRL4-Komplex interagiert (Abb. 1). Um diese Befunde zu bestätigen, zeigen wir ähnliche Ergebnisse in Spastin-kompetenten Zellen und im pathologischen Kontext von SPG4 durch chemische Inaktivierung des CRL4-Kernkomplexes mit NSC1892. Wir zeigen, dass NSC1892 eine Spastin-Erholung induziert und Defekte der MT-Organisation in patienteneigenen Zellen rettet (Abb. 2). Um die Auswirkungen der CRL4-Hemmung in vivo funktionell zu validieren, haben wir ein *Drosophila melanogaster-Modell* der SPG4-Haploinsuffizienz durch RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Spastin in verschiedenen Fliegengeweben ausgenutzt. Wir beobachten, dass die Cul4-RNAi-vermittelte Herunterregulierung HSP-ähnliche Phänotypen aufgrund von Spastin-RNAi signifikant rettet (Abb. 3). Darüber hinaus zeigen wir, dass die Cul4-Herunterregulierung Veränderungen der NMJ-Morphologie aufgrund von Spastin-RNAi rettet (Abb. 4). Schließlich zeigen wir, dass die Züchtung von Fliegen, die UAS-Spastin-RNAi exprimieren, mit Nahrung, die mit NSC1892 angereichert ist, den Spastinspiegel erhöht und HSP-ähnliche Defekte in vivo reduziert. Dies liefert den Proof-of-Concept, dass eine pharmakologische Behandlung, die CRL4 hemmt, einen neuen therapeutischen Ansatz zur Spastin-Rückgewinnung darstellen könnte (Abb. 5).

In Zellen von Patienten haben wir die funktionellen Effekte der CRL4-Hemmung mit Hilfe eines schnellen, automatisierten, nicht-invasiven Zellbildgebungsverfahrens gemessen, was die Möglichkeit eröffnet, Ergebnismessungen zu generieren, die für zukünftige klinische Studien auf der Grundlage von Spastin-Rückgewinnungsansätzen nützlich sind. Darüber hinaus beobachteten wir, dass jede Behandlung, die eingesetzt wurde, um CRL4 in Zellkulturen oder Fliegen zum Schweigen zu bringen oder zu hemmen, keine größere Akkumulation von Spastin induzierte, trotz längerer RNAi-Expression in Fliegen, Exposition der Zellen gegenüber hohen siRNAs-Konzentrationen oder hohen Dosen NSC1892-Inhibitors. Dies unterstützt die Durchführbarkeit

von therapeutischen Ansätzen zur Wiederherstellung von Spastin, die auf den CRL4-Komplex abzielen, der keine toxischen Wirkungen im Zusammenhang mit einer Spastin-Überdosierung hervorruft. Dies deutet auch darauf hin, dass die Regulierung der Stabilität des Spastinproteins nicht vollständig auf CRL4 beruht, und unterstützt die Hypothese, dass der Spastinspiegel sehr fein abgestimmt ist, um eine Überdosierung genau zu vermeiden. Es wurde gezeigt, dass kleine Unterschiede in der Expression von Wildtyp-Spastin signifikante funktionelle Konsequenzen haben und dass die Hochregulierung der Spastinaktivität in Neuronen schädliche Auswirkungen auf die Neuritenmorphologie und -dynamik hat[9,12]. Dies unterstützt die Idee, dass verschiedene Signalwege zusammenarbeiten können, um die Stabilität von Spastin zu verringern und seine Überdosierung zu verhindern, selbst im Zusammenhang mit SPG4-Haploinsuffizienz.

Ein wichtiger Kritikpunkt an der Idee, neuartige Spastin-erhöhende Ansätze zur Behandlung von SPG4HSP zu entwickeln, ist auf die Einschränkung zurückzuführen, diese Behandlungen nur für Patienten mit haploinsuffizienten SPG4-Mutationen einzusetzen. Es scheint, dass es nicht sinnvoll ist, Spastin-erhöhende Ansätze für Patienten zu entwickeln, die Missense-Mutationen tragen. Mit dem zunehmenden Wissen über Antisense-Oligonukleotid (ASO)-vermittelte Therapien zur Behandlung seltener neurologischer Erkrankungen ist es jedoch möglich, die Kombination spezifischer ASOs, die die alleinige Expression der mRNAs mit Spastin-Missense-Mutationen reduzieren können, mit Spastin-erhöhenden Ansätzen zur Erhöhung der posttranslationalen Stabilität der Wildtyp-Variante ins Auge zu fassen.

Drosophila melanogaster wurde erfolgreich als *In-vivo-Modellsystem* verwendet, um die funktionelle Rolle von Spastin bei der Regulation der NMJ-Entwicklung und -Aktivität zu untersuchen[36-38,47]. Verschiedene Allele und genetische Werkzeuge wurden genutzt, darunter klassische Nullallele, einzelne Aminosäuresubstitutionen und transgene Linien, die RNAi-Konstrukte exprimieren, um auf Spastin-mRNA abzuzielen. All diese Werkzeuge haben es ermöglicht zu zeigen, dass der Verlust von Spastin in Drosophila Veränderungen in der synaptischen Entwicklung der NMJs und Defekte in der Neurotransmission verursacht. Insbesondere wurde beobachtet, dass die morphologischen und funktionellen Defekte mit einer aberranten Stabilisierung des MT-Zytoskeletts an der Präsynapse assoziiert sind. Obwohl es in der Literatur völlige Übereinstimmung darüber gibt, dass Spastin eine zentrale Rolle bei der Regulation der MT-Dynamik in den Axonen und an der Synapse zugewiesen wird, unterstrichen die beobachteten Phänotypen jeweils leichte Unterschiede. Es wurde beobachtet, dass die RNAi-

vermittelte Herunterregulierung von Spastin sowie die Expression von Spastin-Missense-Mutationen das Unterwachsen von NMJ und eine spezifische Verringerung des synaptischen Bereichs verursacht[37,38]. Umgekehrt wurde ein deutlicher Anstieg der Anzahl von Boutons, die mit Veränderungen in der synaptischen Struktur und der Bildung abnormaler traubenartiger Cluster verbunden sind, in verschiedenen klassischen Spastin-Null-Allelen beobachtet[36,47]. Das Auftreten von Bouton-Clustern wurde auch mit dem Fehlen von distalen MTs in Verbindung gebracht. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen stellen wir fest, dass Fliegen, die ein spezifisches RNAi-Konstrukt exprimieren, das den Spastin-mRNA-Spiegel um 50% reduziert, unter der Kontrolle des panneuronalen Treibers elav-Gal4 die Bildung von abnormen Boutons zeigen, die denen ähneln, die durch eine traubenartige Struktur gekennzeichnet sind (Abb. 4). Darüber hinaus beobachten wir, dass adulte Fliegen, die Spastin-RNAi unter elav-Gal4-Kontrolle exprimieren, eine signifikante Reduktion der Fortbewegungsaktivität zeigen. Defekte in der Neurotransmission und der Fortbewegungsaktivität stehen im Einklang mit reduzierten Spiegeln prä- und postsynaptischer Marker wie BRP und Discs large sowie des MT-assoziierten Proteins Futsch (Abb. 4). Neben NMJ-Defekten beobachteten wir auch typische Bewegungs- und Augenphänotypen in vier verschiedenen UAS-Spastin-RNAi-Linien (Literatur[36-38,41]). Darüber hinaus beobachteten wir, dass Fliegen, die eine Spastin-RNAi unter elav-Gal4-Kontrolle exprimieren, einen unexpandierten Flügelphänotyp zeigen, der sich bei der Cul4-Herunterregulierung signifikant verbessert (Ergänzende Abb. 6). Da dieser nicht expandierte Flügelphänotyp jedoch nur in einer der vier verschiedenen UAS-Spastin-RNAi-analysierten Linien beobachtet wurde; Es kann nicht ohne weitere Untersuchungen von einer spezifischen Wirkung aufgrund von Spastin-RNAi ausgegangen werden. Nichtsdestotrotz bleibt es faszinierend, da ähnliche Veränderungen der Flügelentwicklung auch in verschiedenen Fliegenmodellen der Motoneuronendegeneration berichtet wurden[48,49].

In den letzten Jahren ist ein wachsendes Interesse an der Identifizierung von Inhibitoren der trimeren

CRL4-Kernkomplex (z. B. NSC1892[33], TSC168250, 33-11 und KH-4-4351). Die Entwicklung dieser Inhibitoren sowie der Neddylierungsinhibitoren beruht auf der Beobachtung, dass eine Überexpression von Cullins bei verschiedenen Krebsarten berichtet wurde[52]. Wir haben bereits beobachtet, dass die Hemmung der Neddylierung die Spastinstabilität fördert[19]. Da die positive Regulation durch Neddylierung ein allgemeiner Signalweg ist, der von mehreren Cullinen geteilt wird, suchten wir nach einem spezifischeren Cullin-vermittelten Signalweg, der die Stabilität von

Spastin kontrolliert, und wir zeigten, dass CRL4 eine wichtige Rolle spielt. Obwohl die hier vorgestellten Daten eine spezifische Rolle von CRL4 für die Spastinstabilität unterstreichen, können wir nicht ausschließen, dass andere CRLs oder andere abbauende Prozesse zur Kontrolle der Spastin-Homöostase beitragen können.

Um eine sehr spezifische Wiederherstellung des Spastinproteinspiegels zu erreichen, wird es wichtig sein, die DCAFs des CRL4/Spastin-Komplexes zu identifizieren. Zum Beispiel wurden Thalidomid und seine Derivate entwickelt, um auf Cereblon, ein DCAF von CRL4, zur Behandlung des multiplen Myeloms und anderer maligner Erkrankungen abzuzielen[53,54]. Obwohl weitere Experimente notwendig sind, um zu identifizieren, welche DCAFs spezifisch Spastin für die Polyubiquitinierung rekrutieren, können wir nun die Beweise für die Rolle von CRL4 nutzen, um diejenigen Substratrezeptoren zu identifizieren, die mit CRL4 bei der Polyubiquitinierung von Spastin zusammenarbeiten. Durch die Entschlüsselung der komplexen regulatorischen Mechanismen von Spastin und die Ausnutzung der Behandelbarkeit von CRL4 können wir den Weg für neuartige therapeutische Interventionen ebnen, die neue Hoffnung auf verbesserte klinische Ergebnisse bei SPG4-HSP-Patienten bieten.

Datenverfügbarkeit

Zusätzliche Daten, Materialien und Protokolle werden dem korrespondierenden Autor auf begründete Anfrage zur Verfügung gestellt.

Bestätigungen

Die Autoren danken den Patienten und Angehörigen für ihre Mitarbeit und Dr. Silvia Soddu für die kritische Lektüre des Manuskripts.

Finanzierung

Diese Studie wurde durch Zuschüsse von Telethon #GGP20040, AFM-Telethon #24904, dem MUR-PRIN (#2022WYCLTR) und European Union-NextGeneration EU PNRR-M6C2

Investition 2.1 Verbesserung und Stärkung der biomedizinischen Forschung im NHS, # PNRRMRI-2022-12376604 an CR; AFM-Telethon #23786, Euro-HSP und A.I.Vi.P.S. an F.S.; CNR (DBA. AD005.225-NUTRAGE-FOE2021) an C.R. und G.C.; CNR (Flagship Project Interomics) und EU-Förderung im Rahmen des MUR PNRR "Nationales Zentrum für Gentherapie und Arzneimittel auf der Grundlage von
RNA-Technologie" (# CN00000041 CN3 RNA) zu G.C.. Die Geldgeber spielten keine Rolle beim Studiendesign, bei der Datenerhebung und -analyse, bei der Entscheidung über die Veröffentlichung oder bei der Vorbereitung des Manuskripts.

Konkurrierende Interessen

Die Autoren berichten von keinen konkurrierenden Interessen

Ergänzendes Material

Ergänzendes Material ist bei *Brain* online verfügbar

Referenzen

1. Söderblom C, Blackstone C. Verkehrsunfälle: Molekulargenetische Einblicke in die Pathogenese der hereditären spastischen Querschnittslähmungen. *Pharmacol Ther*. 2006;109,42-56.

2. Lallemant-Dudek P, Darios F, Dürr A. Jüngste Fortschritte im Verständnis von hereditären spastischen Querschnittslähmungen und neuen Therapien. *Fac Rev*. 2021; 10;10:27.

3. Hazan J, Fonknechten N, Mavel D, et al. Spastin, ein neues AAA-Protein, ist bei der häufigsten Form der autosomal-dominanten spastischen Querschnittslähmung verändert. *Nat Genet.* 1999; 23(3):296-303.

1
4. Lindsey JC, Lusher ME, McDermott CJ, et al. Mutationsanalyse des Spastin-Gens (SPG4) bei
2
3
4 5. Solowska JM, Baas PW. Hereditäre spastische Querschnittlähmung SPG4: Was bekannt ist und was nicht bekannt
5 über die Krankheit*Gehirn* 2015; 138:2471-84.
6
7 6. Connell JW, Lindon C, Luzio JP, Reid E. Spastin koppelt Mikrotubuli durch Durchtrennung der Membran
8 Verkehr bei der Vervollständigung der Zytokinese *Verkehr* 2009; 10:42-56.
9
7. Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, et al. Spastin und ESCRT -III. Koordinaten-Mitosespindel
Demontage und Versiegelung der nuklearen Hülle. Natur. 2015; 522:231-5

8. Trotta N, Orso G, Rossetto MG, Daga A, Broadie K. Das hereditäre Gen für spastische Querschnittlähmung,
Spastin reguliert die Stabilität der Mikrotubuli, um die synaptische Struktur und Funktion zu modulieren. *Curr Biol*
2004; 14:1135-479.

9. Costa AC, Sousa MM. Die Rolle von Spastin in der Axonbiologie. *Front Cell Dev Biol* .
2022; 10:934522

10. Bürger J, Fonknechten N, Hoeltzenbein M, et al. Hereditäre spastische Querschnittlähmung durch
Mutationen im SPG4-Gen. *Eur J Hum Genet*.2000; 8:771-6.

Patienten mit hereditärer spastischer Paraparese. *J Med Genet.* 2000;37:759-65.

27

11. Shoukier M, Neesen J, Sauter SM, et al. Erweiterung des Mutationsspektrums, Bestimmung von Mutationsclusterregionen und prädiktive strukturelle Klassifikation von SPAST-Mutationen bei hereditären spastischen Querschnittslähmungen. *Eur J Hum Genet*. 2009; 17(2):187-94.

12. Riano E, Martignoni M, Mancuso G, et al. Pleiotrope Effekte von Spastin auf das Neuritenwachstum in Abhängigkeit von den Expressionsniveaus. *J Neurochem*. 2009; 108(5):1277-88.

1

2

3

4

5

6 14. Solowska JM, Rao AN, Baas PW. Verkürzung von SPAST-Mutationen im Zusammenhang mit
7 hereditäre spastische Paraplegie deuten auf eine stärkere Akkumulation und Toxizität der M1-Isoform von
8 Spastin.*Mol Biol Cell*. 2017; 28:1728-1737.

9

15. Mohan N, Qiang L, Morfini G, Baas PW. Therapeutische Strategien für mutiertes SPAST-Basiert Hereditäre spastische . *Gehirn-Sci*2021;11:1081.

16. Claudiani P, Riano E, Errico A, Andolfi G, Rugarli EI. Die subzelluläre Lokalisation von Spastin ist geregelt durch die Verwendung verschiedener Übersetzungsstartseiten und den aktiven Export aus dem Kern. *Exp Cell Res*. 2005; 309(2): 358- 369.

17. Du F, Ozdowski EF, Kotowski IK, Marchuk DA, Sherwood NT. Funktionelle Konservierung von humanes Spastin in einem Drosophila-Modell autosomal-dominanter hereditäre spastische *Summe Mol Genet*. 2010; 19:1883-96.

18. Havlíček S, Kohl Z, Mishra HK, et al. Gen-Dosierung-abhängige Rettung von HSP-Neuritendefekten in den Neuronen von SPG4-*Hum Mol* . 2014; 10:2527-41.

13. Solowska JM, Garbern JY, Baas PW. Evaluierung des Funktionsverlustes als Erklärung für eine SPG4-basierte hereditäre spastische Paraplegie. *Hum Mol Genet*. 2010; 19::2767-79.

27

19. Sardina F, Pisciottani A, Ferrara M, et al. Spastin-Erholung bei hereditärer spastischer Querschnittlähmung durch

Verhinderung des neddylierungsabhängigen Abbaus. *Life Sci Allianz*. 2020; 26; 3(12):E202000799

1

20. Sardina F, Conte A, Paladino S, Pierantoni GM, Rinaldo C. HIPK2 in der Physiologie des

2

3

4 21. Sardina F, Valente D, Fattorini G, et al. Neue zelluläre Bildgebungsmethode zur Unterscheidung

5 der SPG4-Subtyp der hereditären spastischen Querschnittslähmung. *Ann Clin Transl Neurol*. 2023; 30(6):1734-1744.

6

7 22. Emanuele MJ, Elia AE, Xu Q, et al. Globale Identifizierung von modularem Cullin-RING-Ligase

8 substrate. *Zelle*. 2011; 14; 147(2):459-74.

9

23. Soucy TA, Smith PG, Milhollen MA, et al. Ein Inhibitor von NEDD 8-aktivierendes Enzym als Neuer Ansatz zur Behandlung von *Natur* . 2009; 9; 458(7239):732-6.

24. Enchev RI, Schulman BA, Peter M. Protein-Neddylierung: jenseits von Cullin-RING-Ligasen. *NAT Rev Mol Cell Biol.* 2015; 16(1):30-44.

25. Zhao Y, Brickner JR, Majid MC, Mosammaparast N. Crosstalk zwischen Ubiquitin und anderen Bereitranslationale Modifikationen auf dem Chromatin während der Reparatur von Litzenbrüchen. Zelle "Trends" Biol. 2014; 24(7):426-34.

26. Migita K, Takayama T, Matsumoto S, et al. Prognostische Wirkung des RING-Box-Proteins-1 (RBX1)-Expression bei Magenkrebs. *Magenkrebs* . 2014; 17(4):601-9.

27. Pisciottani A, Biancolillo L, Ferrara M, et al. HIPK2 phosphoryliert den Mikrotubuli - Abtrennung des Enzyms Spastin bei S268 zur Aktivierung. *Zellen*. 2019; 8(7).

Nervensystems und ihre Auswirkungen auf neurologische Erkrankungen. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2023; 1870(5):119465.

28. Brent JR, Werner KM, McCabe BD. Drosophila-Larven-NMJ-Sektion. *J Vis Exp.* 2009; 4(24):1107.

29. Wu JS, Luo L. Ein Protokoll zum Sezieren von Drosophila melanogaster-Gehirnen für Live-Bildgebung oder Immunfärbung. *Nat Protoc*. 2006; 1(4):2110-5.

30. Madabattula ST, Strautman JC, Bysice AM, et al. Quantitative Analyse von Kletterdefekten in einem Drosophila-Modell neurodegenerativer Erkrankungen. J Vis Exp. 2015; 13; (100):E52741.

31. Liu X, Reitsma JM, Mamrosh JL, Zhang Y, Straube R, Deshaies RJ. Der Cand1-vermittelte adaptive Austauschmechanismus ermöglicht die Variation der F-Box-Proteinexpression. *Mol-Zelle*.
2018; 69(5):773-786.e6.

32. Reichermeier KM, Straube R, Reitsma JM, et al. Die PIKES-Analyse zeigt die Reaktion auf Degrader und die wichtigsten regulatorischen Mechanismen des CRL4-Netzwerks. *Mol-Zelle.* 2020; 77: 1092– 1106.e9.

33. Yang C, Wu J, He H, Liu H. Kleinmolekulare NSC1892 zielt auf die CUL4A/4B-DDB1-Wechselwirkungen ab und bewirkt eine Beeinträchtigung CRL4DCAF4 E3-Ligasen, um das Wachstum von Darmkrebszellen zu hemmen. *Int J Biol Sci*. 2020;16:1059-1070.

34. Tarrade A, Fassier C, Courageot S, et al. Eine Mutation von Spastin ist für Schwellungen und Transportstörungen in einer Region des Axons verantwortlich, die durch Veränderungen in der Zusammensetzung der Mikrotubuli gekennzeichnet ist. *Hum Mol Genet.* 2006;24:3544-58.

35. Kasher PR, De Vos KJ, Wharton SB, et al. Direkter Nachweis für axonale Transportdefekte in einem neuartigen Mausmodell von mutierter Spastin-induzierter hereditärer spastischer Paraplegie (HSP) und menschlichen HSP-Patienten. *J Neurochem*. 2009;110:34-44.

36. Sherwood NT, Sun Q, Xue M, Zhang B, Zinn K. Drosophila-Spastin reguliert synaptisch

1

2

3

4

5 2004; 14:1135_1147.

6

7 38. Orso, G., Martinuzzi, A., Rossetto, M.G., Sartori, E., Feany, M., und Daga, A. Krankheit-
8 verwandte Phänotypen in einem Drosophila-Modell der hereditären spastischen Paraplegie werden durch
9 Behandlung mit Vinblastin. *J. Clin.* . 2005; 115:3026_3034.

39. Brand, H., und Perrimon, N. Zielgerichtete Genexpression als Mittel zur Veränderung von Zellschicksalen und Generierung dominanter Phänotypen. *Entwicklung.* 1993; 118, 401_415.

40. Halder G, Callaerts P, Gehring WJ. Induktion ektopischer Augen durch gezielte Expression der augenloses Gen in Drosophila. *Wissensch.* 1995; 267(5205):1788-92.

41 Espino -Saldaña, A.E., Rodríguez -Ortiz, R., Pereida -Jaramillo, E., und Martinez -Torres, A. Modellierung neuronaler Erkrankungen im Zebrafisch in der Ära von CRISPR-Cas9. *Neurofermacle.* 2020; 18, 136-152.

42. Hay BA, Wolff T, Rubin GM. Die Expression des Baculovirus P35 verhindert den Zelltod bei Drosophila. *Entwicklung* . 1994; 120(8):2121-9.

Mikrotubuli-Netzwerke und wird für die normale Motorik benötigt. *PLoS Biol.* 2004; 12:e429.

37. Trotta, N., Orso, G., Rossetto, M.G., et al. Das hereditäre spastische Paraplegie-Gen, Spastin,

Reguliert die Stabilität der Mikrotubuli, um die synaptische Struktur und Funktion zu modulieren. *Curr Biol*.

10

11

12 13

14

15

16

17

18

19 20

21

22 23

24 43. Budnik V, Gorczyca M, Prokop A. Ausgewählte Methoden für die anatomische Untersuchung von Drosophila 25 embryonalen und larvalen neuromuskulären Verbindungen. *Int Rev Neurobiol*. 2006;75:323-65.

26

27 44. Budnik V, Zhong Y, Wu CF. Morphologische Plastizität von Motoraxonen in Drosophila-Mutanten

mit veränderter Erregbarkeit. *J Neurosci.* 1990; 10(11):3754-68.

45. Koh YH, Popova E, Thomas U, Griffith LC, Budnik V. Regulation der DLG-Lokalisation an Synapsen durch CaMKII-abhängige Phosphorylierung. *Zelle*. 1999; 98(3):353-63.

46. Tejedor FJ, Bokhari A, Rogero O, et al.. Essentielle Rolle von dlg bei der synaptischen Clusterbildung von Shaker K+-Kanälen in vivo. *J Neurosci*. 1997; 17(1):152-9.

47. Ozdowski, E.F., Gayle, S., Bao, H., Zhang, B., und Sherwood, N.T. Der Verlust von Drosophila melanogaster p21-aktivierter Kinase 3 unterdrückt Defekte in der Synapsenstruktur und -funktion, die durch Spastinmutationen verursacht werden. *Genetik*. 2011; 189, 123–135.

48. Vanden Broeck, L., Naval-Sánchez, M., Adachi, Y, et al. TDP-43 Funktionsverlust verursacht neuronalen Verlust aufgrund eines defekten Steroidrezeptor-vermittelten Genprogrammwechsels in Drosophila. *Zell-Rep*. 2013; 3:160–172.

49. Luan, H., Lemon, W.C., Peabody, N.C., et al. Funktionelle Dissektion eines neuronalen Netzwerks, das für die Bräunung der Kutikula und die Flügelexpansion in Drosophila erforderlich ist. *J. Neurosci*. 2006; 26:573–584.

50. Chen B, Feng Y, Zhang M, Cheng G, Chen B, Wang H. Das niedermolekulare TSC01682 hemmt das Zellwachstum von Osteosarkomen, indem es die CUL4B-DDB1-Interaktion spezifisch stört und die Ubiquitinierung von CRL4B E3-Ligasesubstraten verringert. *Am J Cancer Res*. 2019;9:18571870.

51. Wu K, Hopkins BD, Sanchez R, DeVita RJ, Pan ZQ. Cullin-RING E3 Ubiquitin Ligase 4 durch niedermolekulare Modulatoren. *J-Zell-Signal.* 2021;2:195-205.

52. Chen Z, Sui J, Zhang F, Zhang C. Proteine der Cullin-Familie und Tumorgenese: genetische Assoziation und molekulare Mechanismen. *J Krebs.* 2015;6:233-42.

53. Lu G, Middleton RE, Sun H, et al. Das Myelom-Medikament Lenalidomid fördert die zereblonabhängige Zerstörung von Ikaros-Proteinen. *Wissenschaft*. 2014; 343(6168):305-9.

54. Asatsuma-Okumura T, Ito T, Handa H. Molekulare Mechanismen von zereblonbasierten Medikamenten.
Pharmacol Ther. 2019;202:132-139.

Legenden von Abbildungen

Abbildung 1: Die Inaktivierung oder Herunterregulierung von CRLa erhöht den Proteinspiegel von Spastin, indem sie seine Ubiquitinierung reduziert. (Ein) Repräsentative WB mit erhöhten Spastinproteinspiegeln in HeLa-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion von Vektoren, die die DN-Formen der angegebenen Culline exprimieren. Die Intensität der Spastinbanden wurde quantifiziert und mit Hilfe der Intensität der GAPDH-Bande normalisiert. Die Quantifizierung wird in beliebiger Einheit relativ zur Kontrolle (leerer Vektor) im Histogramm als Mittelwert ±Standardabweichung (SD) *n=3.* ****P<0,001*, Einweg-ANOVA mit Dunnetts Post-hoc-Test angegeben. **(B**) HeLa-Zellen wurden mit einer Mischung aus Cul4a-spezifischen (siCul4a) oder Negativkontrolle (SiCtr) validierten Stealth-siRNAs transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion mittels WB analysiert. Repräsentativer WB ist dargestellt, die Spastin-Quantifizierung wird als Mittelwert ± SD angegeben, *n=4.* ***P<0,01*, ungepaarter t-Test. **(C)** Assays zur Ubiquitinierung von Spastin. HeLa-Zellen wurden mit indizierten siRNAs in Kombination mit dem Vektor, der Ub-HA exprimiert, transfiziert und mit 20□□ MG132 behandelt, um den Proteasomabbau von polyubiquitinierten Proteinen oder seinem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) 8 Stunden vor der Lyse zu hemmen. TCE wurden mit Anti-Spastin Ab

immunpräzipitiert und 24 Stunden nach der Transfektion mittels WB analysiert. Die Intensität der Spastin-Ub-HA-Leiter wurde durch die Intensität von Spastin in den IP-Fraktionen normalisiert und im Vergleich zu siCtr-DMSO-behandelten Zellen als Mittelwert ± SD angegeben, *n=3. *P<0,05*, ungepaarter-t-Test. (**D**) HeLa-Zellen wurden mit einer Mischung aus indizierter validierter Stealth-siRNA transfiziert und 24 Stunden nach der Transfektion mittels WB analysiert. Repräsentative WB ist dargestellt, die Spastin-Quantifizierung wird als Mittelwert ± SD angegeben, *n=4*. ***P<0,01*, ungepaarter t-Test. (**E**) HeLa-Zellen wurden wie in D transfiziert und 8 Stunden nach der Transfektion mit DMSO oder 25 □g/ml Cycloeximid (CHX) behandelt. Repräsentative WB, die 16 Stunden nach der Behandlung durchgeführt wurde, ist zu sehen. Die Spastin-Quantifizierung wird als Mittelwert ± SD angegeben, *n=4. *P<0,05*, ns, statistisch nicht signifikant, ungepaarter t-Test. **(F-G**) Repräsentative Co-IP, die die Interaktion zwischen Cul4a und Spastin *in vitro* und in vivo zeigt. In **F** wurden HeLa-Zellen mit einem Vektor transfiziert, der den Myc-markierten Wildtyp Cul4a oder einen leeren Vektor exprimiert. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion lysiert und TCE wurde mit Anti-Spastin Ab immunpräzipitiert und mit WB mit indizierten Abs analysiert. In **G** Interaktion von körpereigenen Proteinen im Hirngewebe. Ganzes Hirngewebe (Geschenk von S. Soddu, IRE-IRCCS, Rom, Italien) von einer erwachsenen Maus wurde lysiert, und TCE wurde mit Anti-Spastin-Ab oder Maus-IgG als negative Isotypkontrolle immunpräzipitiert und von WB mit indizierten Abs. Als Negativkontrolle wurde ein weiteres Mitglied der Cullin-Familie, wie z.B. Cul2, eingeschlossen. TCE- und IP-Proben wurden auf dasselbe Gel geladen und auf demselben Filter verarbeitet. Die Kleckse wurden vertikal beschnitten, um entsprechende Expositionen zu zeigen.

Abbildung 2 Die Behandlung mit NSC1892 hemmt die Polyubiquitinierung von Spastin, erhöht seinen Spiegel und reduziert Defekte in patienteneigenen Zellen. (**A**) Spastin-Ubiquitinierung in vivo Assays nach NSC1892 Behandlung. HCT116-Zellen wurden mit einem Vektor, der Ub-HA exprimiert, transfiziert und 21 Stunden lang mit 2□M NSC1892 oder seinem Lösungsmittel DMSO behandelt, MG132 wurde 7 Stunden vor der Lyse hinzugefügt, um den Proteasomabbau von polyubiquitinierten Proteinen zu hemmen. TCE wurden mit Anti-Spastin Ab immunpräzipitiert und mittels WB analysiert. Die Intensität der Spastin-Ub-HA-Leiter wurde durch die Intensität von Spastin in der IP-Fraktion normalisiert und im Vergleich zu DMSO-

behandelten Zellen als Mittelwert ± SD, *n = 3 ***P<0,001*, ungepaarter t-Test angegeben. (**B**) HCT116-Zellen wurden mit 2□M NSC1892 oder seinem Lösungsmittel DMSO behandelt und 21 Stunden nach der Behandlung mit indizierten Abs. Die Spastin-Quantifizierung wird als mittlere ± SD, *n=3, angegeben*. ***P<0,001*, ungepaarter t-Test. (**C-E**) SPG4-LCLs wurden mit 2□M NSC1892 oder seinem Lösungsmittel DMSO behandelt und 24 Stunden nach der Behandlung mittels WB oder IF analysiert. In **C,** repräsentativer WB; p27-Anstieg wird als Positivkontrolle für NSC1892 Behandlung gezeigt. Die Quantifizierung der Daten in Bezug auf die Lösungsmittelbehandlung ist Mittelwert ± SD, *n=3. *P<0,05*, ungepaarter t-Test. In **D wurden** repräsentative Bilder der angedeuteten Zellen gezeigt, die zeigen, dass die polarisierte MT-Zytoskelettorganisation, die typisch für SPG4-LCLs ist, durch NSC1892 Behandlung gerettet wurde; Anti-Betatubulin Ab wird verwendet, um das MT-Zytoskelett und Hoechst für die Zellkernmarkierung zu markieren. Maßstabsleiste, 10□M. In **E** wird ein abgeschnittenes Geigendiagramm gezeigt, in dem der dcnc-Parameter verglichen wird. Die bildgebende Analyse wurde mit einer maßgeschneiderten CellProfiler-Pipeline durchgeführt, da in Sardina et al 2023[25] mindestens 300 Zellen in drei unabhängigen Experimenten analysiert wurden und die gruppierte Analyse gezeigt wird

(*n=1380* Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, und *n=1616* Zellen, die mit NSC1892 behandelt wurden). **P<0,01*, MannWhitney-Test. Das Diagramm enthält den Median (gestrichelte Linien), das erste und dritte Quartil (gestrichelte Linien) und das Dichtediagramm (äußere Linien).

Abbildung 3: Die RNAi-vermittelte Herunterregulierung von Cul4 rettet SPG4-HSP-ähnliche Phänotypen (**A-B)** RT-PCRs auf RNAs, die aus den Köpfen erwachsener Fliegen extrahiert wurden und die indizierten RNAi-Konstrukte unter der Kontrolle von *elav-GAL4* exprimieren. Die mRNA-Expressionswerte wurden nach Normalisierung mit dem Housekeeping-Gen *Giotto bestimmt*. *P<0,001* und **P< 0,05*, ungepaarter t-Test. (**C**) Quantifizierung der Bewegungsaktivität der Fliege durch Bestimmung des Prozentsatzes der erwachsenen Fliegen, die die angegebenen RNAi-Konstrukte exprimieren, unter Kontrolle von *elav-GAL4*, die den Zielabstand von 4 cm in 5 Sekunden erreichen (Kontrolle *n=48* Fliegen, Cul4-RNAi *n=79* Fliegen, Spastin-RNAi *n=37* Fliegen, Cul4-RNAi; Spastin RNAi *n=59* Fliegen). Das Diagramm der

abgeschnittenen Violine enthält den Median (gestrichelte Linien), das erste und dritte Quartil (gestrichelte Linien) und das Dichtediagramm (äußere Linien). ***P<0,01* und **P<0,05* Einweg-ANOVA und Mehrfachvergleichstests von Tukey. (**D**) Repräsentative Bilder von Drosophila-Augen von erwachsenen Fliegen, die die angegebenen Konstrukte unter Kontrolle von *augenlosem* GAL4 exprimieren. Der vollständige Verlust mindestens eines Auges oder eine signifikante Verkleinerung der Augenpartie wird bei Spastin-RNAi-Fliegen beobachtet. (**E**) Quantifizierung der mittleren Augenfläche der Fliegen mit den angegebenen Genotypen. ****P<0,001*, einfache Arbeit

Die mehrfachen Vergleichstests von ANOVA und Tukey. Pro Genotyp wurden mehr als 50 Augen analysiert.

Das abgeschnittene Violindiagramm enthält alle Datenpunkte, den Median (gestrichelte Linien), das erste und dritte Quartil (gestrichelte Linien) und das Dichtediagramm (äußere Linien). (**F**) Repräsentative WB auf Gesamtproteinextrakten, die aus Fliegenköpfen gewonnen werden, die die angegebenen Konstrukte unter der Kontrolle des GMR-GAL4-Treibers exprimieren. (**G**) Spastin-Quantifizierung, normalisiert unter Verwendung der Ponceau-Färbung als Beladungskontrolle. Mittelwert ± SD *n=4. *P<0,05*, ungepaarter t-Test.

Abbildung 4: Spastin RNAi beeinflusst die NMJ-Morphologie und die Cul4-Herunterregulierung rettet diese Veränderungen signifikant. (**A-H**) Die NMJs der Larven des dritten Instars auf den Muskeln 6 und 7 der Fliegen, die die angegebenen Konstrukte unter der Kontrolle des *elav-GAL4-Treibers* exprimierten, wurden mittels IF analysiert. (**A**) NMJ-repräsentative Bilder nach Färbung mit Anti-HRP zur Hervorhebung präsynaptischer Membranen. Die Bouton-Morphologie ändert sich, wenn Spastin herunterreguliert wird, wird aber durch Cul4-RNAi signifikant wiederhergestellt. (**B**) Die Fläche aller Boutons jedes NMJ wurde gemessen. Die Fläche jedes abnormen Boutons, die über einem festgelegten Schwellenwert lag (Bereich >1000 AE), wurde berücksichtigt und summiert. Die Gesamtfläche, die von allen abnormen Boutons jedes NMJ eingenommen wurde, wurde für die Länge aller NMJ-Zweige normalisiert. Für jeden Genotyp wurden mindestens 18 NMJs analysiert (Kontrolle *n=18* NMJs, Spastin-RNAi *n=44* NMJs und Spastin-RNAi; Cul4-RNAi *n=34* NMJs). ****P<0,001*, unidirektionale ANOVA und

Der mehrfache Vergleichstest von Tukey. (**C**) NMJs wurden mit Anti-HRP und Anti-Discs large, einem Marker des subsynaptischen Retikulums, kogefärbt. (**D**) Die große Signalintensität der Discs wurde nach der Hintergrundsubtraktion gemessen und zur Normalisierung durch die NMJ-Gesamtfläche dividiert. Für jeden Genotyp wurden mindestens 18 NMJs analysiert (Kontrolle *n=18* NMJs, Spastin-RNAi *n=44* NMJs und Spastin-RNAi; Cul4-RNAi *n=34* NMJs). ***$P < 0{,}001$, Einweg-ANOVA und Tukey's Mehrfachvergleichstest. (**E**) NMJs wurden zusammen mit Anti-HRP und Anti-BRP gefärbt, was die T-Bar-Spezialisierung in der aktiven Zone markiert. (**F**) Die Intensität des BRP-Signals wurde nach der Subtraktion des Hintergrunds gemessen und zur Normalisierung durch die NMJ-Gesamtfläche dividiert. Es wurden mindestens 10 NMJs pro Genotyp analysiert (Kontrolle *n=10* NMJs, Spastin-RNAi *n=10* NMJs und Spastin-RNAi/Cul4-RNAi *n=15* NMJs). $P<0{,}001$, Einweg-ANOVA und Tukey's Mehrfachvergleichstest. (**G**) NMJs wurden zusammen mit Anti-HRP und Anti-Futsch gefärbt, die einen präsynaptischen MT-assoziierten Marker markieren. (**H**) Quantifizierung der Futsch-Signalintensität. Nach der Hintergrundsubtraktion wurden die Signale zur Normalisierung durch die NMJ-Gesamtfläche dividiert. Pro Genotyp wurden mindestens 8 NMJs analysiert (Kontrolle *n=12* NMJs, Spastin-RNAi *n=8* NMJs und Spastin-RNAi; Cul4-RNAi *n=9* NMJs).**$P<0{,}01$, $P<0{,}001$, Einweg-ANOVA und Tukey's Mehrfachvergleichstest. Alle Kreuze für die NMJ-Analyse wurden bei 29°C gehalten. Maßstabsleisten, 10 µm. Die Bruchdiagramme der Violine enthalten den Median (gestrichelte Linien), das erste und dritte Quartil (gestrichelte Linien) und das Dichtediagramm (äußere Linien).

Abbildung 5: Die Züchtung von Fliegen in Nahrung, die mit NSC1892 ergänzt wird, erhöht den Spastinspiegel und rettet Defekte im Fliegenmodell von SPG4-HSP. (**A**) Repräsentative Bilder von Fliegen, die UASspastin-RNAi früh während der Augenentwicklung exprimieren (*augenlose-GAL4), die mit Nahrung gezüchtet* wurden, die 3 µM NSC1892 oder Wasser enthielt. Es ist zu beachten, dass im Gegensatz zu In-vitro-Experimenten NSC1892 Pulver für alle In-vivo-Assays frisch in Wasser hergestellt wurde. (**B**) Quantifizierung der Augenpartie von Fliegen entsprechend jeder Behandlung in drei unabhängigen Experimenten. Die gruppierte Analyse des

174 Mittelwerts der Augenpartie ergab sich für *n=174* Fliegen, die in Wasser gezüchtet wurden, und
175 n=*102* Fliegen, die in

NSC1892-ergänzte Nahrung. *P<0,001* Mann-Whitney-Test. (**C-D**) In **C**, repräsentative WB über die Gesamtproteinextrakte, die aus indizierten Fliegen, die mit Futter gezüchtet werden, das 3 NSC1892 oder Wasser. In **D**, durchgeführte und berichtete Spastin-Quantifizierung gemäß 3L, Mittelwerte ± SD, *n=3. *P<0,05* Einweg-ANOVA und Tukey's Mehrfachvergleichstest. (**E**) Bewegungsaktivität von Fliegen, die UAS exprimierten Spastin-RNAi unter der Kontrolle von *elav*-GAL4-Treiber, der mit Lebensmitteln mit 3 □M NSC1892 oder Wasser wird quantifiziert und wie in 3F angegeben in drei unabhängigen Experimente. Gruppierte Analysen von Ens werden mehr als 100 Fliegen pro Zustand angezeigt. *P<0,05 , ungepaarter t-Test. Das Truncated Violin Plots berichten Median (gestrichelte Linien), erstes und drittes Quartil (gestrichelte Linien) und Dichtediagramm (Außenlinien)

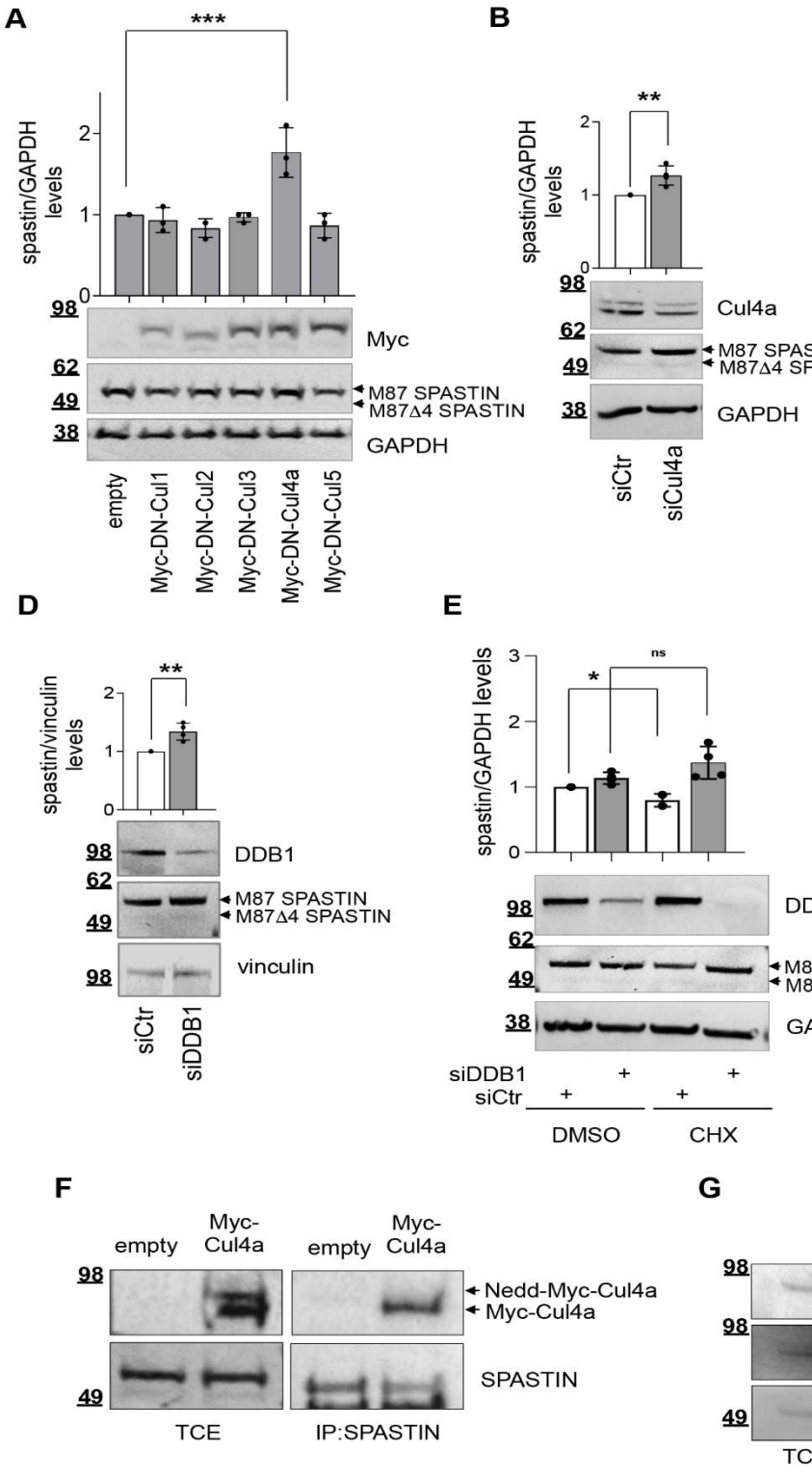

A
***
spastin/GAPDH levels
2
1
0
98
62
49
38
Myc
M87 SPASTIN
M87Δ4 SPASTIN
GAPDH
empty
Myc-DN-Cul1
Myc-DN-Cul2
Myc-DN-Cul3
Myc-DN-Cul4a
Myc-DN-Cul5
B
**
spastin/GAPDH levels
Cul4a
siCtr
siCul4a
D
**
spastin/vinculin levels
DDB1
M87 SPASTIN
M87Δ4 SPASTIN
vinculin
siCtr
siDDB1
E
ns
*
spastin/GAPDH levels
siDDB1
siCtr
DMSO
CHX
F
empty
Myc-Cul4a
Nedd-Myc-Cul4a
Myc-Cul4a
SPASTIN
TCE
IP:SPASTIN
G

Abbildung 1

188x234 Millimeter (x DPI)

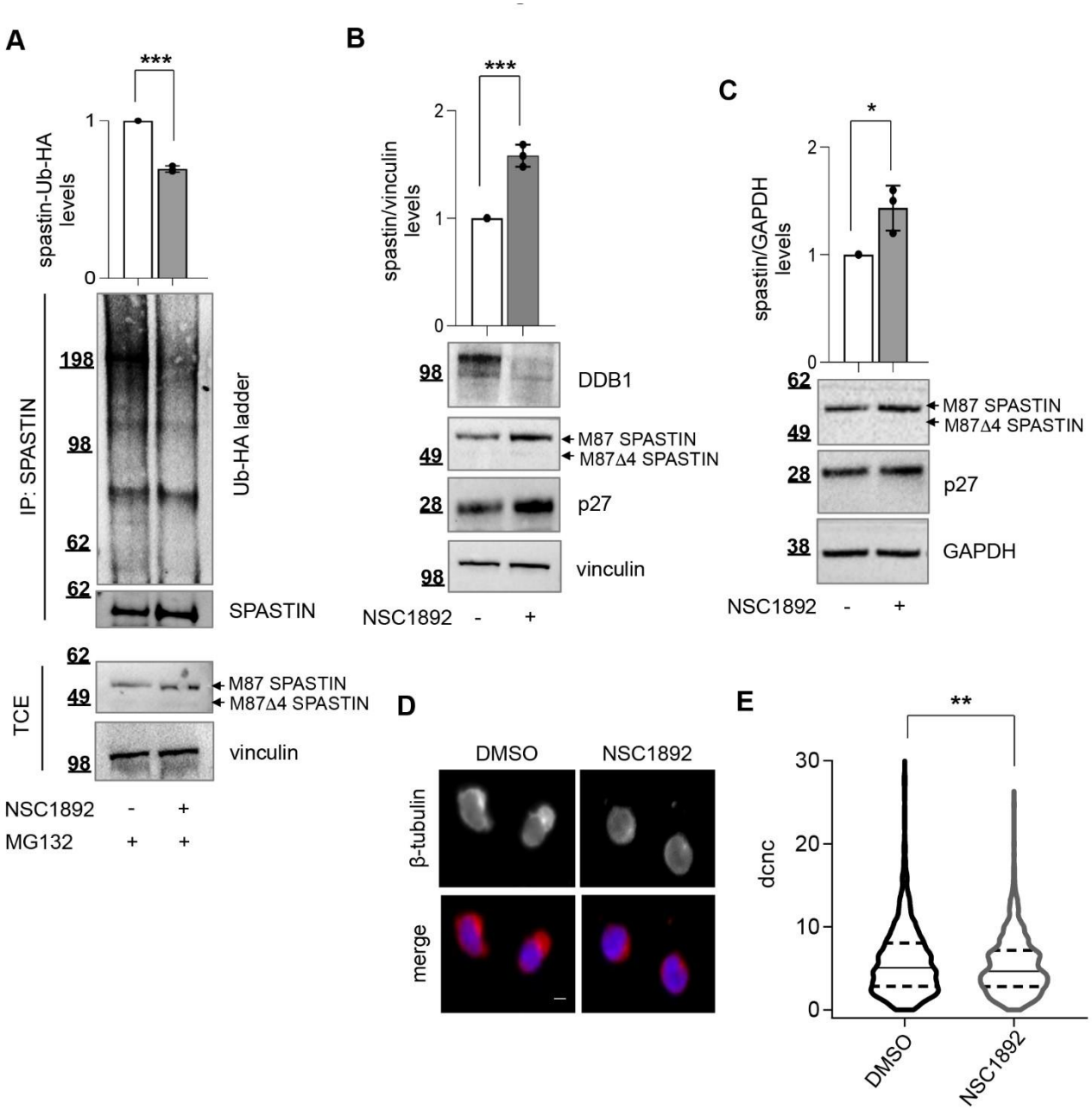
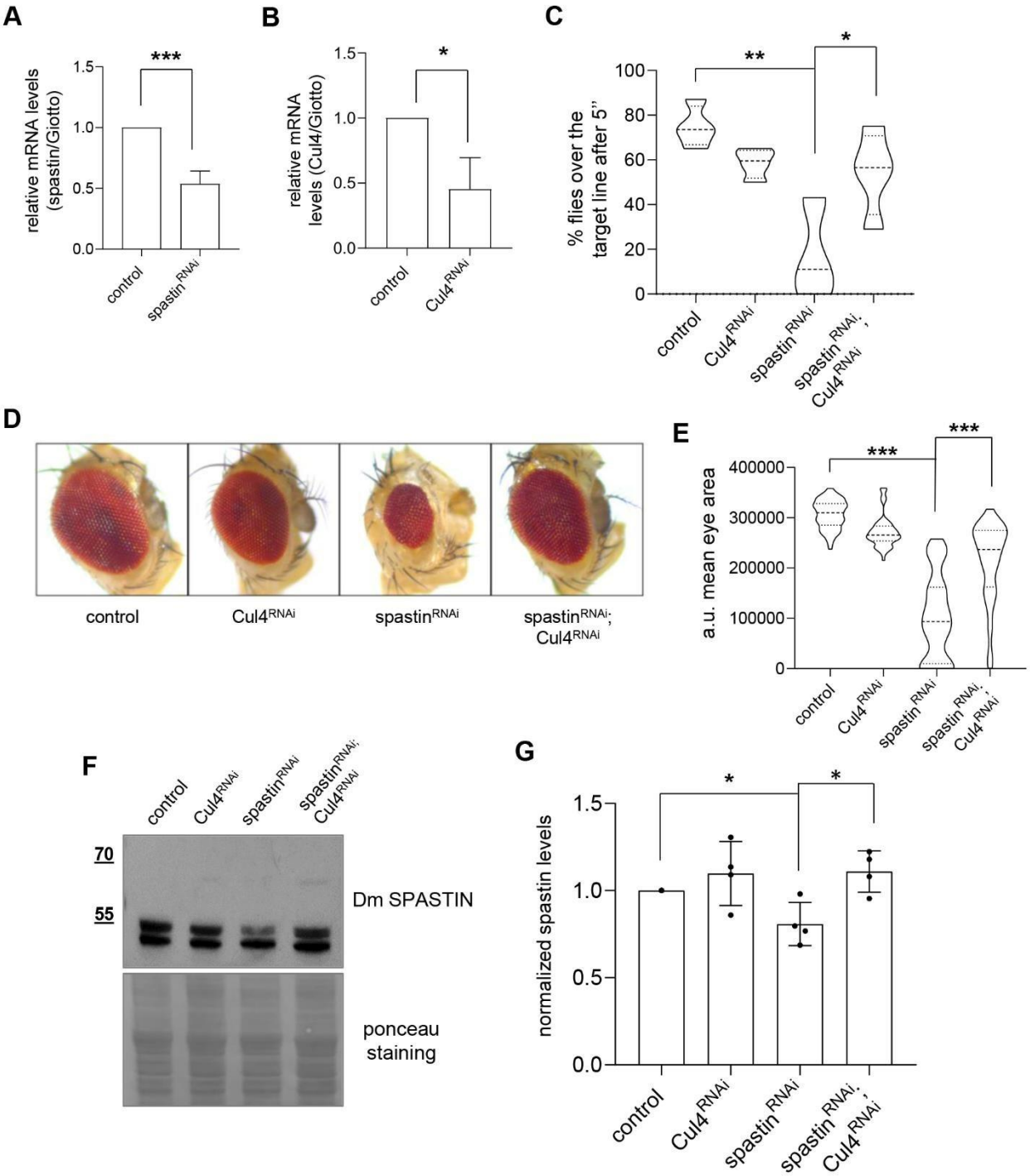


Abbildung 2

175x171 cmm m (x)



Abbildung

1

2

3 *170x192 Millimeter (x DPI)*

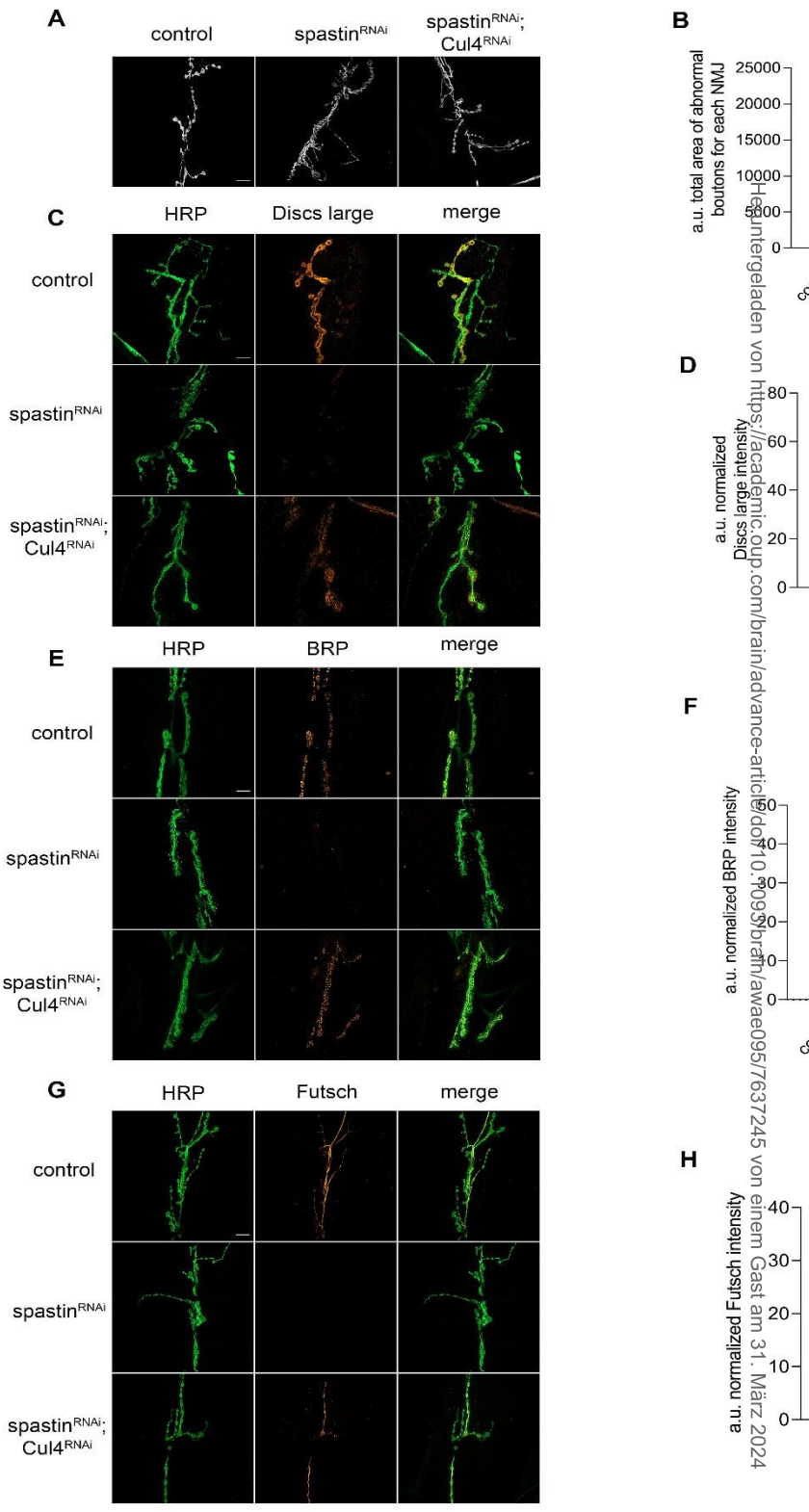
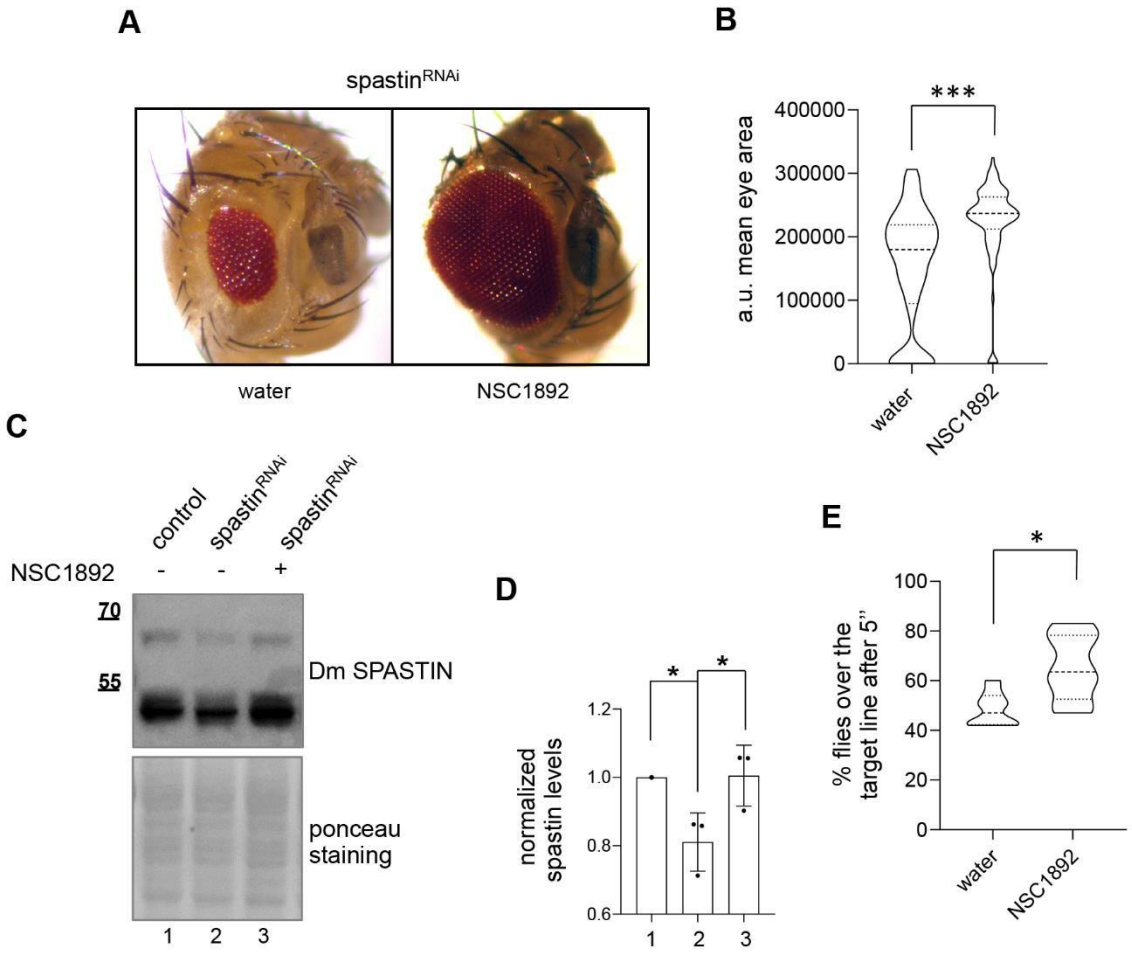


Abbildung 4

Heruntergeladen von https://academic.oup.com/brain/advance-article/doi/10.1093/brain/awae095/7637245 von einem Gast am 31. März 2024

3 *189x285 Millimeter (x DPI)*

4



1

2 *Abbildung*

3 *156x133 cmm m (x)*