

Biochemische Analyse der  
Dimerisierungseigenschaften der Bestrophine und  
molekularbiologische Charakterisierung des  
VMD2 Promotors



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von  
Florian Rauscher

aus  
Nabburg

im Jahr 2010

Promotionskolloquium am 09.02.2011

Prof. Dr. Reinhard Wirth	(Prüfungsvorsitzender)
Prof. Dr. Rüdiger Schmitt	(Erstgutachter)
Prof. Dr. Bernhard Weber	(Zweitgutachter)
Prof. Dr. Stephan Schneuwly	(Drittprüfer)
Prof. Dr. Ernst Tamm	(Ersatzprüfer)

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 20.09.2010

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Bernhard Weber

Unterschrift: .....  
(Florian Rauscher)

*Meinen Eltern*

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Professor Dr. Bernhard Weber, für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten an seinem Institut durchführen zu dürfen, für das Bereitstellen der umfassenden finanziellen Mittel, für viele so wichtige und anregende Diskussionen und für die engagierte Betreuung meiner Arbeit.

Zu großem Dank fühle ich mich auch Professor Dr. Rüdiger Schmitt verpflichtet, für die wissenschaftliche Reflexion im Rahmen der Laborseminare, die Unterstützung auf dem langen Weg bis zur Abgabe der Promotionsschrift und für die selbstlose Übernahme der Erstgutachterfunktion von Seiten der Naturwissenschaftlichen Fakultät III der Universität Regensburg.

Meinen lieben Kolleginnen und Kollegen Britta Fiebig, Thomas Loenhardt und Barbara Bathke gebührt besonders herzlicher Dank für die emotionale Unterstützung im Beruflichen wie im Privaten. Ohne Euch wäre so manche schwierige Stunde in der Wissenschaft und im Privaten nicht so leicht an mir vorüber gegangen.

Vladimir und Andrea Milenkovic danke ich von Herzen für die immer herzliche Aufnahme und die Betreuung und Einführung in diverse Labortechniken, insbesondere zu Beginn meiner Doktorarbeit.

Thomas Langmann gebührt Dank für sein unermüdliches Engagement für die Wissenschaft und die Bemühungen um die Fitness der Humangenetik. Speziell bei der Promotoranalyse war er mir eine nicht zu ersetzende Unterstützung.

Bedanken möchte ich mich auch bei all den Kollegen aus Würzburg und Regensburg, die mich bei meinem wissenschaftlichen Werdegang begleitet und unterstützt haben.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, für all ihre Unterstützung durch die mein Studium und die Doktorarbeit erst möglich wurden. In Dankbarkeit und Liebe ist ihnen diese Arbeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das menschliche Auge .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Erbliche Makuladegenerationen .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Das VMD2 Gen .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Expression des VMD2 Gens .....</b>	<b>6</b>
<b>1.5 VMD2 Promotor .....</b>	<b>6</b>
<b>1.6 Bestrophin - Topologie und Struktur .....</b>	<b>7</b>
<b>1.7 Bestrophin Oligomerisierung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.8 Bestrophin Proteinlokalisierung .....</b>	<b>8</b>
<b>1.9 Bestrophin Proteinfunktion .....</b>	<b>8</b>
<b>1.10 Bestrophin-1 assoziierte Vitreoretinopathien .....</b>	<b>10</b>
<b>1.10.1 VMD2: Vitelliforme Makuladystrophie Typ 2 (Morbus Best) .....</b>	<b>12</b>
<b>1.10.2 AVMD: Adulte vitelliforme Makuladystrophie .....</b>	<b>13</b>
<b>1.10.3 ADVIRC: Autosomale Dominante Vitreoretinochoroidopathie .....</b>	<b>14</b>
<b>1.10.4 ARB: Autosomale Rezessive Bestrophinopathie .....</b>	<b>14</b>
<b>1.10.5 AMD: Altersabhängige Makuladegeneration .....</b>	<b>15</b>
<b>1.11 Zielsetzung der Dissertation .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Material .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 Antikörper .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 Kommerzielle Kits .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 <i>E. coli</i> Stämme .....</b>	<b>18</b>
<b>2.4 Plasmide .....</b>	<b>18</b>
<b>2.5 Eukaryotische Zelllinien .....</b>	<b>18</b>
<b>3. Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 DNA-spezifische Methoden .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2 DNA-Gelelektrophorese .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNA +RNA) – photometrisch .....</b>	<b>21</b>

<b>3.1.4 Relative Quantifizierung von DNA PCR-Fragmenten – densiometrisch .....</b>	<b>21</b>
<b>3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearen DNA-Fragmenten .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen.....</b>	<b>22</b>
<b>3.1.7 Plasmid-Vektor Dephosphorylierung .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1.9 T/A -Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Vektorsystem.....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.10 Einfügen spezifischer Mutation in Plasmid-DNA mittels positionsspezifischer Mutagenese (site-directed-mutagenesis) .....</b>	<b>24</b>
<b>3.1.11 Direkte Sequenzierung von DNA nach Sanger .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 RNA-spezifische Methoden .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zelllinien .....</b>	<b>27</b>
<b>3.2.2 cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3 Proteinspezifische Methoden .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.1 Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>.....</b>	<b>28</b>
<b>3.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Einschlusskörperchen (inclusion bodies) ..</b>	<b>29</b>
<b>3.3.3 Aufreinigung von rekombinaten Proteinen durch Affinitätschromatographie.....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.4 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford .....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.6 Immunoblot (Western Blot).....</b>	<b>32</b>
<b>3.4 Mikrobiologische Methoden.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> K12 Stämmen .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien .....</b>	<b>33</b>
<b>3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5 Zellkultur-spezifische Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....</b>	<b>34</b>
<b>3.5.2 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien.....</b>	<b>35</b>
<b>3.6 Sonstige Methoden .....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.1. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....</b>	<b>35</b>
<b>3.6.2 Luziferase-Reportergen-Assay .....</b>	<b>38</b>
<b>3.6.3 ToxR-Dimerisierungsassay .....</b>	<b>39</b>
<b>3.6.4 Membranintegrationsassay.....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.5 Detergenzien-Dimerisierungsassay .....</b>	<b>40</b>
<b>3.6.7 Exon-trapping-Assay .....</b>	<b>41</b>
<b>4. Durchführung und Ergebnisse .....</b>	<b>43</b>

<b>4.1 Dimerisierungseigenschaften der Transmembrandomänen der humanen Bestrophin Proteinfamilie – Einfluss von Mutationen auf die Dimerisierung .....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1 Definition der TMD Sequenzabschnitte von Bestrophin-1-4.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1.1.1 Auswahl der Bestrophin-1 Mutationen .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2. ToxR-basierte <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1.2.1 Klonierung der TMD1-6 der humanen Bestrophine 1-4 und der TMD1-6 Mutationen von Bestrophin-1.....</b>	<b>47</b>
<b>4.1.2.2 Analyseablauf ToxR-basierte <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1.2.3 Ergebnisse der ToxR-basierten <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse von TMD1-6 der Bestrophine 1-4 .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2.4 Ergebnisse der ToxR-basierten <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse - wildtypische und mutierte TMD1-6 von Bestrophin-1 .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1.2.5 Ergebnisse der ToxR-basierten <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse – putatives Dimerisierungsmotiv in TMD2 von Bestrophin-1 .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1.2.6 MaLE Komplementierungsassay .....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.2.7 Analyseablauf MaLE-Komplementierungssassay .....</b>	<b>55</b>
<b>4.1.2.8 Ergebnisse MaLE Komplementierungsassay von TMD1-6 der Bestrophine 1-4 ..</b>	<b>57</b>
<b>4.1.2.9 Kontrolle der Fusionsproteinexpression .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1.3 <i>In vitro</i> Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.3.1 Klonierung der wildtypischen und mutierten TMD1-6 des Bestrophin-1 .....</b>	<b>62</b>
<b>4.1.3.2 Analyseablauf Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay .....</b>	<b>65</b>
<b>4.1.3.3 Ergebnisse <i>in vitro</i> Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay Kontrollkonstrukte sowie wildtypische &amp; mutierte TMD1-6 des Bestrophin-1 .....</b>	<b>67</b>
<b>4.2 Charakterisierung des humanen VMD2 Promotors.....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.1 Identifikation von evolutionär konservierten Sequenzabschnitten des VMD2 Promotors .....</b>	<b>69</b>
<b>4.2.2 Analyse der regulatorischen Funktion der evolutionär konservierten Sequenzabschnitte und vorhergesagten Promotorbereiche in der 5'-Region von VMD2 ...</b>	<b>71</b>
<b>4.2.3 Klonierung der potentiell regulatorischen Sequenzabschnitte (RE) aus dem 5'-Bereich von VMD2 .....</b>	<b>71</b>
<b>4.2.4 Analyseablauf Luziferase Reporterassay .....</b>	<b>73</b>
<b>4.2.5 Identifizierung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) in der Sequenz von RE4 von VMD2.....</b>	<b>77</b>
<b>4.2.6 <i>In silico</i> Analyse des Einflusses der beiden SNPs auf Transkriptionsfaktor-Bindestellen im VMD2_RE4.....</b>	<b>79</b>
<b>4.2.7 Experimentelle Analyse von Allel-spezifischen Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich von rs3758976 und rs972355.....</b>	<b>85</b>

<b>4.2.8 Analyseablauf EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) .....</b>	<b>85</b>
<b>4.3 Mutation im Exon 6 des humanen VMD2 Gens – Auswirkungen auf das Spleißen.....</b>	<b>89</b>
<b>4.3.1 Klonierung des Mini-Gen Konstuktes .....</b>	<b>89</b>
<b>4.3.2 Klonierung der Patienten-spezifischen Mutationen .....</b>	<b>91</b>
<b>4.3.3 Analyseablauf Exon-Trapping .....</b>	<b>92</b>
<b>4.3.4 Ergebnisse Exon-trapping.....</b>	<b>96</b>
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>98</b>
<b>5.1 Dimerisierungsanalysen.....</b>	<b>98</b>
<b>5.1.1 Grundlagen.....</b>	<b>98</b>
<b>5.1.2 Vorteile der ToxR basierten Dimerisierungsanalyse.....</b>	<b>98</b>
<b>5.1.3 ToxR-basierte <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse der TMD1-6 der humanen Bestrophin-Proteinfamilie.....</b>	<b>99</b>
<b>5.1.4 ToxR-basierte <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse der TMD1-6 Mutationen von Bestrophin-1 .....</b>	<b>100</b>
<b>5.1.5 Analyse des putativen Dimerisierungsmotives in TMD2 von Bestrophin-1 .....</b>	<b>100</b>
<b>5.1.6 Rückschlüsse auf die Topologie der Bestrophin-Proteinfamilie.....</b>	<b>101</b>
<b>5.1.7 Zusammenfassung und Limitierungen der ToxR-basierten <i>in vivo</i> Dimerisierungsanalyse .....</b>	<b>102</b>
<b>5.1.8 Vorteile des <i>in vitro</i> Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsansatzes.....</b>	<b>103</b>
<b>5.1.9 <i>In vitro</i> Dimerisierung von TMD1-6 von Bestrophin-1 .....</b>	<b>103</b>
<b>5.1.10 <i>In vitro</i> Dimerisierung der TMD1 und TMD5 Mutationen von Bestrophin-1 .....</b>	<b>104</b>
<b>5.1.11 Zusammenfassung und Limitierungen der <i>in vitro</i> Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse .....</b>	<b>104</b>
<b>5.2 Charakterisierung des humanen VMD2 Promoters.....</b>	<b>106</b>
<b>5.2.1 Grundlagen.....</b>	<b>106</b>
<b>5.2.2 Bioinformatische Vorhersage von evolutionär konservierten Regionen und Promotoren.....</b>	<b>107</b>
<b>5.2.3 <i>In vitro</i> Analyse der evolutionär konservierten Regionen und der <i>in silico</i> vorhergesagten Promotoren .....</b>	<b>107</b>
<b>5.2.4 Einfluss von SNPs auf die VMD2 Promotoraktivität .....</b>	<b>108</b>
<b>5.2.5 Zusammenfassung und Limitierungen der <i>in vitro</i> VMD2 Promotoranalyse .....</b>	<b>110</b>
<b>5.3 Exontrapping: Mutation im Exon 6 des humanen VMD2 Gens – Auswirkungen auf das Spleißen.....</b>	<b>111</b>
<b>5.3.1 Grundlagen.....</b>	<b>111</b>
<b>5.3.2 Einfluss von VMD2 Mutationen auf das Spleißverhalten in einer <i>in vitro</i> Analyse ..</b>	<b>111</b>

<b>6. Zusammenfassung - Summary .....</b>	<b>113</b>
<b>6.1 Zusammenfassung: .....</b>	<b>113</b>
<b>6.2 Summary.....</b>	<b>115</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>117</b>
<b>8. Anhang.....</b>	<b>124</b>
<b>8.1 Oligonukleotide (Primer) .....</b>	<b>124</b>
<b>8.1.1 Oligonukleotide für ToxR Assay .....</b>	<b>124</b>
<b>8.1.2 Oligonukleotide für Detergenzien-Dimerisierungs-Assay.....</b>	<b>125</b>
<b>8.1.3 Oligonukleotide für Luziferase-Assay pGL4.10-Konstrukte.....</b>	<b>125</b>
<b>8.1.4 Oligonukleotide für EMSA .....</b>	<b>126</b>
<b>8.1.5 Oligonukleotide für Mutagenese Exontrapping-Assay .....</b>	<b>126</b>
<b>8.1.6 Oligonukleotide für RT-PCR.....</b>	<b>126</b>
<b>8.1.7 Oligonukleotide für Sequenzierung &amp; Kolonie-PCR .....</b>	<b>127</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das menschliche Auge

Das menschliche Auge mit seinen ca. 130 Millionen Photorezeptoren ermöglicht die Wahrnehmung elektromagnetischer Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts von 380-700nm Wellenlänge. In dem 3-lagigen konzentrischen Aufbau des Auges aus Tunica externa bulbi, Tunica media bulbi und Tunica interna bulbi nimmt die hoch komplexe Retina mit ihrem 10-schichtigen Aufbau die zentrale Rolle bei der Sinneswahrnehmung ein (siehe Abb. 1). Die Retina als photosensitive Schicht leitet die über eine Signaltransduktionskaskade in den Photorezeptoren detektierten optischen Reize über neuronale Verschaltungen weiter. Die Verschaltung erfolgt über die Interneurone (Horizontalzellen, Bipolarzellen und Amakrinzellen) zu den Ganglienzellen in den Sehnerv, der zum visuellen Cortex führt, wo es letztendlich zur visuellen Wahrnehmung kommt. Die menschliche Retina beinhaltet zwei Typen von Photorezeptorzellen, Zapfen und Stäbchen. Während die Stäbchen mit ca. 125 Millionen Stück den Großteil an Rezeptoren stellen und das skotopische Sehen ermöglichen, sind die ca. 6 Millionen Zapfen für das photopische Sehen verantwortlich.

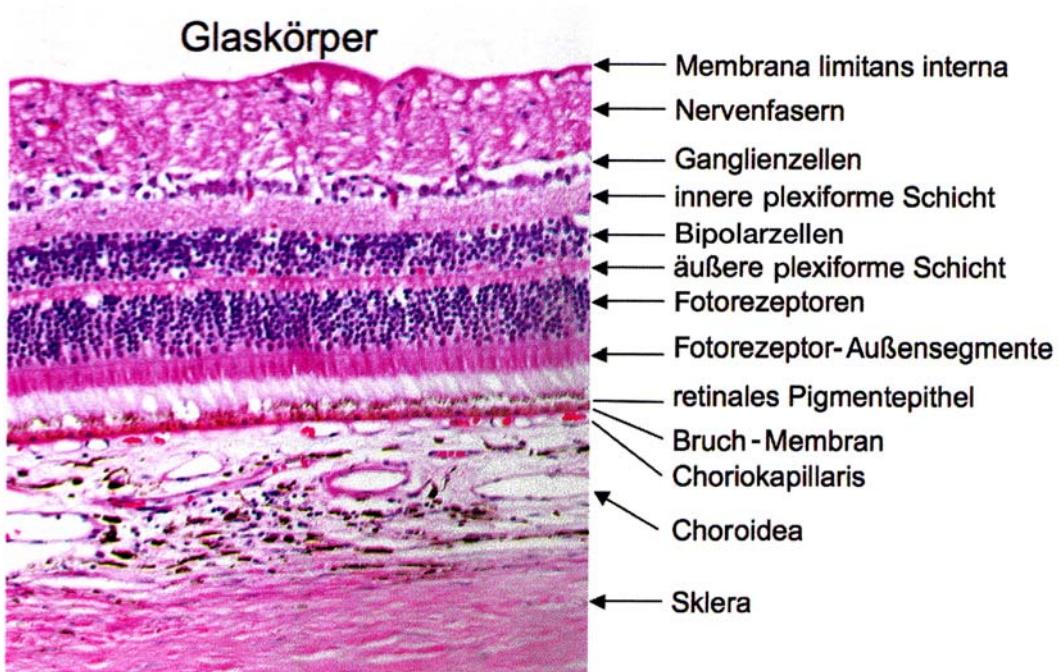


Abbildung 1

Horizontaler Querschnitt durch die menschliche Netzhaut, Aderhaut und Sklera  
(entnommen und modifiziert aus *Retina* Abb. 1.1, Wachtlin 2008)

Innerhalb der Retina sind die beiden Photorezeptortypen asymmetrisch verteilt. Zentral in der Retina liegt mit der ca. 5,5mm großen Makula ein Bereich mit erhöhter räumlicher Dichte an Photorezeptoren (ca. 150.000 Zellen/mm<sup>2</sup>), insbesondere findet sich hier die höchste Dichte an Zapfen (siehe Abb. 2). Dieser auch als gelber Fleck bezeichnete Bereich ist verantwortlich für das Scharf- und Farbsehen im zentralen Sehfeld.

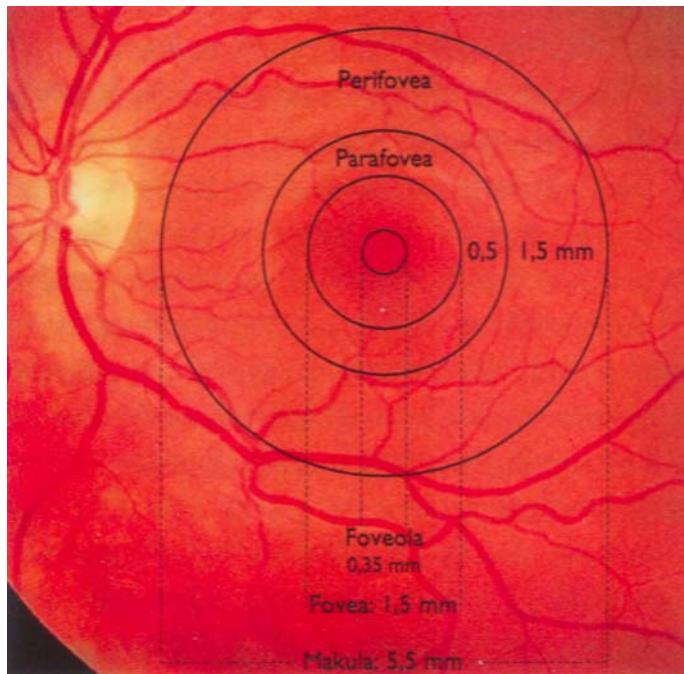


Abbildung 2

Fundusbild eines menschlichen Auges mit Darstellung der Makula mit Feinunterteilung  
(entnommen und modifiziert aus *Retina* Abb. 1.3, Wachtlin 2008)

Die Photorezeptoren sind über ihre Außensegmente in die Mikrovilli des Retinalen Pigmentepithels (RPE) eingebettet. Das RPE ist eine 1-lagige Schicht an polarisierten hexagonalen Epithelzellen, die über Tight Junctions verbunden, die äußere Komponente der Blut-Retina-Schranke bilden (siehe Abb. 3). Die primären Aufgaben der RPE-Zellen liegen in der Phagozytose der abgestoßenen Außensegmente der Photorezeptoren, Abtransport der Stoffwechselprodukte über die Bruchsche Membran und dem Recycling der Photopigmente. Des Weiteren unterdrückt die durch zahlreiche Melaningranula bedingte Pigmentierung des RPE die Bildung von Streulicht.

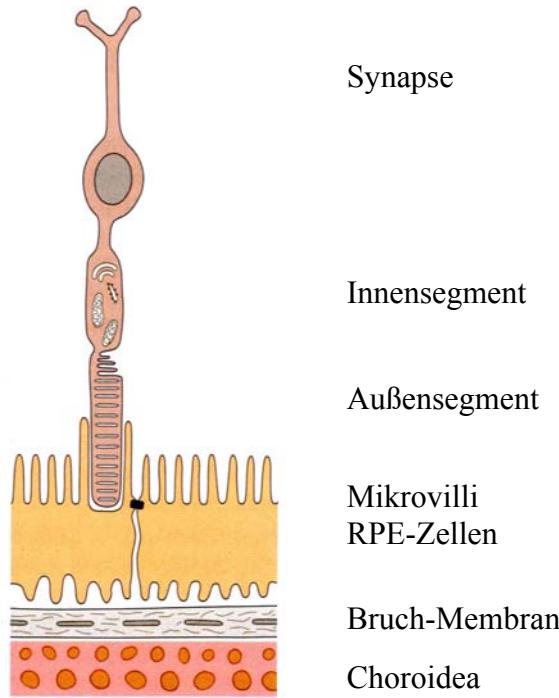


Abbildung 3

Schematische Darstellung Photorezeptor, RPE und Interphotorezeptormatrix  
(entnommen aus *Atlas der Augenkrankheiten* Abb. 13.8, Spalton 1996)

Zelluläre und molekulare Untersuchungen am RPE sind insbesondere von Interesse, da Störungen im RPE als Ursprung für eine Reihe retinaler Degenerationen identifiziert wurden (z.B. Morbus Stargardt, Morbus Best, AVMD).

## 1.2 Erbliche Makuladegenerationen

In den letzten Jahren konnten zunehmend die genetischen Ursachen erblicher Makuladegenerationen aufgeklärt werden. Erblichen Makuladegenerationen lassen sich basierend auf Ihrer genetischen Ursache in zwei Hauptgruppen einteilen, monogenetisch bedingte Formen und genetisch komplexe Formen. Für viele monogenetische Formen konnten bereits vor einigen Jahren durch familienbasierte Kopplungsanalysen die verantwortlichen krankheitsassoziierten Gene identifiziert werden. Beispielhaft zu nennen sind: Sorsby Fundusdystrophie (Weber et al. 1994), X-gebundene juvenile Retinoschisis (Sauer et al. 1997) und Morbus Best (Marquardt et al. 1998), (Petrukhin et al. 1998). Die zugrundeliegenden Genveränderungen bei der genetisch komplexen Makuladegeneration konnten erst kürzlich

mittels genomweiter Assoziationsstudien aufgeklärt werden (Klein et al. 2005), (Yang et al. 2006), (Fritzsche et al. 2008).

Den monogenetisch und den genetisch komplexen Makuladegenerationen ist gemeinsam, dass sie durch einen progressiven Krankheitsverlauf zur Verminderung oder teilweise sogar zum kompletten Verlust der Sehkraft führen. Obwohl den verschiedenen Erkrankungen unterschiedliche genetische Ursachen und molekulare Pathomechanismen zugrunde liegen, so führen sie immer zu einer Degeneration der Photorezeptoren im Bereich der Makula. Die Prävalenz der genetisch komplexen Makuladegeneration, der sogenannten altersabhängigen Makuladegeneration (AMD), ist im Gegensatz zu den monogenetischen Formen (z.B. Morbus Best ca. 1:70.000) mit ca. 1:25 sehr hoch. Trotzdem eröffnet die Erforschung der seltenen monogenetischen Makuladegenerationen die Möglichkeit, die Mechanismen zur Homöostase des Auges besser zu verstehen und Therapieansätze zu entwickeln, von denen beide Patientengruppen profitieren können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Focus auf die monogenetischen VMD2-assoziierten Makuladegenerationen gelegt.

#### VMD2 Nomenklatur

Da in der Fachliteratur bei der Nomenklatur der VMD2-Gene und den zugehörigen Proteinen teilweise Unklarheiten bestehen, wird in der folgenden Tabelle eine Definition der Gen-, Protein- und Alias-Namen gegeben, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden.

<b>Gen</b>	<b>Gen-Alias</b>	<b>Protein</b>	<b>Humane Chromosom</b>	<b>GenBank ID</b>
VMD2	BEST1	Bestrophin-1	11q13	AF057169 NM_004183
VMD2L1	BEST2	Bestrophin-2	19p13.2–p13.12	AF440756 NM_017682
VMD2L3	BEST3	Bestrophin-3	12q14.2–q15	AY515706
VMD2L2	BEST4	Bestrophin-4	1p33–p32.3	AF440757 NM_153274

Abbildung 4

VMD2 Nomenklatur (entnommen und modifiziert aus Tabelle 1 von Hartzell et al. 2008)

### 1.3 Das VMD2 Gen

Das humane VMD2-Gen liegt auf Chromosom 11q13 und erstreckt sich über 11,5kb. Von den 11 Exonen kodieren Exon 2-11 für ein 585 AS langes integrales Membranprotein, bezeichnet als Bestrophin-1. VMD2 gehört beim Menschen zu einer Genfamilie mit drei weiteren paralogen Mitgliedern, bezeichnet als VMD2L1, VMD2L2 und VMDL3 (L steht für englisch *like*). Als erstes wurden VMD2-Gene (25 Paraloge) bei *C. elegans* identifiziert und wurden dabei wegen dem unikalen, nur in dieser Proteinfamilie konservierten Tripeptidmotive „RFP“ (Arginin, Phenylalanin, Prolin), als VMD2-RFP-Genfamilie benannt. Innerhalb der Säugetierlinie existieren ebenfalls vier VMD2-ähnliche Gene mit hoher Sequenzidentität. Die hohe phylogenetische Konservierung impliziert eine ähnliche Proteinfunktion bei den Homologen von Mensch bis hin zu den Insekten (siehe Abb. 5) (Milenkovic 2005; Milenkovic et al. 2008). Entfernt homologe Gene konnten des Weiteren in Pilzen, Pflanzen und Prokaryoten identifiziert werden (Hagen et al. 2005).

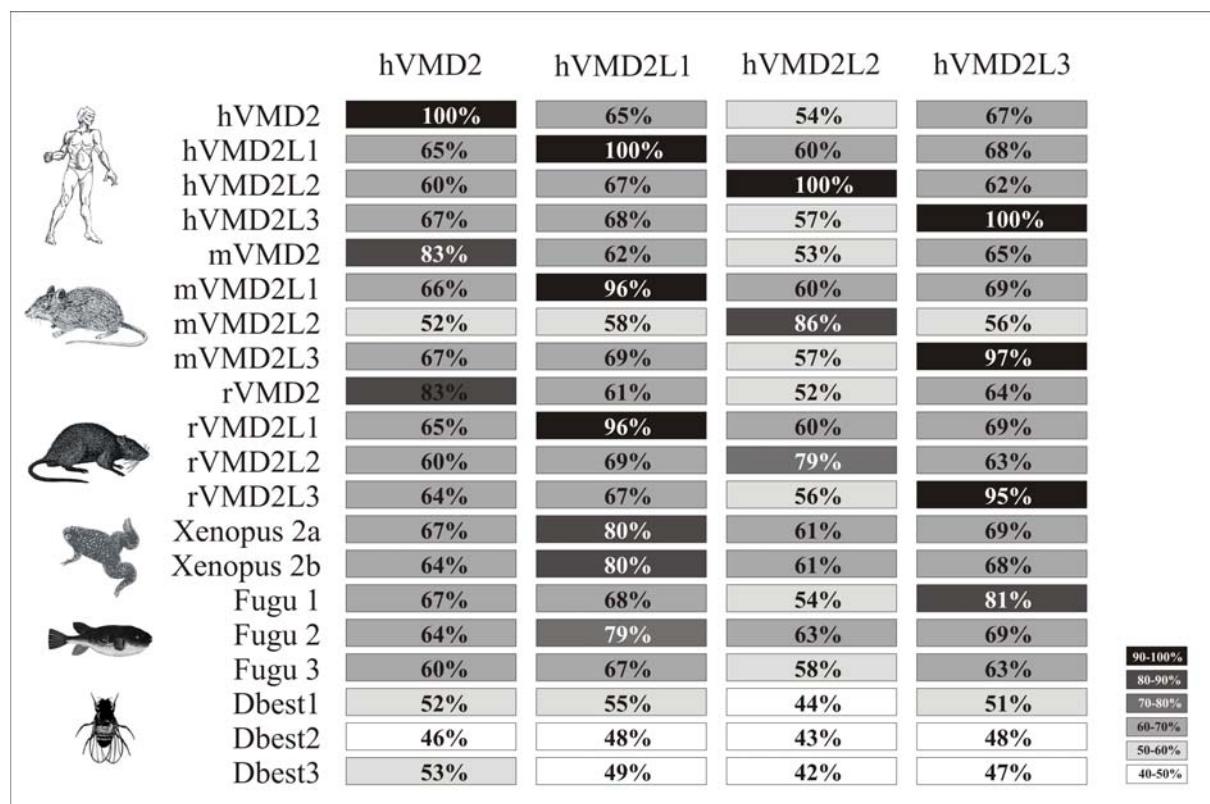


Abbildung 5

Bestrophin Sequenzhomologie von AS 1-325:

Prozentangaben zeigen Anteil an identischen Aminosäuren in Mensch, Maus, Ratte, Krallenfrosch, Pufferfisch und Fruchtfliege (übernommen aus Abb. 2 (Stohr et al. 2005)

## **1.4 Expression des VMD2 Gens**

VMD2 mRNA konnte bisher mit quantitativer PCR-Analyse gewebespezifisch exprimiert nachgewiesen werden. Die Analyse von 20 verschiedenen humanen Geweben zeigte VMD2 mRNA-Expression im RPE und Hoden. VMD2L1 mRNA konnte im RPE und Hoden sowie zusätzlich im Kolon detektiert werden. VMD2L2 und VMDL3 wiesen eine weniger ausgeprägte Gewebespezifität auf, mit einer ubiquitären Expression in Gehirn, Rückenmark, Knochenmark, Retina, Lunge, Trachea, Thymus, Skelettmuskulatur, Hoden und Plazenta (Stohr et al. 2002).

*In situ* Hybridisierungen wiesen neben einer starken Expression in humanem und murinem RPE auch Expression in murinem Hoden nach. Hierbei wurde spekuliert, dass das Signal in den Sertolizellen der Hoden lokalisiert ist (Petrukhin et al. 1998). Obwohl eine starke phylogenetische Konservierung in *C. elegans*, *D. melanogaster* und diversen anderen Spezies besteht, findet sich bisher keinerlei Sequenzhomologie zu anderen Genen mit bekannter Funktion (Milenkovic et al. 2008; Milenkovic et al. 2007).

## **1.5 VMD2 Promotor**

Der humane VMD2-Promotor wurde erstmals 2004 durch Luziferase-basierte Reporter-Assays und die Generierung von transgenen Mauslinien definiert. Es konnte gezeigt werden, dass der Sequenzabschnitt von -253bp bis +38bp (relativ gesehen zum Transkriptionsstartpunkt) ausreichend ist, um in transgenen lacZ-Mäusen zu RPE-spezifischer Reporterogenexpression zu führen (Esumi et al. 2004). In einer zweiten Publikation konnte die Promotorsequenz noch weiter eingegrenzt werden auf -154bp bis +38bp (Esumi et al. 2007). Luziferase Reporter-Assays und EMSAs zeigten die essentielle Rolle von zwei E-Box Transkriptionsfaktorbinde-Elementen. Die Transkriptionsfaktoren MITF, TFE3 und TFEB konnten als Bindepartner und Regulatoren der ersten E-Box (-57bp bis -52bp) identifiziert werden. Die Identität der Bindungspartner für die zweite E-Box (-68bp bis -64bp) konnte bislang nicht aufgeklärt werden. Der VMD2 Minimalpromotor (-154bp bis +38bp) wurde inzwischen für eine RPE-spezifische Expression von weiteren Proteinen in transgenen Mäusen verwendet (Kachi et al. 2006; Le et al. 2008; Oshima et al. 2004).

## 1.6 Bestrophin - Topologie und Struktur

Nachdem auch bei der Aminosäuresequenz keine Homologie zu Proteinen mit bekannter Funktion besteht, wurde versucht die Bestrophin-Struktur und -Topologie *in silico* und *in vitro* zu bestimmen. Während die ersten 315 AS der humanen Bestrophine sehr hohe Aminosäureidentität zueinander aufweisen, sind die C-Termini hoch variabel. Basierend auf *in silico* Hydrophobizitätsanalysen wurde ein Topologiemodell von Bestrophin-1 mit 5-6 hydrophoben Transmembrandomänen (TMD) vorgeschlagen (siehe Abb. 6 A), folglich definiert als TMD1-6. Durch Zellkultur-gestützte Analysen der Topologie mittels Einfügung von N-Glykosylierungsstellen und TEV-Proteaseschnittstellen, wurde ein weiteres Bestrophin-1 Topologiemodell mit 4 TMD (TMD1-2 und TMD5-6) vorgeschlagen (Tsunenari et al. 2003). In einem unabhängigen Versuchsanansatz, basierend auf der Analyse der Integrationsfähigkeit von *in vitro* translatierten Bestrophin-1 TMD-Sequenzabschnitten in die Membran von Mikrosomen, wurde das Bestrophin-1 Topologiemodell mit 4 TMD (TMD1-2 und TMD5-6) favorisiert (siehe Abb. 6 B), (Milenkovic et al. 2007).

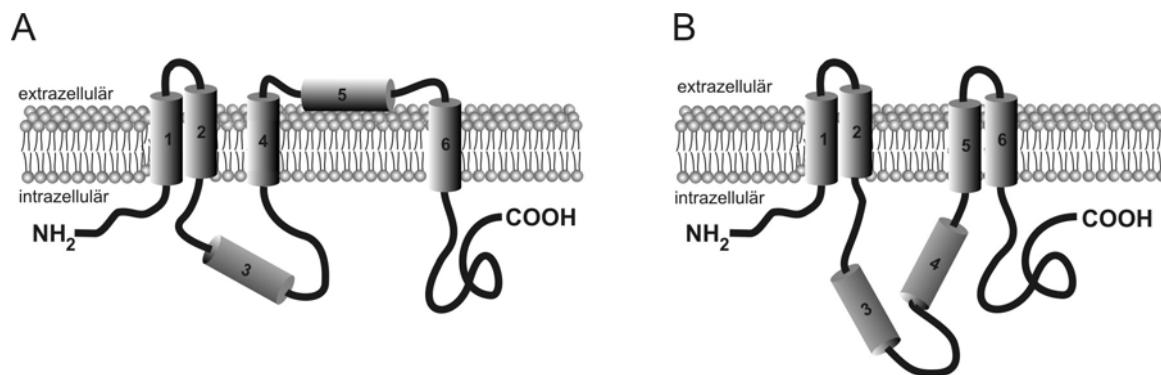


Abbildung 6

Bestrophin-1 Membrantopologie-Modelle:

A) Alternatives Topologie-Modell mit 5 integrierten TMD und kleiner cytosolischer Schleife, favorisiert von Tsunenari und Kollegen. B) Topologie-Modell mit 4 integrierten TMD und großer cytosolischer Schleife, favorisiert von Milenkovic und Kollegen; (modifiziert und übernommen von Abb. 5 aus (Milenkovic et al. 2007)

## **1.7 Bestrophin Oligomerisierung**

Die Analyse der Stöchiometrie von immunopräzipitiertem, in HEK-293 Zellen heterolog überexprimiertem Bestrophin-1 deutete auf eine Proteinquartärstruktur aus 4-5 Bestrophin-1 Untereinheiten hin (Sun et al. 2002). Von dieser Annahme abweichend konnte in einer Studie mit nativem porcinem Bestrophin-1 eine Dimerformation gezeigt werden. Hierzu wurden RPE-Zellen aus Schweineaugen isoliert und Bestrophin-1 mit dem Detergent Triton X-100 solubilisiert. Anschließend wurde die Stöchiometrie von Bestrophin-1 nach einer Immunpräzipitation durch Zentrifugations sedimentierung und SDS-PAGE bestimmt (Stanton et al. 2006). Die genauen molekularen Mechanismen der Oligomerisierung von Bestrophin-1 Untereinheiten wurden bislang noch nicht adressiert. Auch die Rolle von patientenbezogenen VMD2-Mutationen im Kontext der Oligomerisierung wurde bislang noch nicht näher untersucht.

## **1.8 Bestrophin Proteinlokalisierung**

Während für heterolog überexprimierte Bestrophin-1 eine Proteinlokalisierung in der Plasmamembran gezeigt werden konnte, liegen zur Detektion von nativem Bestrophin-1 nur spärliche Daten vor. Immunhistochemische Färbungen an Schweine- und Makakenaugen zeigten eine Begrenzung der Bestrophin-1 Expression auf die RPE-Zellschicht. Höhere Vergrößerungen der histologischen Präparate wiesen auf eine basolaterale Lokalisation in der Plasmamembran der RPE-Zellen hin (Marmorstein et al. 2000). Speziell die Frage nach der genauen subzellulären Lokalisation der Bestrophin-Proteine bleibt bislang unbeantwortet, weitgehend dadurch bedingt, dass noch keine hochspezifischen und hochaufgereinigten Antikörper für die Elektronenmikroskopie zur Verfügung stehen. Auch der Nachweis der Bestrophin-Proteine in anderen Organen und Geweben steht noch aus.

## **1.9 Bestrophin Proteinfunktion**

Durch die fehlende Homologie zu bereits charakterisierten Proteinen konnte bislang nicht direkt auf eine Proteinfunktion der Bestrophine geschlossen werden. In einer Publikation von Sun und Kollegen wurde zum ersten Mal eine Chloridkanalfunktion für humanes

Bestrophin-1 vorgeschlagen. In embryonalen Nierenepithelzellen (HEK-293) konnten hierbei nach heterologer Transfektion mit Bestrophin-1 Chloridkanal-typische Ströme nachgewiesen werden. Versuche unter Verwendung von freien zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  führten zur Aktivierung des transfizierten humanen Bestrophin-1 und zeigten Chloridkanal-typische Signale. Die potentielle Chloridkanalfunktion konnte im heterolog transfizierten Zellkultursystem ebenfalls für humanes Bestrophin-2, sowie Bestrophin-1 aus *D. melanogaster* und *C. elegans* gezeigt werden (Sun et al. 2002). Die gleiche Forschergruppe konnte in einer späteren Arbeit auch dem humanen Bestrophin-3 und -4 eine Funktion als Chloridkanal zuweisen (Tsunenari et al. 2003). Die Annahme, dass die Bestrophinproteine Chloridkanäle sind, wurde wesentlich von zwei Publikationen gestützt, in denen durch die Mutagenese einzelner Aminosäure der Chloridkanal funktionell definiert werden konnte. Insbesondere konnten hierüber einzelne Aminosäuren definiert werden, die an der Porenbildung und an der Ionenselektion des Kanals spezifisch beteiligt sind (Qu et al. 2004; Qu et al. 2004). Die Chloridkanalhypothese würde auch sehr gut die reduzierte „Light-Peak-Amplitude“ im EOG bei Morbus Best Patienten erklären, verursacht durch den mutationsbedingten Verlust der Chloridkanalaktivität. Die Theorie hierzu ist, dass nach der Belichtung der Retina ein bisher nicht identifizierter Botenstoff, die sogenannte „Light-Peak-Substanz“, in den inneren Schichten der Retina ausgeschüttet wird. Dieser Botenstoff führt rezeptorvermittelt im RPE zum Einstrom von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  über potenzialabhängige L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Das dadurch erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  führt zur Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger  $\text{Cl}^-$ -Kanäle (z.B. Bestrophin-1) in der basolateralen Plasmamembran des RPE und resultiert in dem im EOG messbaren, „Light-Peak“ (Strauss et al. 2005).

Eine alternative Hypothese zur Funktion geht von einem nur indirekten Beitrag von Bestrophin-1 zur Entstehung des „Light-Peaks“ im EOG aus (siehe Abb. 7). Hierbei steuert Bestrophin-1 über die Modulation von Amplitude und Dauer des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms über die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Somit sollte Bestrophin-1 indirekt die basolateralen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Cl}^-$ -Kanäle im RPE regulieren. Bestrophin-1 Mutationen führen somit zu verringertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und letztendlich auch zur typischen Reduktion der Light-Peak-Amplitude (Strauss et al. 2005). Unterstützt wird die Hypothese der Bestrophin-1 Modulatorfunktion durch das Fehlen einer erhöhten Light-Peak-Amplitude bei Untersuchungen in Ratten, bei denen über Adenovirus-Transfer zusätzliche Bestrophin-1 Expression im RPE initiiert wurde (Marmorstein et al. 2004). Auch konnte in mit mutantem

Bestrophin-1 transfizierten RPE-Zellen der Einfluss auf die Kinetik von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle und einen dadurch verringelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom gezeigt werden.

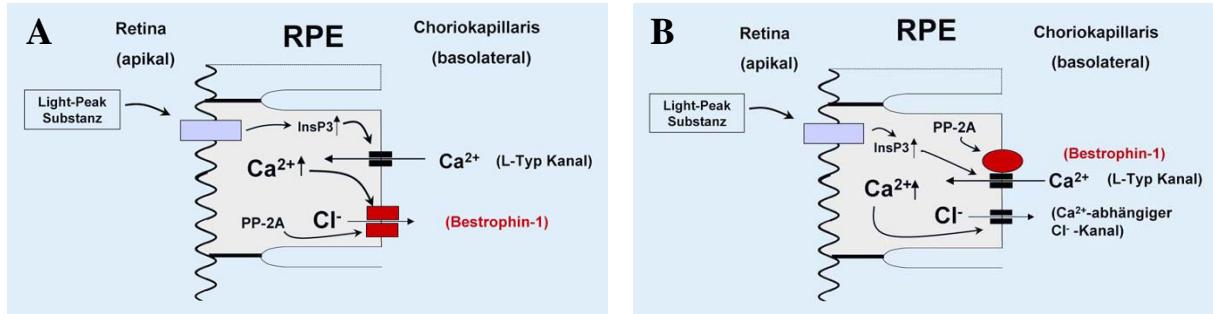


Abbildung 7

A) Bestrophin-1 als Cl<sup>-</sup>-Kanal: direkte Beteiligung an der Entstehung des Light-Peaks;  
B) Bestrophin-1 als Regulator von L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen: indirekte Beteiligung an der Entstehung des Light-Peaks (übernommen und modifiziert von Abb. 2 & 3 Strauss et al. 2005).

## 1.10 Bestrophin-1 assoziierte Vitreoretinopathien

Bislang konnten über 100 krankheitsverursachende Mutationen im VMD2 Gen identifiziert werden ([http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2\\_database](http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2_database)). Die meisten dieser Mutationen korrelieren mit dem Krankheitsbild Morbus Best (OMIM: #153700), während eine sehr geringe Zahl an Mutation mit einer Reihe weiterer Retinopathien assoziiert ist: Adulte vitelliforme Makuladystrophie (OMIM: #608161), Autosomal Dominante Vitreoretinochoroidopathie (OMIM: #193220), Autosomal Rezessive Bestrophinopathie (OMIM: #611809) und Altersabhängige Makuladegeneration (OMIM: #603075). Das VMD2-Mutationsspektrum der Bestrophin-1 assoziierte Vitreoretinopathien besteht überwiegend aus Missensmutationen (>93%), die im Bereich des konservierten N-Terminus (AS 1-325) von Bestrophin-1 liegen. Die Mutationen finden sich gehäuft in 4 „Hotspot“ Regionen, entsprechend Kodon 6–30, 73–104, 218–243 und 293–311 (siehe Abb. 8). Kürzlich wurden bei Hunden zwei VMD2-Mutationen gefunden, die ebenfalls zu einer Makuladystrophie führen und als CMR (canine multifocal retinopathy) bezeichnet wird (Guziewicz et al. 2007).

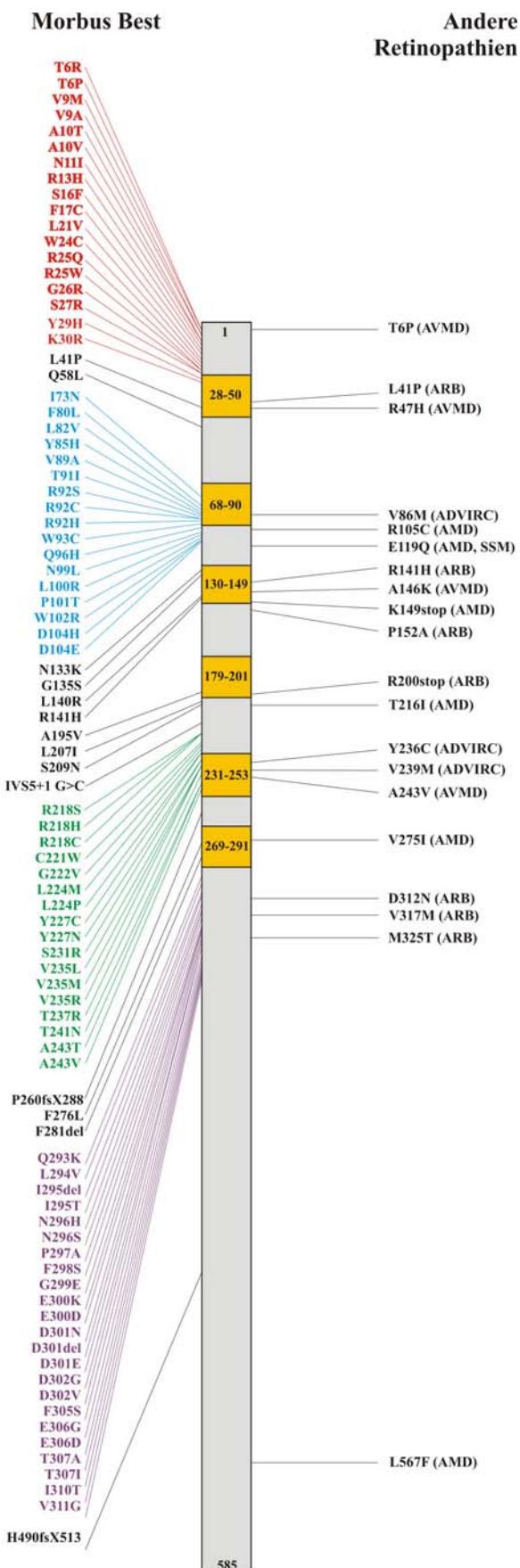


Abbildung 8  
VMD2 Mutationsspektrum:  
Relative Position bekannter Mutationen  
in Bestrophin-1 mit Angabe der assoziierten  
Erkrankungen. Gelb hervorgehoben die 6  
putativen Transmembranendomänen.  
Mutationen in den „Hotspots“ sind farblich  
gegliedert. (übernommen und modifiziert  
von Abb. 1, Stohr et al. 2005)

### **1.10.1 VMD2: Vitelliforme Makuladystrophie Typ 2 (Morbus Best)**

Morbus Best wurde erstmals im Jahre 1905 klinisch beschrieben. Der deutsche Augenarzt Friedrich Best publizierte einen wissenschaftlichen Artikel über 8 Personen einer Familie mit Anomalien der Makula (Best 1905). Ca. 100 Jahre später, 1998, konnten unabhängig voneinander eine deutsche und eine schwedisch-amerikanische Forschergruppe das krankheitsbezogene Gen VMD2 identifizieren (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998). Über familienbasierte Kopplungsanalysen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im VMD2-Gen mit Morbus Best assoziiert sind und die Erkrankung einem autosomal dominantem Vererbungsmuster folgt. Morbus Best ist eine Erkrankung der zentralen Netzhaut, vorwiegend im Bereich der Makula. Bei einer variablen Penetranz findet sich meist ein juveniles Auftreten (1.-2. Lebensdekade) mit einem progressiven Verlauf der Erkrankung. Typischerweise treten eidotterähnliche (vitelliforme) Läsionen auf, die aus Lipofuszinähnlichen Ablagerungen bestehen und sich durch erhöhte Autofluoreszenz auszeichnen (siehe Abb. 9). Der Ursprung der Ablagerungen wird nach aktuellem Stand der Forschung dem RPE zugeordnet (Frangieh et al. 1982; Pianta et al. 2003). Die molekulare Ursache für die Ablagerungen ist bislang ungeklärt und steht mit im Mittelpunkt der Erforschung von Morbus Best. Neben den histologischen Anormalitäten zeichnet sich Morbus Best klinisch auch über einen verminderten Arden-Quotient ( $<1,8$ ) im Elektrookulogramm (EOG) aus, das neben den funduskopischen Veränderungen das Hauptdiagnosekriterium für die Erkrankung darstellt. Interessanterweise ist das Kriterium des verminderten Arden-Quotienten nicht bei allen Morbus Best Patienten erfüllt (Birndorf et al. 1973; Wabbels et al. 2006). Bei den meisten Patienten kommt es im fortschreitenden Krankheitsverlauf zum zentralen Visusverlust, infolge der Atrophie des RPE und damit assoziierter Photorezeptoren. Teilweise finden sich in fortgeschrittenen Stadien auch choroidale Neovaskularisationen und Hämorrhagien.

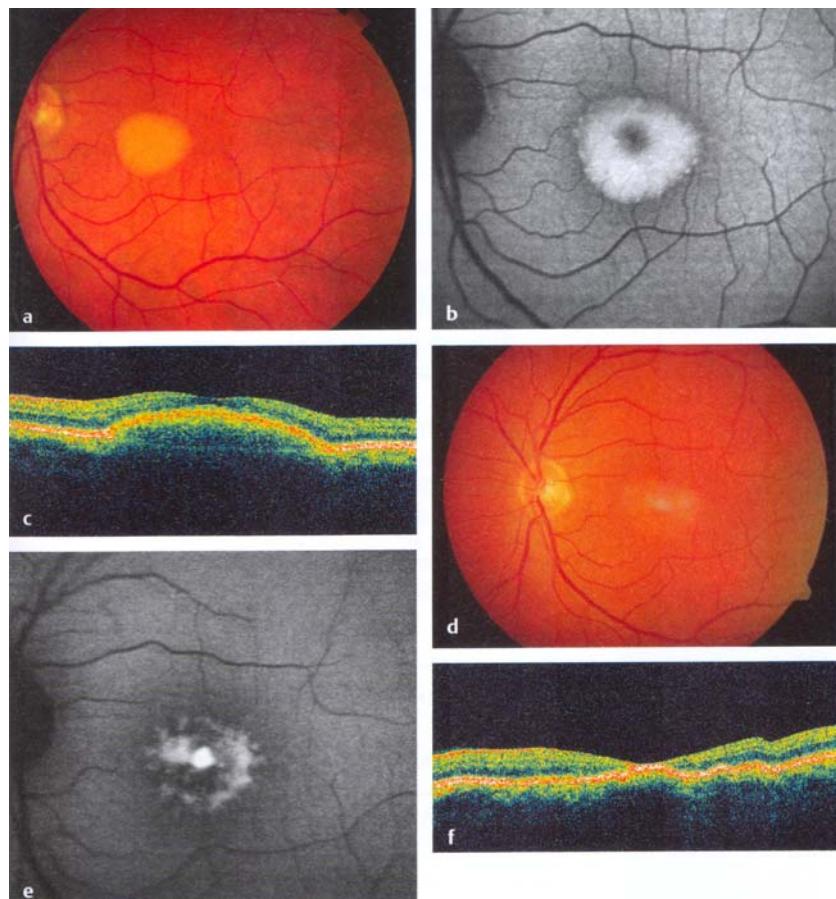


Abbildung 9

Morbus Best Stadien im Krankheitsverlauf:

a) Fundusbild vitelliformer Läsion im Bereich der Makula eines 50-jährigen VMD2-Patientens; b) Erhöhte Fundusautofluoreszenz im Bereich der Ablagerungen; c) OCT Aufnahme mit Elevation von RPE und Retina über den Ablagerungen; d) Fundus zwei Jahre später mit atropischer Läsion; e) Fundusautofluoreszenz im Bereich der Atropie reduziert; f) OCT zeigt verminderte Elevation der Retina (entnommen und verändert aus *Retina* Abb. 7.5, Wachtlin 2008).

### 1.10.2 AVMD: Adulte vitelliforme Makuladystrophie

Der größte Unterschied der AVMD im Vergleich zu Morbus Best liegt im späteren Manifestationsalter bei der AVMD (3.-5. Lebensdekade). Typischerweise finden sich rundliche, gelbe Läsionen im subfovealen Bereich. Die Progression ist meist langsam und führt zu mäßig-gradiger Verminderung des Visus. Wie auch bei Morbus Best hat die AVMD eine verminderte Penetranz und große Variabilität, wohingegen AVMD Patienten elektrophysiologisch meist unauffällig sind und ein normales EOG aufweisen (Renner et al. 2004). Neben Mutationen im VMD2-Gen sind für die AVMD auch Fälle (ca. 18%) mit RDS-Mutationen beschrieben (Felbor et al. 1997). Des Weiteren konnte in einer VMD2-Mutationsanalyse von VMD2- und AVMD-Patienten gezeigt werden, dass zwei VMD2-

Missensmutationen sowohl mit Morbus Best als auch mit AVMD assoziiert sind. Zumindest in den Fällen mit überlappenden Mutationen scheint eine deutliche Überschneidung in der Ätiologie der beiden Erkrankungen vorzuliegen (Kramer et al. 2000; Stohr et al. 2005).

### **1.10.3 ADVIRC: Autosomale Dominante Vitreoretinochoroidopathie**

Bei der ADVIRC handelt es sich um eine seltene Netzhautdystrophie mit autosomal dominatem Erbgang. Über Kopplungsanalysen konnten Missensemutationen im VMD2-Gen als Krankheitsursache identifiziert werden (Yardley et al. 2004). Neben den in der Peripherie auftretenden Netzhautdystrophien findet sich zusätzlich bei den Patienten eine Augenentwicklungsstörung, dem sogenannten Nanophthalmos. Typischerweise findet sich auch ein pathologisch verändertes EOG. Während bei den anderen VMD2-assoziierten Erkrankungen die Missensmutationen einen Aminosäureaustausch bedingen, scheinen die bislang beschriebenen vier ADVIRC-Mutationen nicht nur zu einer Aminosäuresubstitution zu führen, sondern auch Einfluss auf die für den Spleißvorgang notwendigen Faktoren zu haben. Dies führt in RPE-Zellen auf molekularer Ebene vermutlich dazu, dass drei VMD2 mRNA-Isoformen gebildet werden. Eine mRNA-Variante kodierend für wildtypisches Bestrophin-1, die zweite mRNA für eine Aminosäuresubstitution und die dritte mRNA für eine interne Deletion (ursprüngliches Leseraster bleibt wahrscheinlich erhalten), verkürzt um das fehlerhaft gespleißte Exon. Bei Morbus Best-assoziierten VMD2-Mutationen wurde bislang keine fehlerhafte mRNA-Prozessierung beschrieben. Es scheint so, dass unterschiedliche Pathomechanismen für die verschiedenen Phänotypen bei Morbus Best und ADVIRC, insbesondere für die Augenentwicklungsstörung verantwortlich sind (Stohr et al. 2005).

### **1.10.4 ARB: Autosomale Rezessive Bestrophinopathie**

ARB grenzt sich im Vererbungsmuster durch seinen rezessiven Erbgang von den anderen, hier beschriebenen VMD2-assoziierten Retinopathien, ab. In den bisher veröffentlichten fünf familiären Fällen von ARB wird die Erkrankung bedingt durch compound-heterozygote VMD2-Mutationen, wobei 6 unterschiedliche Missensemutationen und eine Nonsensemutation identifiziert werden konnten. Die charakteristischen Krankheitsmerkmale der betroffenen Familienmitglieder sind der Verlust des zentralen Sehfeldes, sowie diffuse ungleichmäßige Pigmentierungsanomalien der Netzhaut. Typischerweise zeigen ARB-

Patienten einen reduzierten Hellanstieg im EOG und ein erniedrigtes Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG). Außerdem weisen alle Patienten Flüssigkeitsansammlungen zwischen bzw. unter der Retina im Bereich der Makula auf und sind weitsichtig. In 2/3 der betroffenen Familien wurde außerdem ein akutes Engwinkelglaukom diagnostiziert. Bezeichnend ist, dass heterozygote Familienmitglieder keinerlei klinische oder elektrophysiologische Krankheitssymptome aufweisen (Burgess et al. 2008).

### **1.10.5 AMD: Altersabhängige Makuladegeneration**

In den westlichen Industrienationen ist die AMD die häufigste Ursache für den Verlust des zentralen Sehfeldes (Klein et al. 2004). Als komplexe multifaktorielle Erkrankung spielen sowohl Umweltfaktoren als auch eine genetische Disposition eine entscheidende Rolle, ob und inwieweit sich die Erkrankung manifestiert. Im Krankheitsverlauf mit progredientem Sehverlust kommt es zu Ablagerungen von Drusen zwischen RPE und Choroidea, häufig gefolgt von der Atrophie des RPE und bei ca. 10% der Patienten mit neovaskulären Veränderungen. Auf Seite der Umweltfaktoren konnte bereits früh das Rauchen als wichtiger Risikofaktor bestimmt werden. Hingegen konnten erst vor Kurzem genetische Risikofaktoren mit einem großen Beitrag zur Erkrankungswahrscheinlichkeit identifiziert werden. Über genomweite Kopplungsanalysen und eine Metaanalyse solcher Kopplungsstudien (Fischer et al. 2005) konnten als wesentliche Risikofaktoren eine Region auf dem Chromosom 1q32, assoziiert mit dem Gen für den Komplement Faktor H (CFH) (Hageman et al. 2005) und auf dem Chromosom 10q26, assoziiert mit den Genen ARMS2 und HTRA1 (Rivera et al. 2005), identifiziert werden. Vorangegangene Analysen von Kandidatengenen zur altersabhängigen Makuladegeneration konnten nur Gene mit einem geringen Beitrag evaluieren (Scholl et al. 2007). Nachdem Morbus Best und die AMD Ähnlichkeiten in ihren Krankheitsbildern aufweisen, wurde auch VMD2 früh als potentielles Kandidatengen betrachtet. In zwei Studien wurden einige wenige VMD2-Mutationen in AMD-Patienten mit negativer Familienanamnese identifiziert (Allikmets et al. 1999; Lotery et al. 2000). In einer weiteren Analyse des VMD2-Gens, die 200 Patienten mit AMD einschloss, konnte keine Assoziation von AMD mit VMD2-Mutationen gezeigt werden (Kramer et al. 2000). Die Theorie, dass es sich bei den AMD-Patienten mit Mutationen in VMD2 um Phänokopien oder um falsch diagnostizierte Morbus Best Patienten handeln könnte, wird neben der negativen Familienanamnese auch dadurch unterstützt, dass die VMD2-Missensemutation P297V in einem Kodon liegt, das auch bei Morbus Best Patienten gefunden wird (Stohr et al. 2005).

## **1.11 Zielsetzung der Dissertation**

In den letzten Jahren konnten VMD2-Mutationen als genetische Ursache für mehrere Retinopathien identifiziert werden. Da bislang die physiologische Funktion von Bestrophin-1 nicht befriedigend geklärt werden konnte, kann auch über die zugrundeliegenden molekularen Pathomechanismen nur spekuliert werden. Zu einem besseren Verständnis der VMD2-assoziierten Erkrankungen und zur Funktion von Bestrophin-1 wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere molekularbiologische Fragestellungen adressiert.

- 1.** Es sollen die molekularen Mechanismen von potentieller Dimerisierung/Oligomerisierung für alle Mitglieder der humanen Bestrophine charakterisiert werden. Zusätzlich soll der Einfluss von Patientenmutationen auf diese Mechanismen bestimmt werden.
- 2.** Es soll eine erweiterte Analyse des bisher nur teilweise charakterisierten VMD2-Promotorbereichs durchgeführt werden. Hierbei ist auch die Rolle von SNPs im regulatorischen Bereich bezüglich ihrer Auswirkung auf die Expression von VMD2 von Interesse. Die hochvariable Penetranz der Krankheitsbilder, speziell bei Familienmitgliedern, die eine identische VMD2-Mutation tragen, soll in diesem Kontext untersucht werden.
- 3.** Es soll der Einfluss von definierten ADVIRC und Morbus Best-assoziierten Mutationen auf das Spleißen untersucht werden. Einige pathologische VMD2-Mutationen konnten mit der Bildung von alternativen Transkripten durch Spleiß-Variation korreliert werden. Um Genotyp-Phänotyp Korrelationen zu untersuchen, sollen weitere ADVIRC assoziierte Mutationen, sowie mehrere unmittelbar angrenzende Morbus Best -assoziierte Mutationen charakterisiert werden.

## **2. Material**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders aufgeführt, von den folgenden Firmen bezogen:

Sigma Aldrich Co. ([www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com))

Merck KGaA ([www.merck.de](http://www.merck.de))

Carl Roth GmbH + Co. KG ([www.carl-roth.de](http://www.carl-roth.de))

### **2.1 Antikörper**

Anti-Penta-Histidin monoklonal Maus, Qiagen

Anti-Maltosebindeprotein (monoklonal Maus), New England Biolabs (NEB)

Anti-Maus-Peroxidase-Konjugat (polyklonal Ziege, IgG H&L-chain), Calbiochem

### **2.2 Kommerzielle Kits**

Zur Durchführung von einigen Standardmethoden wurden kommerziell erhältliche Kits verwendet. In der folgenden Auflistung finden sich das spezifische Produkt, der Verwendungszweck und der Lieferant.

<b>Produkt</b>	<b>Verwendungszweck</b>	<b>Lieferant</b>
BIG Dye 1.1 Terminator Kit	Sequenzierung	Applied Biosystems
Nucleo Spin® Extract II	DNA-Extraktion	Macherey-Nagel
Nucleo Spin® Plasmid	Plasmid-Isolierung	Macherey-Nagel
Nucleobond® Xtra Midi	Plasmid-Isolierung	Macherey-Nagel
pGEM-T Vector System I	TA-Klonierung	Promega
AffinityScript™ MT cDNA Synth. Kit	cDNA-Synthese	Stratagene
RNeasy mini Kit	RNA-Isolierung	Qiagen
FuGene HD transfection kit	Transfektion	Roche
Gel Shift Assay System	EMSA	Promega

## **2.3 *E. coli* Stämme**

Für grundlegende Versuche wurden verschiedene *E. coli* Stämme verwendet. In der folgenden Liste finden sich der Stamm sowie der jeweilige Verwendungszweck und Lieferant.

<b>Stamm</b>	<b>Verwendungszweck, Lieferant</b>
BL21(DE3)	Proteinexpressionsstamm, Novagen
DH5alpha	Klonierungsstamm, Invitrogen
FHK12	P <sub>ctx</sub> – lacZ Reporterstamm (amp <sup>r</sup> ), Prof. Langosch (TU München)
PB28	MBP-defizient; Membranintegration (tet <sup>r</sup> ), Prof. Langosch (TU München)

## **2.4 Plasmide**

Für die Klonierung der verschiedenen Konstrukte wurden diverse Plasmide verwendet. In der folgenden Liste sind das Plasmid, die Resistenz und der Lieferant aufgeführt.

<b>Plasmid</b>	<b>Resistenz</b>	<b>Lieferant</b>
pGEM-T	amp <sup>r</sup>	Promega
pGL4.10	amp <sup>r</sup>	Promega
pToxRIV	kan <sup>r</sup>	Prof. Langosch (TU München)
pRSET	amp <sup>r</sup>	Invitrogen
pMalc2x	amp <sup>r</sup>	NEB

## **2.5 Eukaryotische Zelllinien**

Für die zellbiologischen Methoden wurden zwei Standardzelllinien verwendet. Der Name und die ATCC-Nummer finden sich in der folgenden Auflistung.

<b>Zelllinie</b>	<b>ATCC-Nummer</b>
ARPE-19	ATCC CRL-2302
Cos-7	ATCC CRL-1651

### **3. Methoden**

Soweit nicht anders angegeben, wurden die experimentellen molekularbiologischen Arbeiten mit Hilfe der Anleitungen aus „Molecular Cloning“ (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Bei Verwendung kommerzieller Produkte / Kits wurden die Standardanweisungen der Hersteller befolgt. Neben dieser allgemeinen Methodenbeschreibung findet sich die genaue experimentelle Durchführung unter Teil 4. „Durchführung und Ergebnisse“.

#### **3.1 DNA-spezifische Methoden**

##### **3.1.1 Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur Vermehrung von definierten Bereichen an DNA wurde die PCR-Technik verwendet (Mullis et al. 1986). Basierend auf dem Enzym DNA-Polymerase wurden DNA-Moleküle unter Verwendung von dsDNA als Vorlage (Template) amplifiziert. Der zu kopierenden Bereich wurde durch ca. 20bp lange Oligonukleotide (Primer) definiert, die sich nach der DNA-Denaturierung an den komplementären Bereich der beiden DNA-Stränge anlagerten und als Startpunkt für die 5' → 3' gerichtete Replikation durch die DNA-Polymerase dienten. Diese durch mehrere Temperaturschritte mit entsprechender Zeitspanne definierte Reaktion wurde zyklisch wiederholt, woraus eine exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente resultierte. Typischerweise wurden rekombinant hergestellte thermostabile DNA-Polymerasen aus thermophilen Mikroorganismen verwendet. Für eine Standard-PCR (bis 1kb Länge) kam die Taq-DNA-Polymerase zur Anwendung, hingegen wurde für Fragmente >1kb die Pfu-DNA-Polymerase mit Fehlerkorrekturfunktion verwendet. Primer wurden für eine Länge von ca. 20bp, GC-Gehalt <50% und einer Anlagerungstemperatur von ca. 60°C unter Zu-Hilfenahme von Internet-basierten Programmen berechnet. Bei Verwendung von cDNA als Template wurde die Methode als RT-PCR (Reverse Transkriptase-PCR) bezeichnet. Alternativ zu aufgereinigter DNA oder cDNA als Template wurden auch Bakterien direkt in die PCR eingesetzt. Diese Methode wurde als Kolonie-PCR bezeichnet und diente zur Analyse von Bakterienkolonien, die mit Plasmid-DNA transformiert wurden.

#### Standard-PCR-Reaktion in 25µl Reaktionsvolumen:

2,5µl	10x Puffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3)
10-50ng	Template-DNA (oder 5µl einer in dH <sub>2</sub> O resuspendierten Bakterienkolonie)
0,4µM	je Primer
2,5mM	dNTPs
1-5 Units	DNA-Polymerase
Xµl	dH <sub>2</sub> O (ad 25µl)

#### Standard PCR Programm:

96°C	2min DNA-Denaturierung	} 25-35 Zyklen
96°C	30sek DNA-Denaturierung	
60°C	30sek Primeranlagerung	
72°C	1min DNA-Replikation (1min / 1kb)	
72°C	5min DNA-Replikation final	
5°C	Ende	

PCR-Thermocycler: Biometra, Thermocycler T1000 und T3000

Enzyme: peqLab Biotechnologie, peqGold Taq-DNA-Polymerase (aus Thermo aquaticus)

Stratagene, PfuUltra™ Hotstart High-fidelity DNA-Polymerase (aus Pyrococcus furiosus)

Primer: Metabion, entsalzte Oligonukleotide, optional HPLC aufgereinigt

Desoxynukleotide: PeqLab, peqGold dNTP-Set 4x

Primerdesignprogramm: Premierbiosoft, NetPrimer; Hastings Software, Gene Runner

### **3.1.2 DNA-Gelelektrophorese**

Die DNA-Fragmente wurden mit dieser Methode im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe und Ladung in einer Gelmatrix aufgetrennt. Die DNA-Proben wurden hierzu mit DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des polymerisierten Agarosegels geladen und elektrische Spannung angelegt. Die negativ geladene DNA wandert hierbei durch die Gelmatrix in der Pufferkammer zur positiv geladenen Anode. Zur Abschätzung der DNA-Fragmentgröße wurde parallel ein Standard aufgetragen. Zur Visualisierung und Dokumentation wurde die Agarosegelmatrix mit ca. 0,00005% Ethidiumbromid versetzt. Ethidiumbromid ist ein Farbstoff, der mit den Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Die starke

Fluoreszenz von Ethidiumbromid unter UV-Licht dient anschließend der Detektion und wurde mittels einer Digitalkamera dokumentiert.

Verwendete Agarosekonzentrationen in 1x TBE Puffer:

DNA-Fragmente bis 500bp 2% Agarose, 501-1.500bp 1% Agarose, >1.500bp 0.7% Agarose

Laufbedingungen: 100-200V bei maximal 200mA bei 30-60min Laufzeit

Gelkammersystem: SERVA, BlueMarine™ 200

Netzteil: SERVA, BluePower™ Plus

Gelmatrix: SERVA, Agarose Premium

Puffersystem 1x TBE: 0,1M Tris-HCl, 0,1M Borsäure, 2mM EDTA, pH 7,5

5x DNA-Ladepuffer: 20ml 85 % Glycerin, 0,05g Bromphenolblau/Xylenblau ad 50ml H<sub>2</sub>O

DNA-Standard: Invitrogen, 1kb plus Ladder

Dokumentatiossystem: BioStep, Darkhood DH30/32 mit CCD-Kamera & Argus 3.0 Software

Thermoprinter: Mitsubishi, P93D

### **3.1.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren (DNA +RNA) – photometrisch**

Genomische DNA, PCR-Fragmente, Plasmid-DNA und RNA wurden photometrisch quantifiziert, basierend auf ihrem Absorptionsmaximum bei 260nm in einem Photospektrometer.

Photospektrometer: Thermo Scientific, NanoDrop ND-1000

### **3.1.4 Relative Quantifizierung von DNA PCR-Fragmenten – densiometrisch**

Zu relativen Quantifizierung von RT-PCR-Produkte wurden die in einer mit 0,000005% Ethidiumbromid versetzten Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennten Fragmente digital dokumentiert und densitometrisch ausgewertet. Hierbei kamen die Standardeinstellungen des Auswertungsprogramms zur Anwendung.

Auswertungsprogramm: Nonlinear Dynamics, TL100 Softwarepaket

### **3.1.5 Aufreinigung von PCR-Produkten und linearen DNA-Fragmenten**

PCR-Produkte und liniarisierte DNA-Fragmente wurden direkt oder nach einer DNA-Gelelektrophorese aus dem Agarosegel aufgereinigt. Die Aufreinigung basiert auf der Affinitätschromatographie über Zentrifugationssäulen mit Silikat-Membran, die eine hohe DNA-Bindungsaffinität aufweist. Unerwünschte Reaktionskomponenten (z.B. nicht inkoperierte Primer, dNTPs, Agarose) wurden durch Waschschritte abgetrennt und die DNA am Ende mit leicht basischer hypotonischer Lösung eluiert.

Aufreinigungskit: Macherey-Nagel, NucleoSpin® Extract II

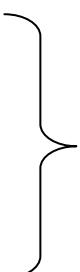
Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

Zentrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5415R

### **3.1.6 Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen**

Restriktionsendonukleasen vom Typ II wurden verwendet um DNA an definierten Basenpositionen zu schneiden, wodurch, je nach Enzym, klebrige DNA-Enden (sticky ends) mit 5' oder 3' Überhängen oder glatte DNA-Enden (blunt ends) ohne Überhänge resultierten. Ursprünglich fungieren diese Enzyme in Prokaryoten als Abwehr viraler unmethylierter DNA. Sie werden aber heutzutage auch rekombinat hergestellt und in molekularbiologischen Methoden verwendet. In dieser Arbeit wurden die Restriktionsenzyme für Klonierungen von DNA-Fragmenten in Expressionsvektoren verwendet. Hierzu wurden über die Primer in der PCR am 5'- und 3'-Ende der DNA zusätzliche Schnittstellen angefügt. Die Puffer, Inkubationstemperatur und -zeit wurden entsprechend den Herstellerangaben anwendet.

Standard-Restriktionsverdau in 50µl Volumen:

1µg	DNA (PCR-Produkt oder Plasmid-DNA)		10min – 1h bei 37°C
5µl	10x Puffer		
0,5µl	BSA 100x (optional)		
1µl	Enzym (10-1000 units/µl)		
Xµl	dH <sub>2</sub> O (ad 50µl)		

Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

Enzyme und Puffer: New England Biolabs

Restriktionsschnittstellen-Programm: New England Biolabs, NEBcutter

### **3.1.7 Plasmid-Vektor Dephosphorylierung**

Bei blunt-end Klonierungen und ungerichteten Klonierungen mit nur einer Restriktionsschnittstelle ist es notwendig, das Plasmid nach dem Restriktionsverdau zu dephosphorylieren, um übermäßige Religation des Vektors ohne die Aufnahme der einzufügenden DNA (Insert) zu unterbinden. Hierzu wurde das geschnittene Plasmid mit dem Enzym Phosphatase an den 5'-Enden dephosphoryliert, danach folgte bei 65°C für 5min die Hitzeinaktivierung des Enzyms. Nach der Aufreinigung wurden die dephosphorylierten Plasmide für die anschließende Ligation verwendet.

#### Standard-Plasmid-Dephosphorylierung in 50µl Volumen:

40µl	Restriktionsverdau (mit 1µg geschnittener Plasmid-DNA)	30min bei 37°C 5min bei 65°C
5µl	10x Reaktionspuffer Antarctic Phosphatase	
1µl	Antarctic Phosphatase (10units/µl)	
4µl	dH <sub>2</sub> O	

Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

Enzyme und Puffer: New England Biolabs

### **3.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren**

Für die Verknüpfung von linearisierten Plasmidvektoren und einzufügendem DNA-Insert über eine Phosphatdiesterverknüpfung zwischen der 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylgruppe wurde das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet.

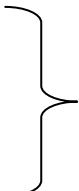
#### Standard-Ligations-Ansatz in 10µl Volumen:

50ng	linearisierter Vektor (ggf. dephosphoryliert)	1-12h bei 16°C
150ng	geschnittenes PCR-Fragment	
1µl	10x T4 Ligase-Puffer	
1µl	T4 DNA-Ligase (400units/µl)	
Xµl	dH <sub>2</sub> O (ad 10µl)	

### **3.1.9 T/A -Klonierung von PCR-Produkten mit dem pGEM-T Vektorsystem**

Vorgelagert zu Klonierungen in den Zielvektor und/oder zur einfachen Durchführung einer Mutagenese eines DNA-Fragments wurden die PCR-Produkte in den pGEM-T Plasmidvektor zwischenkloniert. Hierbei machte man sich zu nutze, dass DNA-Polymerasen ohne 5'-3'-Exonukleaseaktivität am 3'-Ende des PCR-Produkts ein zusätzliches Adenin anfügen. Der Adenin-Überhang erleichterte die Ligation in den pGEM-T Vektor, der in linearisierter Form über 5'-poly-(Tymin) Überhänge verfügt. Ein weiterer Vorteil des pGEM-T Vektor ist die Möglichkeit der blau/weiss Selektion von Klonen. Der Vektor ist in der Mitte des lacZ-Gens linearisiert. Wird kein Insert während der Ligation eingefügt, so wird das Leseraster wiederhergestellt und beta-Galactosidase kann transkribiert werden. Wird hingegen das PCR-Produkt integriert, so kommt es zur Zerstörung des lacZ-Leserasters, wodurch Klone auf LB-Platten mit 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) als Substrat und Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG) als Induktor weiße Kolonien ausbilden, während Klone ohne Insert im pGEM-T Vektor durch die enzymatische Spaltung von X-Gal zu 5-Brom-4-chlor-indoxyl zu blauen Kolonien führen.

#### Standard T/A pGEM-T Vektor-Klonierung in 10 $\mu$ l Volumen:

5 $\mu$ l	2x Puffer	
1 $\mu$ l	pGEM-T Vektor	
3 $\mu$ l	PCR-Produkt	
1 $\mu$ l	T4 DNA-Ligase	

1h bei RT  
→ Transformation

Klonierungs-Kit: Promega, pGEM-T Vector System

### **3.1.10 Einfügen spezifischer Mutation in Plasmid-DNA mittels positionsspezifischer Mutagenese (site-directed-mutagenesis)**

Mutationen in Plasmid-DNA wurden über eine PCR mit sogenannten sense und antisense Primern realisiert. Die 31bp langen Primer wurden so kreiert, dass sie den gewünschten Basenaustausch enthalten, flankiert von je 15bp komplementärer DNA. Da für diese Form der Mutagenese das komplette Plasmid amplifiziert werden musste, wurde die Mutagenese im pGEM-T Klonierungsvektor durchgeführt, der mit 3000bp eine relativ kleine Größe aufwies (Größe zuzüglich dem entsprechenden zu mutierenden Insert). Zur Vermeidung der Integration von unspezifischen Mutationen während der PCR wurde eine DNA-Polymerase

mit Fehlerkorrektoreigenschaft verwendet. Um die Plasmid-DNA, die als Template verwendet wurde und somit noch nicht die gewünschte Mutation enthält, zu entfernen, wurden die PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. DpnI verdaut spezifisch methylierte DNA und entfernt somit die Template-DNA, die während der Replikation in *E. coli* methyliert wird. Die synthetisierten PCR-Produkte sind hingegen unmethyliert und bleiben damit unverdaut. Anschließend wurde der verdaute Reaktionsansatz in kompetente *E. coli* transformiert und über Nacht auf LB-Agarplatten selektionierte Klone mittels direkter Sequenzierung auf korrekte Integration der Mutation überprüft.

#### Standard-Mutagenese-PCR Reaktion in 25µl Volumen:

18µl	dH <sub>2</sub> O
2,5µl	10x PCR Puffer
0,5µl	dNTPs (je 10mM)
1,25µl	Primer 1 (10µM)
1,25µl	Primer 2 (10µM)
1,0µl	Template (Plasmid 20ng/µl)
0,5µl	PfuUltra hotstart DNA Polymerase (2,5 U/µl)

#### Standard-Mutagenese-PCR-Programm:

96°C	2min DNA-Denaturierung initiativ	
96°C	30sek DNA-Denaturierung	
60°C	30sek Primeranlagerung	
72°C	4min DNA-Replikation (1min / 1kb)	
72°C	10min DNA-Replikation final	
5°C	Ende	

} 22 Zyklen

#### Standard-DpnI-Verdau in 25µl Volumen:

20µl	PCR Produkt	
1,5µl	dH <sub>2</sub> O	
2,5µl	NEBuffer 4	
1,0µl	DpnI	

} 1h bei 37°C

PCR-Thermocycler: Biometra, Thermocycler T1000

Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

Stratagene, PfuUltra™ Hotstart High-fidelity DNA-Polymerase (aus Pyrococcus furiosus)  
Primer: Metabion, entsalzte Oligonukleotide, HPLC aufgereinigt  
Desoxynukleotide: PeqLab, peqGold dNTP-Set 4x  
DpnI: NEB

### **3.1.11 Direkte Sequenzierung von DNA nach Sanger**

PCR-Produkte und Plasmid-DNA wurden basierend auf der Kettenabbruch-Synthese mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide sequenziert (Sanger et al. 1977). Die dem eigentlichen Sequenziervorgang vorgeschaltete Amplifikationsreaktion (Cyclesequencing) entspricht weitgehend der normalen PCR-Reaktion, mit den Unterschieden, dass nur ein Primer zu Replikation verwendet wurde und dass das Reaktionsgemisch zusätzlich zu den dNTPs auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthielt. Durch die fehlende 3'-Hydroxylgruppe der ddNTPs konnten nach deren Einbau keine weiteren Nukleotide verknüpft werden. Da der Einbau der ddNTPs ungerichtet erfolgte, erhielt man eine heterogene Mischung an PCR-Fragmenten unterschiedlicher Länge mit entsprechender ddNTP Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende des DNA-Strangs. Nach einem zwischengeschalteten Aufreinigungsschritt zur Abtrennung der nicht inkooperierten Reaktionskomponenten wurden die PCR-Produkte ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch in Glaskapilliaren des Sequenzierautomaten aufgetrennt und die Identität der 3'-Endnukleotide parallel zur Migrationsgeschwindigkeit mit einem Laser und Detektor mittels Fluoreszenz erfasst. Die vier verwendeten ddNTPs waren mit verschiedenen Fluorochromen markiert, wodurch sich die Basensequenz des DNA Fragments aus den Daten ableiten liess.

#### Standard-Cyclesequencing-Reaktion in 10µl Volumen:

50ng	DNA (PCR Produkt oder Plasmid)
5µl	2x Reaktionspuffer
0,4µM	Primer
0,5µl	BigDye 1.1 (dNTPs, ddNTPs, Polymerase)
Xµl	dH <sub>2</sub> O (ad 10µl)

### Standard-Cyclesequencing-Programm:

96°C 5min DNA-Denaturierung initiativ  
96°C 30sek DNA-Denaturierung  
55°C 30sek Primeranlagerung  
60°C 4min DNA-Replikation  
5°C Ende

} 26 Zyklen

### Cyclesequencing-Produktaufreinigung:

10µl Cyclesequencing-Produkt  
3µl 3M NaAc pH 4,7  
20µl 100% EtOH

Überstand verwerfen

Pellet mit 100µl 70% EtOH waschen

Überstand verwerfen und Pellet trocknen

In 10µl Formamid lösen

→ Sequenzierung

PCR-Thermocycler: Biometra, Thermocycler T1000 und T3000

Zentrifuge: Heraeus, Megafuge 1.0 R

Sequenzierautomat: Applied Biosystems, 3130xl Genetic Analyzer

Reaktionsmix + Puffer: Applied Biosystems, BigDye 1.1; 5x Reactionbuffer

Auswertungsprogramm: Technelysium, Chromas 2.23

## **3.2 RNA-spezifische Methoden**

### **3.2.1 RNA-Isolierung aus eukaryotischen Zelllinien**

Zur Isolierung von RNA wurde ein kommerzielles Kit verwendet, dessen Prinzip auf mechanischer Zelllyse und dem Zusatz von Guanidin-iso-Thiocyanat basierte. Danach folgte die Aufreinigung der RNA durch Affinitätschromatographie an eine Silikatmembran über Zentrifugationssäulen.

Zelllyse: Qiagen, QIAshredder Kit

RNA-Isolierungs-Kit: Qiagen, RNeasy Mini Kit

Zentrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5415R

### **3.2.2 cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase**

Zur Synthese der cDNA wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Im Rahmen dieser Arbeit wurden oligo(dT) Primer verwendet, die komplementär an den poly-(Adenin) Schwanz der mRNA binden konnten und als Synthese-Startpunkt für die Reverse Transkriptase fungierten.

#### Standard-cDNA-Synthese, Ansatz in 20µl Volumen:

3µg	total RNA	5min bei 65°C
1µl	oligo(dT) -Primer (0,5µg/µl)	
Xµl	dH <sub>2</sub> O (ad 15,7µl)	
Abkühlung auf RT (in ca. 10min)		
2µl	10x Puffer	5min bei 42°C
0,8µl	dNTPs (25mM)	60min 55°C
0,5µl	RNase Block	15min 70°C
1µl	AffinityScript (Enzym)	

cDNA-Synthes-Kit: Stratagene, AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synth. Kit

Thermocycler: Biometra, Thermocycler T3000

## **3.3 Proteinspezifische Methoden**

### **3.3.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli***

Zur rekombinanten Proteinexpression wurden die proteinkodierenden Expressionsplasmide mittels Hitzeschock in *E. coli* K12-Expressionstämme transfiziert und auf LB-Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Am nächsten Tag wurde eine Vorkultur in 5ml LB-Medium mit einem einzelnen Bakterienklon angeimpft und über Nacht im Bakterienschüttler bei 37°C kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde die Expressionskultur in einem Erlenmyerkolben aus der Vorkultur mit einer 1:50 Verdünnung inkuliert und im Bakterienschüttler bis zu einer Dichte von OD<sub>600</sub> 0,6-0,8 bei 37°C kultiviert. Nach Erreichen dieser Zelldichte wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 1mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Bakterienkulturen, je nach Applikation, für 4-12h bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert, bevor die Zellen mittels Zentrifugation (20min bei 4.000g) zur weiteren Verwendung pelletiert wurden.

Bakterienschüttler: B.Braun Biotech, Certomat HK

Zentrifuge: Heraeus, Megafuge 1.0 R

### **3.3.2 Aufreinigung rekombinanter Proteine aus Einschlusskörperchen (inclusion bodies)**

Bakterienkulturen wurden hierzu abzentrifugiert, in einem schwach basischen Salzpuffer resuspendiert und die Zellmembranen durch Inkubation mit Lysozym und EDTA abgebaut. Zusätzlich wurde die Bakterienlösung für die Zelllyse und zum Scheren der DNA mit Ultraschall behandelt und die DNA durch Zugabe des Enzyms DNaseI abgebaut. Die unlöslichen Bestandteile (inkl. der Einschlusskörperchen) wurde durch Zentrifugation pelletiert und vom löslichen Überstand abgetrennt.

#### Standard-Isolierungs-Protokoll:

Zentrifugieren bei 4.300g für 15min bei 4°C

Pellet resuspendieren in 10ml Puffer (50mM Tris, 100mM NaCl, 1mM EDTA, pH 8.0)

Lysozym zugeben auf 1,5mg/ml Endkonzentration

30min auf Eis inkubieren

Sonifikation mit 70% Leistung für 3min auf Eis mit jeweils 3min Pause (3 Zyklen)

DNaseI zugeben (100units/ml)

MgCl<sub>2</sub> zugeben auf 5mM Endkonzentration

30min bei RT inkubieren

Zentrifugation bei 12.000g für 20min

Zentrifuge: Beckman Coulter J2-HS

Ultraschall: Sonics, VibraCell VCX 400

Enzyme: Sigma, DNaseI, Lysozym

### **3.3.3 Aufreinigung von rekombinaten Proteinen durch Affinitätschromatographie**

In *E. coli* rekombinant exprimierte Proteine wurden über ein Affinitätschromatographieverfahren aufgereinigt. Hierzu wurden die entsprechenden proteinkodierenden Expressionsplasmide in den *E. coli* BL21(DE3) -Expressionsstamm transformiert und exprimiert. Die rekombinant exprimierten Proteine wurden anschließend aus den Inclusion Bodies isoliert, indem sie für 10min bei 90°C in einem SDS-Puffer gelöst

und denaturiert wurden. Unlösliche Komplexe wurden durch Zentrifugation bei 10.000g für 20min abgetrennt. Anschließend wurde die hohe SDS-Konzentration durch Fällung unter Zugabe von 1M KCl und Inkubation auf Eis stufenweise reduziert. Nach der Abtrennung des gefällten SDS durch einen Zentrifugationsschritt mit 10.000g für 10min wurden die gelösten Fraktionen mit equilibrierter Ni-NTA Agarose für 10min inkubiert. Die über die Nickel-polyHistidin Komplexe an das Säulenmaterial gebunden Proteine wurden mit 4 Waschschriften aufgereinigt, gefolgt von der Protein-Elution durch pH-Wert-Verschiebung des Elutionspuffer ins saure Milieu.

SDS-Denaturierungspuffer: 10mM Tris, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50mM SDS, pH 8,0

Waschpuffer: 10mM Tris-HCl, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM SDS, pH 8,0

Elutionspuffer: 10mM Tris-HCl, 100mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2mM SDS, pH 4,5

Zentrifuge: Beckman Coulter J2-HS

### 3.3.4 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Mit dem Bradford-Protein-Assay (Bradford 1976) wurden Proteine photometrisch quantifiziert, basierend auf der Bindung von Coomassie-Brillant-Blau G-250 an die Proteinseitenketten im sauren Milieu. Durch die Protein-Farbstoff-Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470nm nach 595nm, im Folgenden detektiert durch Messung im Photometer. Zur Kalibrierung wurde als Standardprotein BSA eingesetzt und die Messwerte der Proteinprobe in Relation zu diesem Wert berechnet.

#### Standard-Proteinmessung nach Bradford in 1ml Volumen:

200µl Roti-Quant  
800µl dH<sub>2</sub>O  
5µl Proteinprobe      } 10 min bei RT  
→ Messung Absorption bei 595nm

Photometer: Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro

Bradford Reagenz: Carl Roth, Roti-Quant

### **3.3.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektronphorese (SDS-PAGE)**

Proteinextrakte wurden mittels SDS-PAGE Verfahren aufgetrennt. Die Methode basiert auf der elektrophoretischen Mobilität von Proteinen in einer Gelmatrix. Die hierzu verwendete Matrix besteht aus mit SDS versetztem polymerisiertem Polyacrylamid. Das SDS maskiert die Eigenladung der Proteine, wodurch diese im elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe separiert werden können. Zur Abschätzung der Proteingrößen wird parallel zu den zu analysierenden Proben ein Standard aufgetragen. Im Rahmen dieser Arbeit kamen Gele mit einem Polyacrylamidgehalt von 10-12% zur Anwendung. Die Proteinproben wurden vor dem Gellauf mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Der Gellauf wurde im 1x SDS-Laufpuffer bei 30mA und ca. 150V für 1-1,5h durchgeführt.

#### Standard-Proteingel (10% PAA) mit 10ml Volumen:

##### Trenngel:

4,8ml dH<sub>2</sub>O

2,5ml 40 % Acrylamide

2,5ml 1.5M Tris-HCl pH8,8

0,1ml 10 % SDS

16µl APS 40%

16µl TEMED

##### Sammelgel:

7,7ml dH<sub>2</sub>O

1,25ml Tris-HCl pH6,8

1ml 40% Acrylamid

0,1ml 10% SDS

16µl APS 40%

16µl TEMED

Gel Elektrophorese System: BioRad, Mini Protean III

Netzteil: Serva, BluePower 500

Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

4x SDS-Probenpuffer: 1,28g SDS, 0,8ml β-Mercaptoethanol, 4ml 1M Tris-HCl pH7,6, 11,5ml 87 % Glycerol, 3,5ml dH<sub>2</sub>O, 0,1g Bromphenolblau

10x SDS-Laufpuffer: 40mM Tris-HCl, 2M Glycine, 1% SDS, pH 8,6

Proteinstandard: Fermentas, PageRulerTM Prestained

### **3.3.6 Immunoblot (Western Blot)**

Nach der Durchführung des SDS-PAGE-Verfahrens wurden die der Größe nach aufgetrennten Proteine und der Standardmarker aus dem Gel elektrophoretisch auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen übertragen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Elektrophorese ein Semidry-Blot-System mit einem Towbin-Puffersystem verwendet (Towbin et al. 1979).

#### Standard-Proteintransfer aus dem Polyacrylamidgel auf die PVDF-Membran:

Membranaktivierung: Inkubation in 100% Methanol für 10sek

Proteintransfer: 1x Towbinpuffer mit 10% Methanol, 1,5mA/cm<sup>2</sup> Membranfläche,  
bei maximal 15V für 60min

Blotting System: BIORad, Semi Dry Blotter

PVDF-Membran: Millipore, Immobilon-P Transfer Membrane PVDF

Towbinpuffer: 190mM Glycin, 25mM Tris-HCl, pH8,6

Die im Anschluss durchgeführte Immunodetektion basiert auf dem Antigen-Antikörper-Bindungs-Prinzip. Hierzu wurde ein antigenspezifischer Primärantikörper verwendet um das entsprechende Protein auf der Membran zu detektieren.

Nach dem Abdecken unspezifischer Antikörperbindungsstellen mit 4% fettfreiem Milchpulver in 1x PBS und der Inkubation mit dem Primärantikörper in 0,4% fettfreiem Milchpulver in 1x PBS wurde in einem dritten Schritt ein Peroxidase-markierter Sekundärantikörper verwendet, der an den konstanten Teil des Primärantikörpers band. Die Peroxidase setzt das Substrat Luminol um, was zur Lichtemittierung und so zur Visualisierung der Proteine auf einem Röntgenfilm führt.

Röntgenfilme: AGFA, CURIX Ultra UV-G

Chemilumineszenz-Kit: Pierce, ECL Western Blotting Substrate

10 x PBS: 1,5M NaCl, 83mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 17mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

Sekundär-Antikörper: Calbiochem, anti-mouse-HRP (1:10.000)

## **3.4 Mikrobiologische Methoden**

### **3.4.1 Kultivierung von *E. coli* K12 Stämmen**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* K12 Stämme wurden bei 37°C in flüssigem LB-Medium oder auf LB-Agarplatten kultiviert. Flüssigkulturen in 1-10ml wurden mit Einzelklonen inkokuliert und in 15-50ml Reaktionsgefäßten kultiviert, während Inkubationsansätze >100ml mit 5ml Vorkulturen angeimpft und in 250-1000ml Erlenmyerkolben kultiviert wurden. Selektionsantibiotika wurden wie folgt angewendet.

Ampizillin (amp): 100µg/ml

Kanamycin (kan): 25µg/ml

Tetracyclin (tet): 10µg/ml

Chloramphenicol (chl) 25µg/ml

Autoklav: Systec, Autoklav V-150

LB-Medium (1l): 10g Baktotrypton, 5g Hefextrakt, 10g NaCl, pH 7,0

LB-Agarplatten (1l): 10g Baktotrypton, 5g Hefextrakt, 10g NaCl, 15g Agar, pH 7,0

### **3.4.2 Transformation von Plasmid-DNA in chemisch-kompetente Bakterien**

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA und für die rekombinante Proteinexpression wurden die entsprechenden Plasmide mittels Transformation in die *E. coli* K12 Stämme eingeschleust. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten chemisch kompetenten *E. coli* Stämme (Kalziumchlorid-Methode) kam das Hitzeschockverfahren zur Anwendung.

#### Standard-Transformations-Ansatz in 110µl Volumen:

100µl kompetente Bakterienlösung (auf Eis aufgetaut)

10µl Ligationsansatz oder 50ng Plasmid-DNA

30 min auf Eis inkubieren

45sek bei 42°C (Hitzeschock)

2min auf Eis inkubieren

900µl SOC-Medium zugeben

1h 37°C schütteln

24h 37°C inkubieren (nach Plattierung auf LB-Platten mit Selektions-Antibiotika)

Thermoblock: Eppendorf, Thermomixer compact

Inkubator: Memmert, BE 400

SOC-Medium (1l): 20g Baktotrypton, 5g Hefextrakt, 0,5g NaCl 0,2g KCl, 0,95g MgCl<sub>2</sub>, 3,6g Glucose, pH 7,0 ad 1l dH<sub>2</sub>O

### **3.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Zur Isolierung von bakterieller Plasmid-DNA wurden kommerzielle Kits verwendet, basierend auf Affinitätschromatographie unter Verwendung von Zentrifugationssäulen bzw. Gravitationssäulen mit Silikatmembran. Bakteriensuspensionen wurden bis zur Sättigung ( $OD_{600} > 0,8$ ) kultiviert und mittels Zentrifugation pelletiert. Mit alkalischer Lyse wurden die Zellen aufgebrochen und die Plasmid-DNA von Proteinen und anderen Zellbestandteilen nach Neutralisation mittels hypertonischen sauerem Salzpuffer über Zentrifugation abgetrennt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend an die Silikatmembran gebunden, mittels Waschschritten (ethanolhaltig) aufgereinigt und abschließend mit hypotonischer Salzlösung eluiert.

Plasmid-DNA aus Übernachtkulturen mit 1-5ml wurden mit sog. Minipräps isoliert, 50-200ml Bakterienkulturen mit sog. Midipräps, >200ml mit sog. Maxipräps.

Bakterienschüttler: B.Braun Biotech, Certomat HK

Minipräp-Kit: Macherey-Nagel, Nucleo Spin® Plasmid

Midipräp-Kit: Macherey-Nagel, Nucleobond® Xtra Midi

Zentrifuge: Heraeus, Megafuge 1.0 R

## **3.5 Zellkultur-spezifische Methoden**

### **3.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

Cos-7 Zellen wurden entsprechend den Empfehlungen von ATCC (American Type Culture Collection) in DMEM-Medium, supplementiert mit 10% FCS und 100Units/ml Penicillin & 100µg/ml Streptomycin in einem Inkubator bei 37°C mit gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert.

ARPE-19 Zellen wurden unter identischen atmosphärischen Konditionen kultiviert in 1:1 DMEM : Ham's F12 Medium, supplementiert mit 10% FCS und 100 Units/ml Penicillin & 100 $\mu$ g/ml Streptomycin.

Alle Zelllinien wurden vor Erreichen von 100% Konfluenz mittels tryptischem Verdau (0,05% Trypsin, 0,5mM EDTA in 1x PBS) passagiert.

CO<sub>2</sub> Inkubator: Binder, CB150

Steril-Sicherheitswerkbank: BDKS, 1200

Zentrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5810

Wasserbad: Medingen, W12

Mikroskop: Leica, DM IL HC

Medien etc.: PAA, Invitrogen

### **3.5.2 Transfektion von eukaryotischen Zelllinien**

Vorbereitend wurden die zu transfizierenden Zellen bis zu einer Dichte von ca. 70-80% kultiviert. Als Transfektionsreagenz kam ein kommerzielles lipidbasiertes Multi-komponentenreagenz zu Anwendung. Die Reaktionskomponenten wurden entsprechend der Herstelleranweisung angewendet und die transfizierten Zellen 24 Stunden nach der Transfektion für weitere Versuche durch Abschaben mit einem Zellspatel geerntet.

#### Standard-Transfektions-Ansatz für 10cm Zellkulturschale in 600 $\mu$ l Volumen:

570 $\mu$ l Medium (FCS-frei)

10 $\mu$ g Plasmid-DNA (ca. 0,5 $\mu$ g/ $\mu$ l)

20 $\mu$ l FugeneHD Transfektionsreagenz



Kurz vortexen  
15min RT Inkubation  
Gleichmäßiges Auftröpfen

Vortexer: Scientific Industries, Vortex Genie II

### **3.6 Sonstige Methoden**

#### **3.6.1. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Mit dieser Methode lassen sich die Bindungen von Transkriptionsfaktoren an DNA-Fragmente analysieren. Hierzu wurden Protein-Kernextrakte mit radioaktiv markierten

dsOligonukleotiden inkubiert und anschließend elektrophoretisch in einem nativen Polyacrylamidgel der Größe nach aufgetrennt. Zur Überprüfung der Spezifität der DNA-Protein-Bindung wurden Kompetitionsansätze durchgeführt, wofür unmarkierte dsOligonukleotiden im Überschuss dem Reaktionsansatz zugegeben wurden. Das elektrophoretisch aufgetrennte Probengemisch im Gel wurde anschließend auf Whatman-Papier transferiert und im Vakuumtrockner auf dem Filterpapier fixiert. Im PhosphoImager erfolgte abschließend die Detektion durch Exposition von Röntgenfilmen mit Europium-beschichteten,  $^{32}\text{P}$  sensitiven Filmkassetten.

#### Standardansatz zur Isolierung von Protein-Kernextrakten aus 200mg ARPE-19 Zellen:

ARPE-19 Zellen mit Zellschaber ernten und mit 1x PBS in 1,5ml Reaktionsgefäß überführen  
 Zentrifugation bei 500g für 3min  
 Zellpellet mit 1ml CER I Puffer (gekühlt) resuspendieren  
 15sek vortexen und 10min auf Eis inkubieren  
 Zugabe von 55 $\mu\text{l}$  CER II Puffer (gekühlt)  
 5sek vortexen und 1min auf Eis inkubieren  
 5sek vortexen und bei 16.000g für 5min zentrifugieren  
 Unlösliche Fraktion in 500 $\mu\text{l}$  NER Puffer resuspendieren  
 15sek vortexen und 10min auf Eis inkubieren (4x wiederholen)  
 Zentrifugation bei 16.000g für 10min  
 Überstand (enthält die nukleären Proteine, ca. 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) aliquotieren  
 Bei -80°C lagern

#### Standardansatz zu Herstellung radioaktiv markierter dsOligonukleotide:

10 $\mu\text{l}$ sense Oligonukleotid (100 $\mu\text{M}$ )	}	5min bei 95°C
10 $\mu\text{l}$ antisense Oligonukleotid (100 $\mu\text{M}$ in dH <sub>2</sub> O)		

→ 1:10 Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O (ergibt 5 $\mu\text{M}$ )

10,5 $\mu\text{l}$ dH <sub>2</sub> O	}	1h bei 37°C
1 $\mu\text{l}$ dsOligonukleotide (5 $\mu\text{M}$ )		
2 $\mu\text{l}$ 10x Kinasepuffer		
5 $\mu\text{l}$ [ $\gamma$ -32P]-dATP (32P)		

1,5 $\mu\text{l}$  T4-Polynukleotid-Kinase

Abtrennung ungebundener [ $\gamma$ -32P]-dATP (32P) Nukleotide:

20 $\mu$ l Markierungsreaktion  
20 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O  
→ Transfer auf Sephadex Säulen } 2x Zentrifugation 1.100g für 2min

Standardansatz für 5% Polyacrylamidgel in 40ml Volumen:

6,9ml 30% Polyacrylamid  
2ml 10x TBE-Puffer  
X ml dH<sub>2</sub>O (ad 40ml)  
172 $\mu$ l 10% Amoniumperoxiddisulfat  
43 $\mu$ l TEMED

Standard-DNA-Protein-Bindungsansatz in 20 $\mu$ l Volumen:

4 $\mu$ l 5x GSA-Puffer  
1 $\mu$ l Poly dI-dC (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)  
X $\mu$ l Kernextrakt (5 $\mu$ g)  
X $\mu$ l dH<sub>2</sub>O auf 18 $\mu$ l  
2 $\mu$ l radioaktiv markierte dsOligonukleotide  
2 $\mu$ l unmarkierte dsOligonukleotide (50 $\mu$ M) (optional)  
2 $\mu$ l dH<sub>2</sub>O  
4 $\mu$ l Ladepuffer } 20min bei 37°C

- Polyacrylamidgel Vorlauf in 0,5% TBE Puffer: 30min bei 250V und 50mA
- Geltaschen beladen
- Gellauf: 1,5h bei 250V und 50mA

Kernproteinextraktion-Kit: Pierce, Nuclear & Cytoplasmatic Extraction Kit

Gel Shift Assay System: Promega

Netzteil: Serva, BluePower 500

Gelkammer: BioRad, Protean II

Zentrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5415R

Zentrifuge: Sigma, Typ2-5

Geltrockner: BioRad Gel Dryer Model 583

Vakuumpumpe: Neuberger Laboport, KnF

Enzym: NEB, T4-Polynukleotid-Kinase

Sephadex Säulen: Roche, Quick Spin Columns G-25 Sephadex

Oligonukleotide: Metabion, entsalzte Oligonukleotide, HPLC aufgereinigt

Radioaktivität: GE Healthcare

Ladepuffer: (4x) 80% Formamid, 10mM NaOH, 1mM EDTA, 0,1% Xylencyanolblau

Filme: Kodak BioMax

Filmkassetten: Kodak BioMax MS

### **3.6.2 Luziferase-Reportergen-Assay**

Zur Identifizierung und Charakterisierung von DNA-Abschnitten bezüglich ihrer potentiellen Funktion als Promotor wurde ein Reportergenassay durchgeführt. Der Assay basierte auf Expressionsvektoren, in die über Klonierungen die zu analysierenden DNA-Fragmente eingefügt wurden. Diese DNA-Fragmente kontrollierten dann die Expression des Reportergens Luziferase. Hierzu wurden die Luziferase-Reportergen-Plasmide in Zelllinien heterolog transfiziert (10µg Plasmid-DNA auf ca.  $10^7$  ARPE-19 Zellen, kultiviert in 10cm Zellkulturschalen). Nach 24h wurden die Zellen lysiert und die Luziferaseaktivität in den Proteinextrakten durch Zugabe des Luciferins-Substrates in einem Luminometer quantifiziert. Für die Versuchsreihen in dieser Arbeit wurde ein kommerzielles Luziferase-Assay-System verwendet.

#### Standard-Luziferase-Versuchsansatz:

Die 24h zuvor transfizierten Zellen wurden zwei Mal mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von 500µl 1x Reporter-Lysis-Buffer wurden die Zellen für 15min inkubiert und vollständig lysiert. Nach Abschaben aller Zellfragmente mit Zellschabern wurden die Zelllysate für 2min bei 13.000g zentrifugiert und die von unlöslichen Zellbestandteilen abgetrennten Lysate zur weiteren Analyse verwendet.

10µl Zelllysat

100µl Luciferin-Reaktionsgemisch

} Messung der RLU/s (Relative Light Units pro Sekunde) im Luminometer

Luziferase-Assay-Kit: Promega, Luziferase-Assay-System

Lysis-Puffer: Promega, 5x Reporter-Lysis-Buffer

Luminometer: BMG Labtech, FLUOstar Optima mit LUMIstar Aufrüstung

Zentrifuge: Eppendorf, Centrifuge 5415R

### **3.6.3 ToxR-Dimerisierungsassay** (Brosig et al. 1998)

Zur Charakterisierung der Interaktionen zwischen Transmembran-Domänen (TMD) *in vivo* wurde ein lacZ-Reportergen-Assay verwendet. Hierzu wurden die DNA-Sequenzen der zu analysierenden TMD in einem bakteriellen Expressionsvektor (pToxRIV) kloniert. Diese Expressionsplasmide kodierten für ein Fusionsproteine bestehend aus Maltosebindeprotein + TMD + ToxR-Transkriptionsfaktor. Die Plasmide wurden anschließend in den *E. coli* Stamm FHK12 (Kolmar et al., 1994) transformiert und die Fusionsproteine durch Induktion mit L-Arabinose und IPTG exprimiert. Die FHK12 Bakterienzellen haben in ihr Genom das lacZ-Reportergen integriert, das unter der Kontrolle des ctx-Promotors (aus *Vibrio Cholerae*) steht. Der ctx-Promotor kann durch die Bindung der dimerisierten Form des ToxR-Transkriptionsfaktors aktiviert werden. Kommt es zur Dimerisierung der Fusionsproteine über die TMD, dimerisieren im Folgenden auch die ToxR-Untereinheiten, die zur Aktivierung des ctx-Promotors führen. Der aktivierte ctx-Promotor induziert die Expression des Reportergens lacZ, dessen Genprodukt, das Enzym beta-Galactosidase, in einem ONPG-Assay quantifiziert wird. Die beta-Galactosidase-Aktivität kann direkt in Relation zur Stärke der Dimerisierung zwischen den TMD gesetzt werden.

#### Durchführung ToxR-Assay:

ToxR-Expressionsplasmide wurden mittels Hitzeschocktransformation in *E. coli* FHK12 transformiert und auf LB-amp-kan Platten kultiviert. Am folgenden Tag wurden mit Einzelkolonien die Übernachtkulturen in LB-amp-kan mit 0.005% L-Arabinose und 0.4mM IPTG bei 37°C im Bakterienschüttler angesetzt. Am nächsten Tag wurden aus den Übernachtkulturen in 1:50 Verdünnung (mit identischem Wachstumsmedium) neue Kulturen angeimpft und für ca. 5h bei 37°C kultiviert. Dann wurden 100µl Teilproben in 1ml Z-Puffer verdünnt und die Zelldichte im Photometer bei OD<sub>600</sub> bestimmt. Anschließend wurden die Bakerienzellen durch Zugabe von 100µl Z-Puffer + 1,6% SDS für 15min in einem Schüttler bei 30°C vollständig lysiert. Nach Zugabe von 100µl Substratlösung (Z-Puffer + 4 mg/ml ortho-Nitrophenyl-β-Galactoside (ONPG)) wurde für ca. 20min bei 30°C inkubiert und das Reaktionsendprodukt, der Farbstoff o-Nitrophenol, bei 405nm im Photometer quantifiziert.

Photometer: Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro

Bakterienschüttler: Buehler, Schüttelinkubator KS15 + TH15

Bakterienstamm: *E. coli* FHK12 (amp resistent)

Z-Puffer: 60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 40mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 10% CHCl<sub>3</sub>, 1% β-Mercaptoethanol, pH 7,0

### **3.6.4 Membranintegrationsassay (Brosig et al. 1998)**

Zur Überprüfung der Membranintegration der im ToxR-Assay analysierten Fusionsproteine wurde ein Komplementierungsassay auf Maltose-Basis durchgeführt. PD28 Bakterienzellen sind Maltosebindeprotein(MBP)-defizient und können in einem Minimalmedium mit Maltose als einziger Kohlenstoffquelle nur replizieren, wenn sie über einen Expressionsvektor mit dem Maltosebindeprotein komplimentiert werden. *E. coli* PD28 (Bedouelle & Duplay, 1988) Zellen wurden hierzu mit den Fusionsprotein-kodierenden (MBP+TMD+ToxR) ToxR-Plasmiden transformiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienschüttler in LB-kan-tet Medium kultiviert. Die hierdurch exprimierten Fusionsproteine konnten die MBP-Defizienz nur ausgleichen, wenn sie über die TMD korrekt in die Bakterienmembran integriert wurden und somit über ihre MBP-Domänen Maltose aus dem Nährmedium in die Zelle transportiert werden konnte. Am nächsten Tag wurden die Zellen durch Zentrifugation (20min bei 4.000g) pelletiert, 2x mit sterilem 1x PBS gewaschen und zuletzt in 1x PBS resuspendiert. Die aufgereinigten Zellen wurden anschließend in 1:200 Verdünnungen in Minimalmedium inkuliert und bei 37°C im Bakterienschüttler kultiviert. Zur Bestimmung des Replikationsvermögens wurde die Zelldichte mit Aliquots der Bakteriensuspensionen in 24h Intervallen im Photometer bei 650nm bestimmt.

Photometer: Amersham Biosciences, Ultrospec 2100 pro

Bakterienschüttler: Buehler, Schüttelinkubator KS15 + TH15

Bakterienstamm: *E. coli* K12 PD28

Minimalmedium: 1x M9-Salze 0,4% Maltose, 80µg/ml Leucin, 80µg/ml Threonin, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 25µg/ml Kanamycin and 10µg/ml Tetrazyklin

### **3.6.5 Detergenzien-Dimerisierungsassay (Lemmon et al. 1992)**

Um die Dimerisierungseigenschaften von TMD *in vitro* zu analysieren wurde ein Detergenzien-Dimerisierungsassay verwendet. Dieser Versuchsansatz basiert auf der rekombinaten Expression von Fusionsproteinen bestehend aus polyHistidin-tag+MBP+TMD. Die Proteine werden in detergenzienhaltiger Lösung mittels Affinitätschromatographie isoliert

und aufgereinigt. Durch die Verwendung von 5mM n-dodecyl β-D-Maltoside werden TMD-Interaktionen in der detergenzienhaltigen Lösung stabilisiert und können anschließend mit SDS-PAGE und Immunoblot charakterisiert werden. Bei diesen Versuchen wurde durch die Zugabe von 5mM n-dodecyl β-D-Maltoside und anschließendem Fällen des SDS mit KCl im Überschuss der Detergenziaustausch vollzogen. Durch einen weiteren Zentrifugationsschritt bei 10.000g für 10min wurde das gefällte SDS abgetrennt und der Überstand durch 0,45µm Filter aufgereinigt. Über Nacht folgte eine Dialyse mit einer Zellulosemembran gegen einen leicht basischen Salzpuffer, um die native Proteinstruktur wiederherzustellen und die Interaktionen zwischen den TMD der rückgefalteten Fusionsproteine zu ermöglichen. Anschließend wurde durch eine 30-60min Zentrifugation bei 1.500g mit Amicon Proteinkonzentrationssäulen die Proteinkonzentration auf ca. 1mg/ml erhöht. Die aufkonzentrierten Proteinproben wurden abschließend mit SDS-PAGE auf 10% Polyacrylamidgelen und dem Immunoblotverfahren mit einem anti-polyHistidin-Antikörper bezüglich ihrer Oligomerisierungs-Komplexierung charakterisiert.

Zentrifuge: Beckman Coulter J2-HS

Ultrafiltrationssäulen: Millipore, Amicon Ultra-15 Ultracel-10kDa

Affinitätschromatographie: Qiagen, Ni-NTA Agarose

PVDF-Filter: Millipore, 0,45µm Filter-device ultra low binding

Dialysemembran: Spectrum Laboratories, Spectra/Por7 Dialysis Membrane MWCO 10kDa

Dialysepuffer: 50mM Tris-HCl, 50mM NaCl, pH 8,0

### **3.6.7 Exon-trapping-Assay**

Zur Charakterisierung von Mutationen im Bereich eines Exon-Intron-Übergangs, der sogenannten Spleißstelle, wurde ein Exon-trapping-Assay durchgeführt (Yardley et al. 2004). Der Assay basiert auf dem Expressionsplasmid pSPL3, das unter der Kontrolle des SV40-Promotors ein Mini-Gen beinhaltet. Dieses Mini-Gen besteht aus zwei Exons mit angrenzenden intronischen Sequenzen des Hämoglobingens. Zwischen den beiden Hämoglobin-Exonen liegt die Multible Cloning Site (MCS), über die die zu charakterisierenden Exon/Intron-Varianten (wildtypisch und mutant) eingefügt werden können. Nach abgeschlossener Klonierung und Vervielfältigung der pSPL3-Konstrukte wurden die Plasmide in eukaryotische Zelllinien transfiziert und die RNA nach 24h extrahiert. Die RNA wurde photometrisch quantifiziert und 3µg mit dem Enzym Reverse Transkriptase

und poly(T)-Primern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde anschließend in eine RT-PCR als Template eingesetzt. Die hierfür verwendeten Primer banden entsprechend an den Anfang des ersten Hämoglobinexons und das Ende des zweiten Hämoglobinexons. Die hiermit amplifizierten PCR-Produkte bestehen entweder aus dem ersten Hämoglobin exon & dem inserierten Exon & dem zweiten Hämoglobin exon, oder nur aus dem ersten & zweiten Hämoglobin exon. Die mit der RT-PCR detektierten Spleißprodukte aus den transfizierten Zelllinien zeigen, inwieweit die zu charakterisierenden Mutationen im eingefügten Exon-Intron DNA-Fragment Auswirkungen auf das Spleißen haben. Die entsprechenden RT-PCR-Produkte wurden abschließend densiometrisch quantifiziert.

## **4. Durchführung und Ergebnisse**

### **4.1 Dimerisierungseigenschaften der Transmembrandomänen der humanen Bestrophin Proteinfamilie – Einfluss von Mutationen auf die Dimerisierung**

Eine der Zielsetzungen dieser Arbeit war es die Transmembrandomänen (TMD) der humanen Bestrophine-1-4 bezüglich ihrer Dimerisierungseigenschaften zu untersuchen. Insbesonders sollte geklärt werden, welche der TMD zur Dimerisierung beitragen können und ob Patientenbezogene Mutationen in den TMD von Bestrophin-1 einen Einfluss auf die Dimerisierung haben. Für die Analysen wurde ein *in vivo* ToxR-basierter Dimerisierungs-Assay in *E. coli* (Langosch et al. 1996) und ein *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay mit rekombinant exprimierten Proteinen (Lemmon et al. 1992) verwendet.

#### **4.1.1 Definition der TMD Sequenzabschnitte von Bestrophin-1-4**

Die in dieser Arbeit verwendeten Transmembransequenzen der Bestrophin Proteine basieren auf Hydrophobizitätsvorhersagen der Primärsequenzen der humanen Bestrophin Proteinfamilie. Diese Vorhersagen wurden vorab in unserer Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durch *in silico* Berechnungen und *in vitro* Experimente im Rahmen einer Dissertation erarbeitet und publiziert (Milenkovic 2005; Milenkovic et al. 2007). Folgende Sequenzabschnitte wurden als TMD für die Untersuchungen definiert:

	<b>TMD1</b>	<b>TMD2</b>
<b>Bestrophin-1</b>	YKLLYGEFLIFLLCYYIIRFI	SYIQLIPISFVLGFYVTLVVT
<b>Bestrophin-2</b>	YKLLWRELLCFLGFYMALSA	QYASLIPVSFVLGFYVTLVVN
<b>Bestrophin-3</b>	YKLLYREFIVFAVLYTAISLV	RYAEQIPVTFVLGFYVTLVVN
<b>Bestrophin-4</b>	YKLLYKEFLLFGALYAVLSIT	RSADLIPLSFVLGFYVTLVVN
	<b>TMD3</b>	<b>TMD4</b>
<b>Bestrophin-1</b>	RYANLGNVLILRSVSTAVYKR	MFWVPWWFANLSMKAWLGGR
<b>Bestrophin-2</b>	RYAGLSAVLILRSVSTAVFKR	KYWVPCVWFNSNLAAQARREGR
<b>Bestrophin-3</b>	RYVNLTSLIFRSVSTAVYKR	KYWVPFIWFGNLATKARNEGGR
<b>Bestrophin-4</b>	RYANLASVLVLRSVSTRVLKR	KYWVPCVWFTNLAAQARRDGR
	<b>TMD5</b>	<b>TMD6</b>
<b>Bestrophin-1</b>	IPLVYTQVVTVAVYSFFLTCL	DLVVPVFTFLQFFFYVGWLKV
<b>Bestrophin-2</b>	VPLVYTQVVTIALYSYFLACL	DLCVPIFTLLQFFFYAGWLKV
<b>Bestrophin-3</b>	IPLVYTQVVTLAVYTFFFACL	DLYIPIFTLLQFFFYAGWLKV
<b>Bestrophin-4</b>	IPLVYTQVVTIAVYSFFALSL	DMYVPLTLLQFFFYAGWLKV

Abbildung 10  
TMD-Primärsequenzen der humanen Bestrophine-1-4

Über die Analyse der Hydrophobizität der Aminosäuresequenzen der humanen Bestrophine-1-4 (Abb. 11 A) lassen sich hypothetische Topologiemodelle ableiten, die u.a. als Grundlage für die hier vorliegende Arbeit genutzt wurden (Abb. 11 B-D).

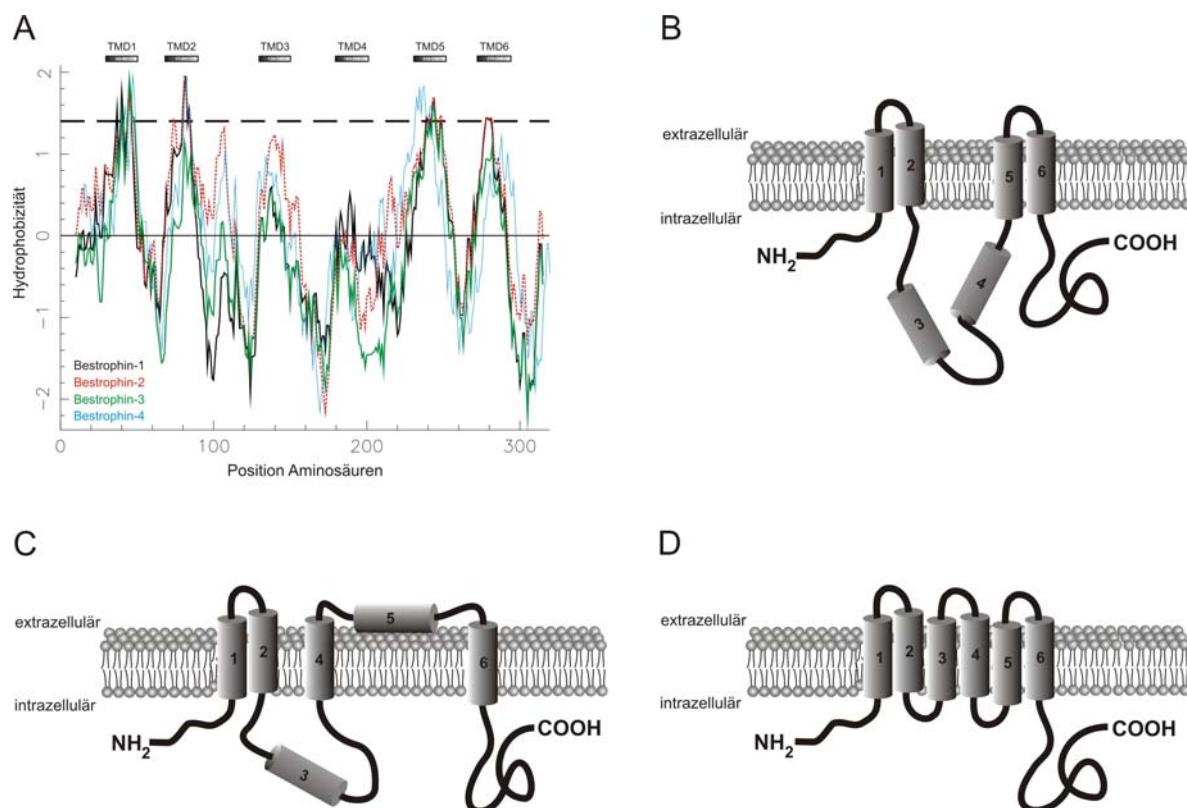


Abbildung 11

Hydrophobizität basierende TMD-Vorhersagen der humanen Bestrophine-1-4 und Topologiemodelle humanes Bestrophin-1:

A: Hydrophobizitätsblot der humanen Bestrophin Proteinfamilie, analysiert wurden die N-terminalen Proteinabschnitte (Aminosäuren 1-320) mit dem Algorithmus nach (Kyte et al. 1982) und TOPPRED II Algorithmus nach (von Heijne 1992); (Abbildung modifiziert von (Milenkovic 2005).

B-D: Theoretische Topologiemodelle von humanem Bestrophin-1 mit 4-6 membrandurchdringenden TMD (Abbildungen abgeleitet aus Milenkovic 2005).

#### 4.1.1.1 Auswahl der Bestrophin-1 Mutationen

Eine Liste an VMD2 Mutationen, die innerhalb der vorhergesagten TMD liegen, wurde der öffentlichen VMD2 Datenbank mit Stand 2006/07 entnommen ([http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2\\_database](http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2_database)). Diese 28 Mutationen wurden anschließend im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit *in vivo* und *in vitro* basierten Dimerisierungsanalysen charakterisiert, um zu klären, in wie weit diese Mutationen Einfluss auf TMD-TMD Interaktionen haben.

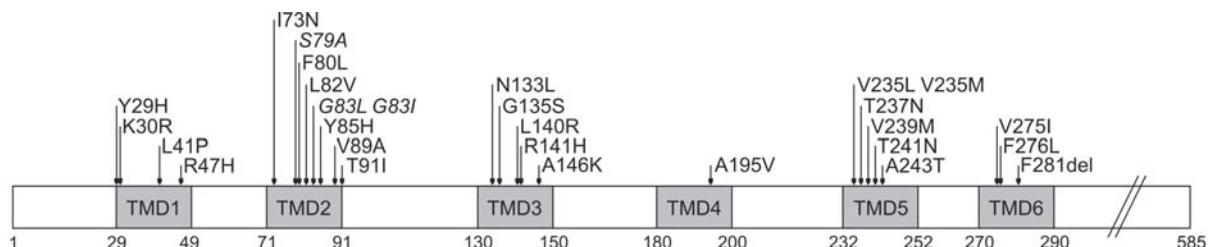


Abbildung 12

Schematische Darstellung der Primärstruktur des humanen Bestrophin-1 Proteins:

Die TMD sind grau hinterlegt und entsprechend ihrer Aminosäurenposition beziffert. Im N-terminalen Proteinabschnitt sind 25 Patienten-bezogene, sowie 3 artifizielle Mutationen (*kursiv*) relativ zu ihrer Position innerhalb der sechs TMD mit Pfeilen gekennzeichnet.

#### 4.1.2. ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsanalyse

Der *in vivo* ToxR Dimerisierungs-Assay quantifiziert über eine Reporteraktivität die Interaktion von TMD in dem biologischen Membransystem von *E. coli*. Die in den *E. coli* Reporterstamm FHK12 transformierten pToxRIV\_VMD\_TMD Plasmide kodieren für ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteine. Diese Proteine werden unter Kontrolle des pBAD Promotors exprimiert und integrieren sich mit der jeweiligen hydrophoben TMD in die innere Membran (IM) von *E. coli*. Sofern die TMD basierend auf ihren Aminosäurenkompositionen

innerhalb der IM dimerisieren, lagern sich ebenfalls die ToxR Anteile der Fusionsproteine als aktiver Transkriptionsfaktor zusammen. Die dimerisierte Form von ToxR bindet als Transkriptionsfaktor an dem im *E. coli* Genom lokalisierten ctx-Promotor und aktiviert diesen. Die Aktivierung führt zur Expression des ctx-Promotor-kontrollierten Reportergens lacZ und somit zur Translation von beta-Galaktosidase. Die Menge an beta-Galaktosidase ist proportional zur TMD-TMD Interaktion und wird anschließend über einen enzymatischen Assay quantifiziert. Hierbei führen schwache TMD-TMD Dimerisierungen zu niedrigen, hingegen starke TMD-TMD Interaktionen zu hohen lacZ Expressionsniveaus (siehe Abb. 13).

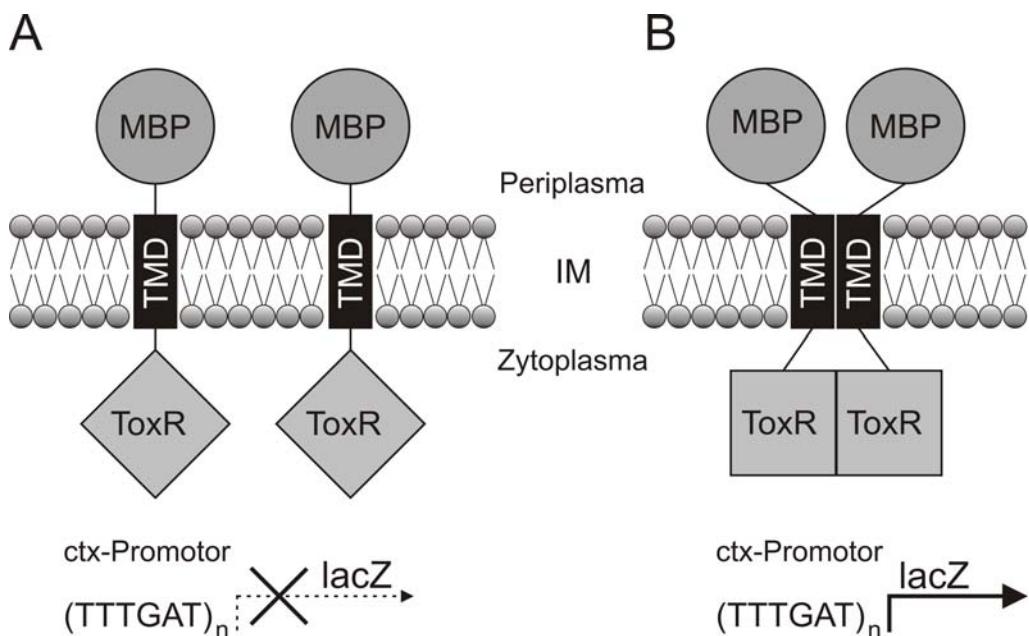


Abbildung 13

Schematische Darstellung des *in vivo* ToxR Dimerisierungs-Assays:

Fusionsproteine bestehend aus ToxR\_TMD\_MBP integrieren in die innere Membran (IM) von *E. coli*.

A) Die TMDen der Fusionsproteine bilden keine dimerische Struktur aus, wodurch die ToxR Transkriptionsfaktoruntereinheiten in monomerischer, inaktiver Form verbleiben. Es erfolgt keine Aktivierung des ctx-Promotors und das lacZ Reporterogen wird nicht/schwach exprimiert.

B) Die TMDen der Fusionsproteine lagern sich zu Dimeren zusammen, wodurch die zytoplasmatisch orientierten ToxR-Transkriptionsfaktoruntereinheiten ebenfalls dimerisieren und zur Aktivierung des ctx-Promotors und folglich zur lacZ Expression führen.

#### **4.1.2.1 Klonierung der TMD1-6 der humanen Bestrophine 1-4 und der TMD1-6 Mutationen von Bestrophin-1**

Die einzelnen TMD-kodierenden cDNA Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Über Oligonukleotide wurden hierbei an die 63bp langen DNA-Fragmente zusätzlich eine 5'-Nhe-I und eine 3'-BamH-I Restriktionsschnittstelle angefügt. Die PCR Produkte wurden über die durch die DNA-Polymerase bedingten 3'-Adeninüberhänge in pGEM-T Vektoren zwischenkloniert. Nach der Selektion der Klone erfolgte über einen Restriktionsdoppelverdau mit Nhe-I und BamH-I die Klonierung aus den pGEM-T Plasmiden in die pToxRIV Vektoren. Hierzu wurden die Reaktionsansätze nach der Ligation in kompetente *E. coli* transformiert und die pToxRIV Klone mit dem Antibiotikum Kanamycin auf LB-Platten selektioniert. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli* Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Integration der entsprechenden Insertionen überprüft. Die finalen pToxRIV\_VMD\_TMD\_Plasmide kodieren unter der Kontrolle des Arabinose-induzierbaren pBAD-Promotors für die Fusionsproteine. Diese bestehen aus drei Teilen, der Transkriptionsfaktoruntereinheit ToxR, der entsprechenden TMD aus der Bestrophin Proteinfamilie und dem MBP bei einem Molekulargewicht von ca. 69 kDa. Neben den wildtypischen TMD wurden auch die Punktmutation-enthaltenden TMD von cDNA-kodierenden Plasmiden und/oder durch mutationskodierende Oligonukleotide mittels PCR generiert. Im Allgemeinen wurden positive Klone bei der Kolonie-PCR durch die zugehörigen Oligonukleotidpaare M13-F und M13-R (in pGEM-T) sowie ToxR-F und ToxR-R (in pToxRIV) identifiziert und durch Sequenzierung bestätigt (siehe Abb. 14).

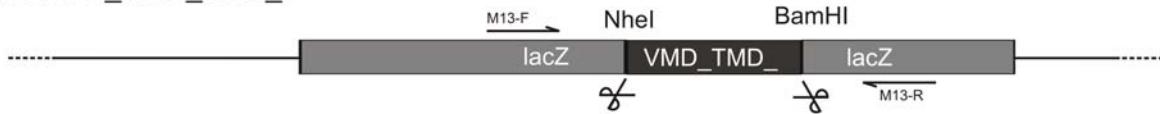
PCR-Fragmente VMD\_TMD\_:



pGEM-T\_leer:



pGEM-T\_VMD\_TMD\_:



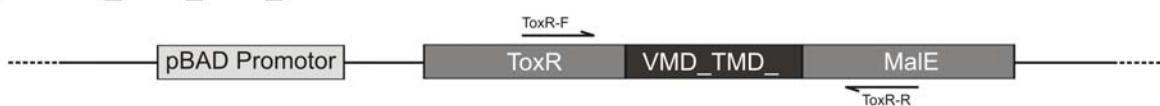
Restriktionsfragmente  
VMD\_TMD\_:



pToxRIV\_leer:



pToxRIV\_VMD\_TMD\_:



#### Abbildung 14

Klonierungsstrategie der pToxRIV\_VMD\_TMD\_ Plasmide für die Tox-R basierte *in vivo* Dimerisierungsanalyse:

An die jeweiligen DNA-Fragmente wurden eine 5'-Nhe-I und 3'-BamH-I Restriktionsschnittstelle mittels PCR angefügt. Zwischenklonierung der PCR-Fragmente erfolgte in den pGEM-T Klonierungsvektor. Zielklonierung wurde über die Nhe-I- und BamH-I-Schnittstellen in den Expressionsvektor pToxRIV realisiert. Finale pToxRIV\_VMD\_TMD Plasmide kodieren für Fusionsproteine aus ToxR\_TMD\_MBP unter Kontrolle des pBAD-Promotors. Position der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide ist entsprechend ihrer Position durch Pfeile angedeutet.

#### **4.1.2.2 Analyseablauf ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsanalyse**

Als erstes wurden die pToxRIV\_TMD\_VMD\_ Plasmide in kompetente *E. coli* Zellen des FHK12 Reporterstamm transformiert. Die Transformanten wurden anschließend über Nacht bei 37°C auf LB-Platten mit Kanamycin und Ampizillin selektioniert. Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C in 5ml Vorkulturen in LB-Medium mit 25ng/ml Kanamycin, 100µg/ml Ampizillin, 0,005% L-Arabinose und 0,4mM IPTG inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen in 1:50 Verdünnungen in LB-Medium mit 25ng/ml Kanamycin, 100µg/ml Ampizillin, 0,005% L-Arabinose und 0,4mM IPTG als Analysekulturen angesetzt und ca. 5h bei 37°C auf einem Schüttler bei 180rpm inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> ~0,6 erreicht wurde. L-Arabinose und IPTG im Wachstumsmedium induzierten die Expression der pToxRIV\_TMD\_VMD-kodierten Fusionsproteine. Nach ca. 5h wurden jeweils 100µl der Analysekulturen in 1ml Z-Puffer verdünnt und die Zelldichte bei OD<sub>600</sub> bestimmt. Durch Inkubation für 15min bei 30°C auf einem Schüttler wurden die Bakterien nach Zugabe von 100µl Lysepuffer (Z-Puffer mit 1,6% SDS) lysiert. Anschließend wurden die Reaktionsansätze mit 100µl Substratlösung (Z-Puffer mit 4mg/ml ONPG) versetzt und die Reportergenaktivität (beta-Galaktosidase) nach 20min Inkubation bei 30°C über das Reaktionsendprodukt o-Nitrophenol bei OD<sub>405</sub> quantifiziert. Die Messwerte wurden anschließend gegen die zuvor bestimmte Zellzahl (OD<sub>600</sub>) normalisiert.

Die *in vivo* Dimerisierungsanalyse wurde für alle Konstrukte als Triplikate mindestens drei Mal voneinander unabhängig durchgeführt. Die Messdaten wurden in Microsoft Excel bezüglich ihrer Mittelwert, Standardabweichungen und Signifikanzen ausgewertet.

Zur Überprüfung der korrekten Durchführung des *in vivo* Dimerisierungsassays dienten 3 Kontrollkonstrukte GpA wt, GpA G83I und delTM (bereitgestellt durch Dr. Erik Lindner, TU München), wobei GpA wt starke Dimerisierung, GpA G83I schwache Dimerisierung und delTM – ein Konstrukt ohne TMD – keine Dimerisierung aufweisen sollte (siehe Abb. 15), (Brosig et al. 1998; Langosch et al. 1996; Schneider et al. 2003).

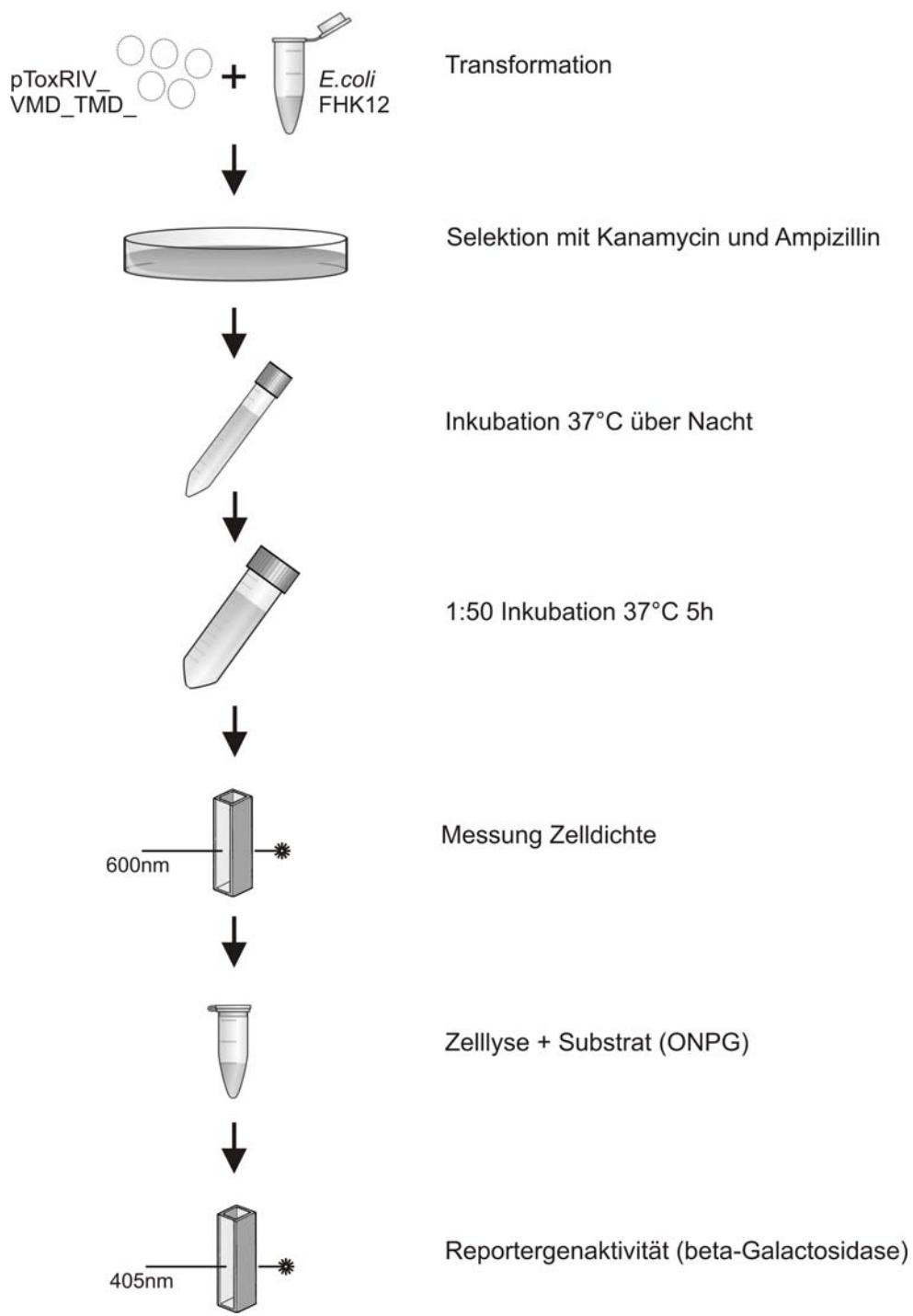


Abbildung 15

Analyseablaufes der *in vivo* Bestimmung der Dimerisierungseigenschaften wildtypischer und mutierter TMDen der human Bestrophin Proteinfamilie:  
 pToxRIV\_VMD\_TMD Plasmide wurden in den *E. coli* FHK12 Reportergenstamm transformiert. Einzelkolonien wurden als Übernachtkulturen und anschließend als 1:50 Analysenkulturen inkubiert und die Proteinexpression induziert. Die Zelldichte wurde photometrisch zur Normalisierung bestimmt, gefolgt von Zelllyse, Substratzugabe und abschließender photometrischer Bestimmung der Reportergenaktivität.

#### 4.1.2.3 Ergebnisse der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse von TMD1-6 der Bestrophine 1-4

Basierend auf den topologischen Vorhersagen wurden die sechs TMD der Bestrophine 1 bis 4 der ToxR-basierten Dimerisierungsanalyse unterzogen. Es zeigte sich hierbei innerhalb der Bestrophine 1-4 ein sehr ähnliches Dimerisierungsmuster. TMD3 und TMD4 der Bestrophine 1-4 wiesen keine Dimerisierungsaktivität auf, wo hingegen die TMD5 aller Bestrophine konsistentes Dimerisierungspotential besaßen. Zwischen Bestrophin-1 und den anderen Familienmitgliedern findet sich bei den TMD3, TMD4 und TMD5 völlige Übereinstimmung.. Während die Bestrophine 2-4 jedoch klare Dimerisierungsaktivitäten in TMD1 und TMD2 aufwiesen und keine in TMD6, zeigten sich in der Analyse bei Bestrophin-1 hohe Dimerisierungssignale für TMD2 sowie TMD6 aber nicht für TMD1 (siehe Abb. 16).

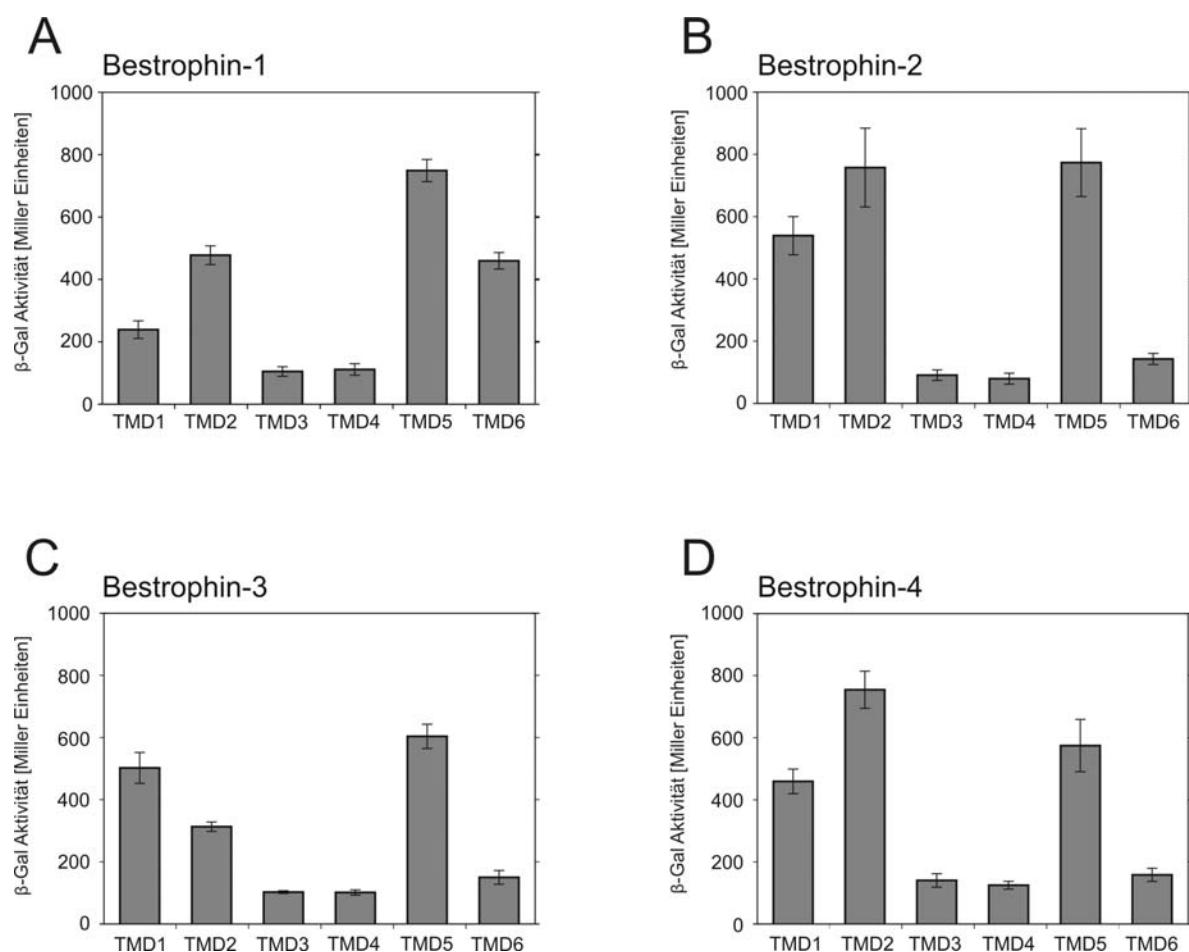


Abbildung 16  
Ergebnisübersicht der *in vivo* Dimerisierungsanalyse von TMD1-6 der Bestrophine 1-4:  
Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen  
(jeweils im Triplikat durchgeführt).

- A) TMD1-6 humanes Bestrophin-1
- B) TMD1-6 humanes Bestrophin-2
- C) TMD1-6 humanes Bestrophin-3
- D) TMD1-6 humanes Bestrophin-4

#### **4.1.2.4 Ergebnisse der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse - wildtypische und mutierte TMD1-6 von Bestrophin-1**

Um zu eruieren, ob krankheitsbezogene Mutationen einen Einfluss auf die Dimerisierungseigenschaften der Bestrophin-1 TMD nehmen, wurden solche Mutationen sowie drei weitere artifizielle Mutationen im Vergleich zu den wildtypischen TMD der ToxR-basierten Dimerisierungsanalyse unterzogen. Als Kontrolle wurden die Konstrukte GpA wt, GpA G83I und delTM herangezogen.

Bei der Glycophorin A Mutation TMD GpA G83I und dem delTM Deletionskonstrukt zeigten sich erwartungsgemäß signifikant erniedrigte Dimerisierungspotentiale im Vergleich zum wildtypischen GpA wt TMD (siehe Abb. 17 A). Die Werte der beta-Galaktosidase Quantifizierung, wiedergegeben in Miller Einheiten (Miller 1972), deckten sich mit den bisherigen mehrfach publizierten Daten im Intervall von ca. 150-1.000 Miller Einheiten (Brosig et al. 1998; Langosch et al. 1996; Schneider et al. 2003). Von den 28 analysierten Mutationen wiesen 6 signifikante Abweichungen bezüglich ihrer Dimerisierungseigenschaften auf. Bei den Mutationen R47H, I73N, T91I und A195V zeigten sich erhöhte Messwerte im Vergleich zu den entsprechenden wildtypischen TMD1, TMD2 und TMD4 Sequenzen. Signifikant reduzierte Werte wurden hingegen bei den Mutationen T237N und F281del nachgewiesen im Vergleich zu den wildtypischen TMD5 und TMD6 Konstrukten (siehe Abb. 17 B).

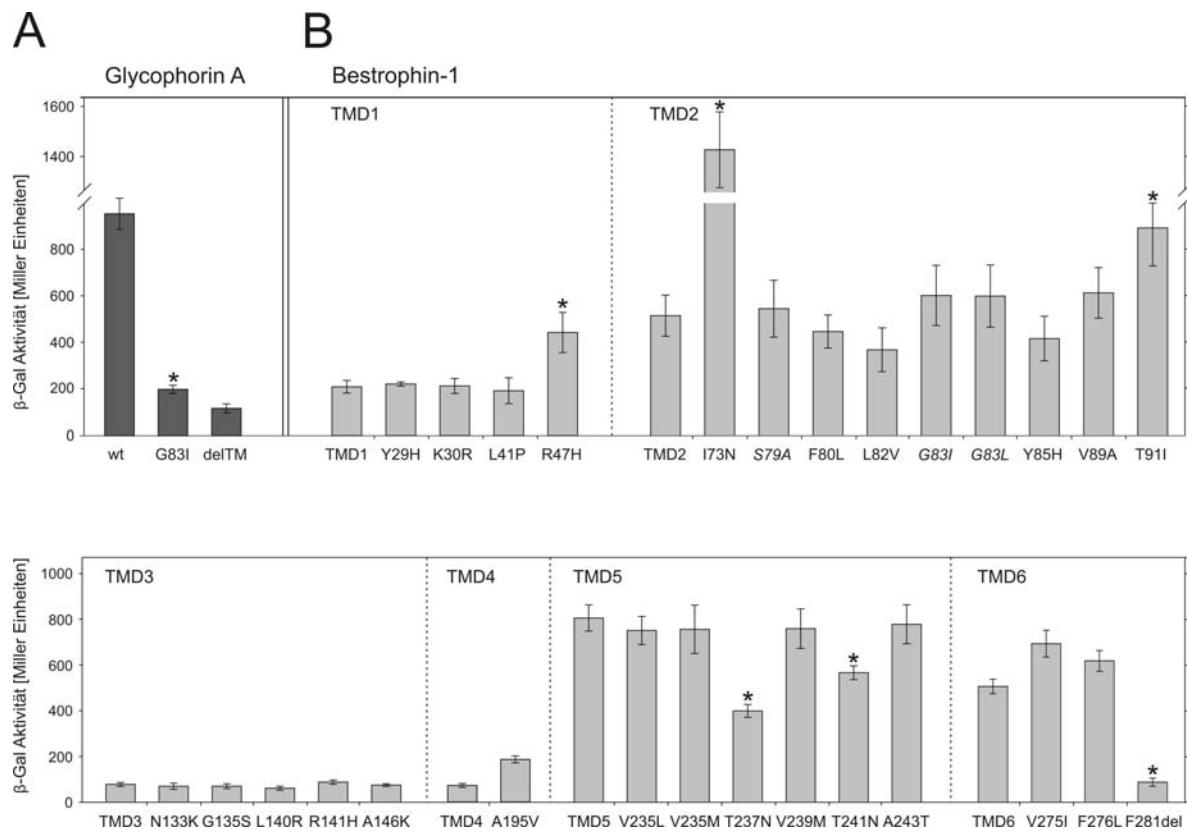


Abbildung 17

Ergebnisübersicht der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse Bestrophin-1 Mutationen: Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchsansätzen (jeweils im Triplikat durchgeführt). Sterne über den Fehlerbalken kennzeichnen statistische Signifikanz (t-Test:  $p < 0,05$ ) gegenüber der jeweiligen wildtypischen TMD.

A) Glycophorin A wildtypisch, mutiert und Deletionskonstrukt.

B) TMD1-6 humanes Bestrophin-1, wildtypische und mutierte Varianten.

#### 4.1.2.5 Ergebnisse der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse – putatives Dimerisierungsmotiv in TMD2 von Bestrophin-1

In der Aminosäuresequenz der TMD2 von Bestrophin-1 findet sich ein potentielles „Glycophorin A-ähnliches“ Dimerisierungsmotiv  $^{75}\text{L} \text{IxxSxxxGxxxT}^{87}$  (Brosig et al. 1998; Langosch et al. 1996; Schneider et al. 2003). Im Vergleich zur TMD2 von Bestrophin-1 besteht bei Glycophorin A im Dimerisierungsmotiv jedoch eine kleine Variation; an Aminosäureposition 79 befindet sich ein Glycin statt Serin (GpA:  $\text{L} \text{IxxGxxxGxxxT}$ ). Um zu prüfen, ob es sich in der TMD2 von Bestrophin-1 um ein funktionales Dimerisierungsmotiv handelt wurden drei Mutationskonstrukte generiert: S79C, G83I und G83L. Die somit herbeigeführte Unterbrechung des potentiellen Dimerisierungsmotives sollte zu signifikant reduzierten Messwerten im Vergleich zur wildtypischen TMD2 von Bestrophin-1 führen. Die Analysen der drei Mutationskonstrukte S79C, G83I und G83L wiesen jedoch im ToxR-

basierten Dimerisierungsassay keine signifikanten Änderungen zur wildtypischen Variante auf (siehe Abb. 17 B).

#### 4.1.2.6 MalE Komplementierungsassay

Im Weiteren wurden alle pToxRIV\_VMD\_TMD kodierten Fusionsproteine einem Membranintegrationstest unterzogen, um auszuschließen, dass unspezifische membranunabhängige Interaktionen als TMD-TMD Dimerisierungen interpretiert werden. Der Versuch basiert auf dem MalE-defizienten *E. coli* Stamm PD28, der bei Kultivierung im Minimalwachstumsmedium nur mit Maltose als einziger Energie-/Kohlenstoffquelle wachsen kann, wenn membranintegrierte ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteine die MalE-Defizienz kompensieren. Wenn die Fusionsproteine nicht oder in falscher Orientierung in die Membran integrieren, kann bei diesem *E. coli* Stamm kein Maltodextrin ins Periplasma transportieren werden wodurch das Zellwachstum unterbunden wird (siehe Abb. 18).

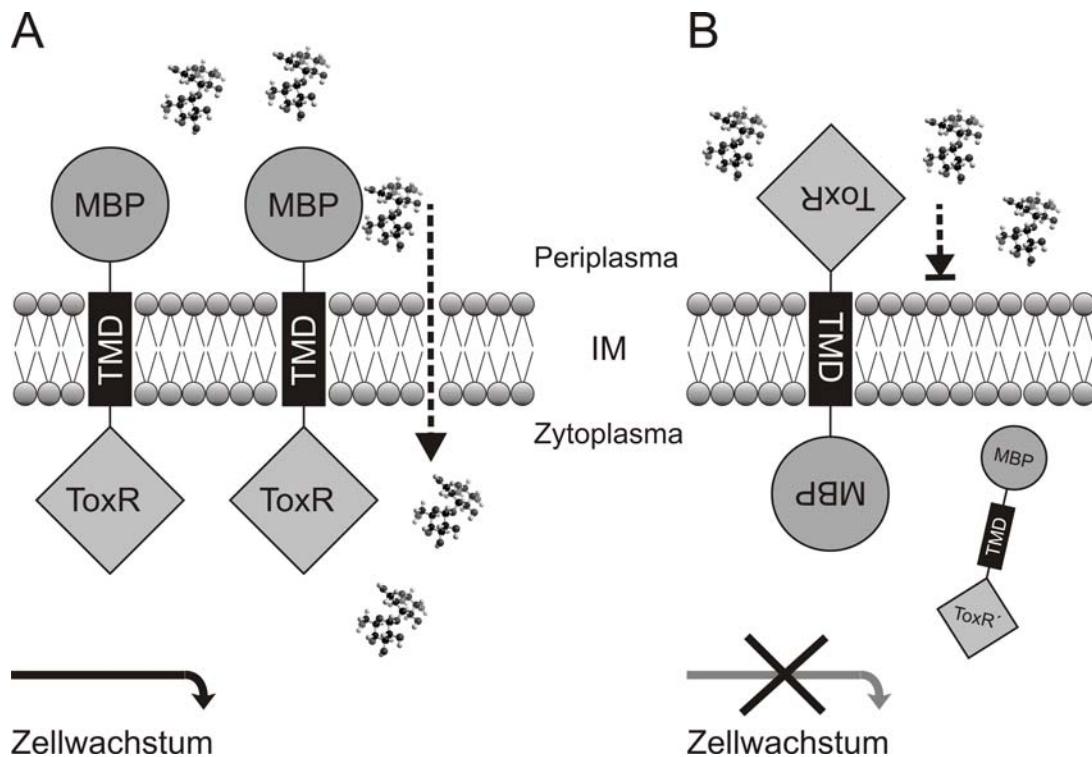


Abbildung 18  
Schematische Darstellung des MalE-Komplementierungsassays:  
Fusionsproteine bestehend aus ToxR\_TMD\_MBP werden im MalE-defizienten *E. coli* Stamm PD28 exprimiert.

A) Die Fusionsproteine integrieren über die TMDen in korrekter Orientierung in die innere *E. coli* Membran. Maltose wird über die chimären MBP gebunden und aktiv in das Zytoplasma transportiert, Zellwachstum erfolgt.

B) Die Fusionsproteine integrieren nicht über die TMDen oder in falscher Orientierung in die innere *E. coli* Membran. Hierdurch wird keine Maltose über die chimären MBP gebunden und folglich ist kein Zellwachstum möglich.

#### **4.1.2.7 Analyseablauf MalE-Komplementierungsassay**

In einem ersten Schritt wurden die unterschiedlichen pToxRIV\_TMD\_VMD Plasmide in kompetente *E. coli* PD28 transformiert. Die Transformanten wurden anschließend über Nacht bei 37°C auf LB-Platten mit Kanamycin und Tetrazyklin selektiert. Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C in 5ml Vorkulturen in LB-Medium mit 25ng/ml Kanamycin, 10µg/ml Tetrazyklin inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Bakterienkulturen durch Zentrifugation (4.000g) sedimentiert, das Medium abgenommen und die Bakterien mit sterilem PBS gewaschen. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, die Bakterien in PBS resuspendiert und zur weiteren Kultivierung als 1:200 Verdünnungen in Maltose-haltigem Minimalmedium (1x M9-Salze 0,4% Maltose, 80µg/ml Leucin, 80µg/ml Threonin, 2mM MgSO<sub>4</sub>, 25µg/ml Kanamycin and 10µg/ml Tetrazyklin) angesetzt. Das Zellwachstum wurde über photometrische Messungen der Zelldichte bei OD<sub>650</sub> bestimmt (siehe Abb. 19).

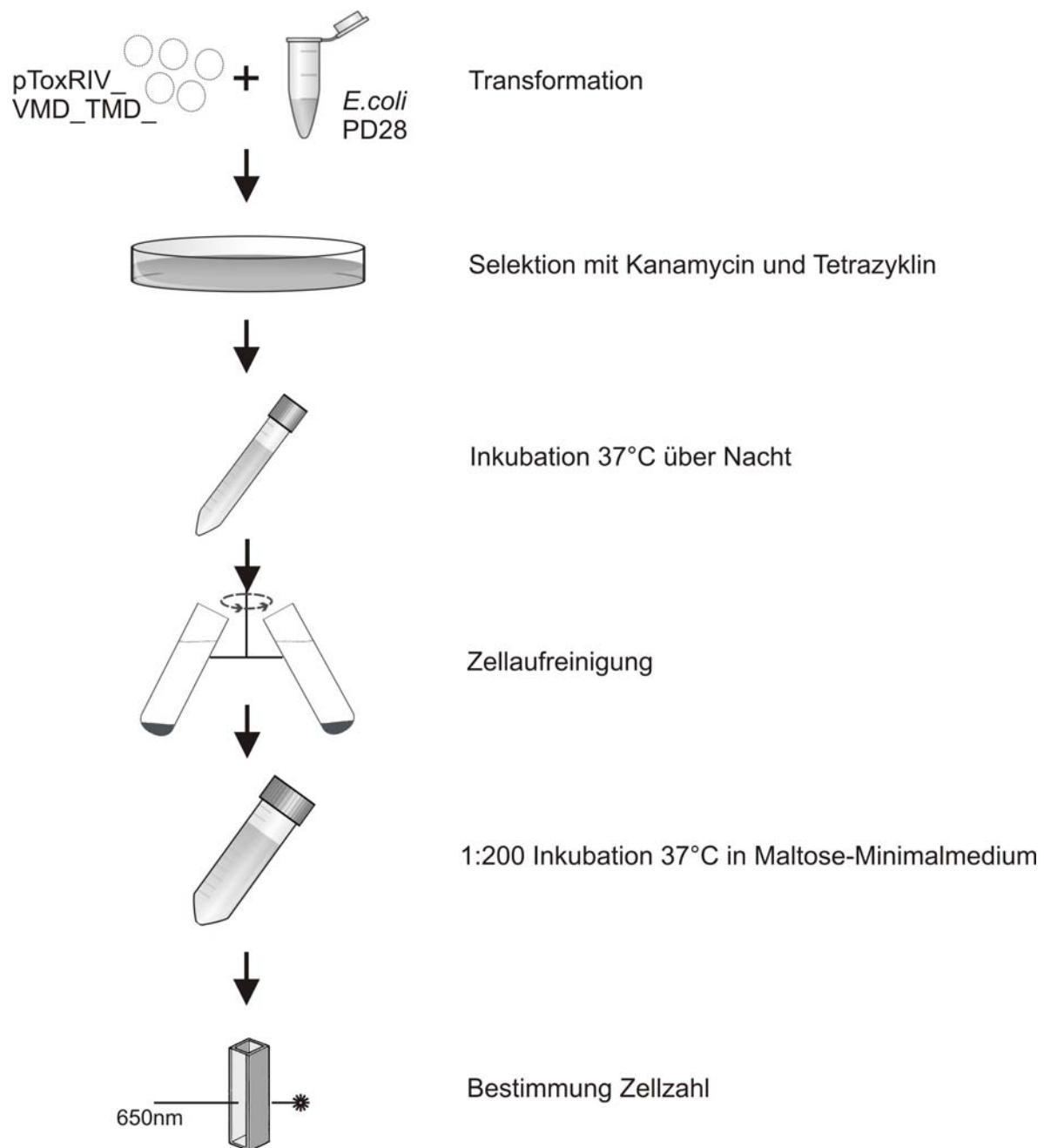


Abbildung 19

Analyseablauf MalE-Komplementierungsassay:

Bestimmung der Membranintegrationsfähigkeiten der TMDen der human Bestrophin Proteininfamilie. pToxRIV\_VMD\_TMD Plasmide wurden in den *E. coli* PD28 Analysestamm transformiert, kultiviert und anschließend durch Zentrifugation und Waschschritte aufgereinigt. Verdünnungen wurden in Maltose-Minimalmedium für 72h kultiviert und das Bakterienwachstum photometrisch bestimmt.

#### **4.1.2.8 Ergebnisse MalE Komplementierungsassay von TMD1-6 der Bestrophine 1-4**

Nachdem der ToxR Dimerisierungsassay nicht unterscheiden kann zwischen Mutationen, die die Dimerisierung direkt beeinflussen und Mutationen, die zu einer gestörten Membranintegration der chimären Fusionsproteine führen, war es notwendig den Versuchsansatz mit dem MalE-Komplementierungsassay zu überprüfen. Insbesondere galt es auszuschließen, dass eine reduzierte Membranintegration der Fusionsproteine, die auch zu erniedrigten Miller Einheiten im ToxR Versuchansatz geführt hätte, fälschlicherweise als verminderte Dimerisierungsfähigkeit der TMD interpretiert wird. Der Versuch wurde sowohl für die TMD1-6 der gesamten humanen Bestrophinfamilie, als auch für die 28 Bestrophin-1 Mutationskonstrukte durchgeführt. Im MalE-Komplementierungsassay wurden auch die drei Konstrukte GpA wt, GpA G83I und delTM als Kontrollen verwendet. Hierbei fungierten GpA wt und GpA G83I als Positivkontrollen für suffiziente Membranintegration, während delTM als Negativkontrolle mit ineffizienter Membranintegration der Fusionsproteine diente.

Die Auswertung des Zellwachstums der *E. coli* PD28 Kulturen ergab ein übereinstimmendes Muster innerhalb der humanen Bestrophinfamilie bezüglich der TMD-Membranintegrationen. Übereinstimmend zeigte TMD1 und TMD2 sowie TMD5 und TMD6 korrekte Membranintegration, während die TMD3 und TMD4 von keinem der Bestrophine-1-4 eine Integration in die *E. coli* Membran aufwiesen. Hierbei ist zu erwähnen, dass bei der TMD1 von Bestrophin 1 im Vergleich zu den anderen integrierenden TMDen etwas verminderte Wachstumswerte detektiert wurden, die aber deutlich höher als bei nicht integrierenden TMD lagen (siehe Abb. 20).

Die Überprüfung der 28 Bestrophin 1 Mutationskonstrukte zeigte, dass die Mutationen Y29H, K30R, L41P and F281del zu einer fehlenden bzw. stark verminderten Membranintegration führten, die Mutation R47H hingegen zu einer gesteigerten Membranintegration (siehe Abb. 21).

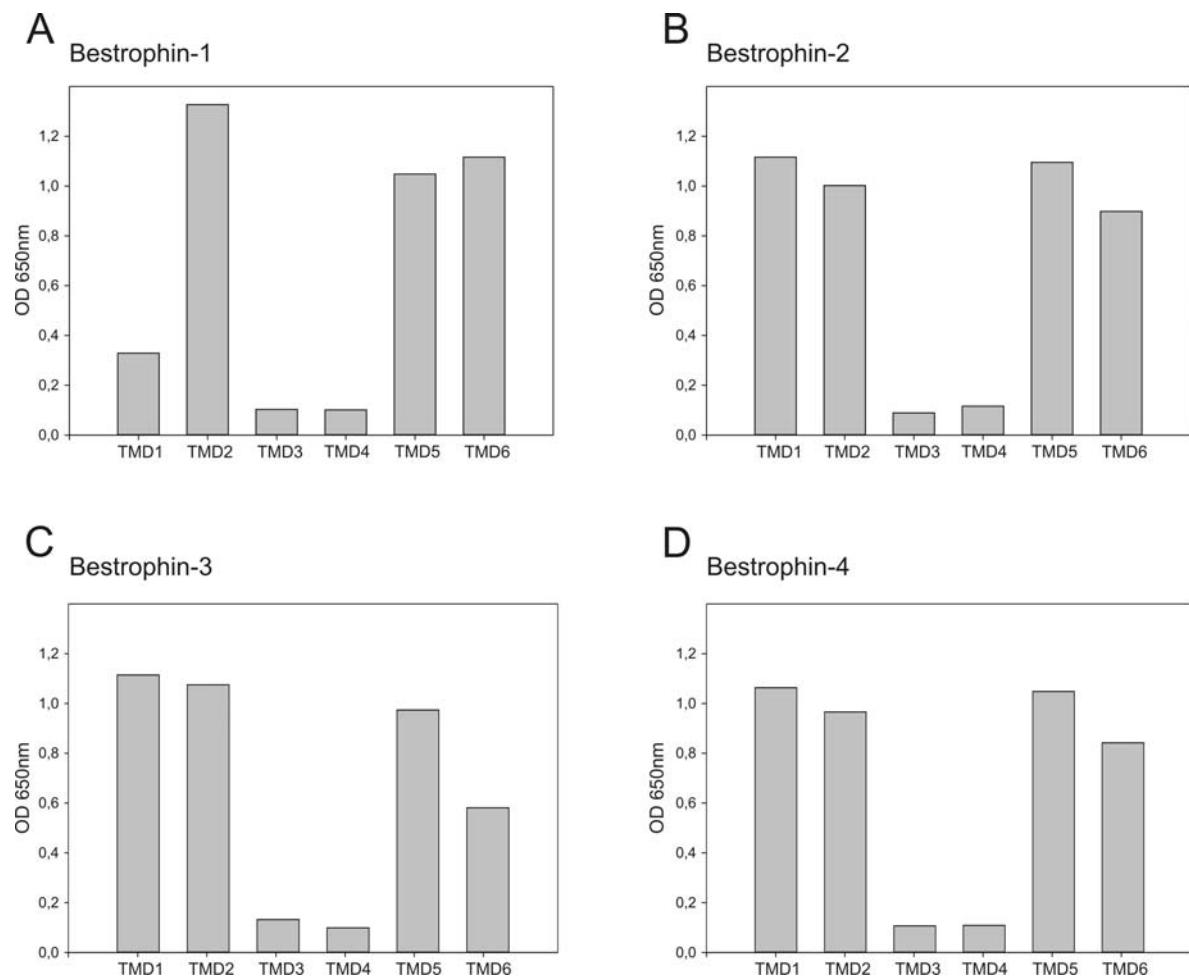


Abbildung 20

Ergebnisübersicht MalE-Komplementierungsassays:

Zelldichte (OD<sub>650</sub>) nach 72h im Minimalwachstumsmedium der mit pToxRIV\_VMD\_TMD\_ (TMD1-6 der Bestrophine 1-4) transformierten *E. coli* PD28 Kulturen.

- A) TMD1-6 Bestrophin-1
- B) TMD1-6 Bestrophin-2
- C) TMD1-6 Bestrophin-3
- D) TMD1-6 Bestrophin-4

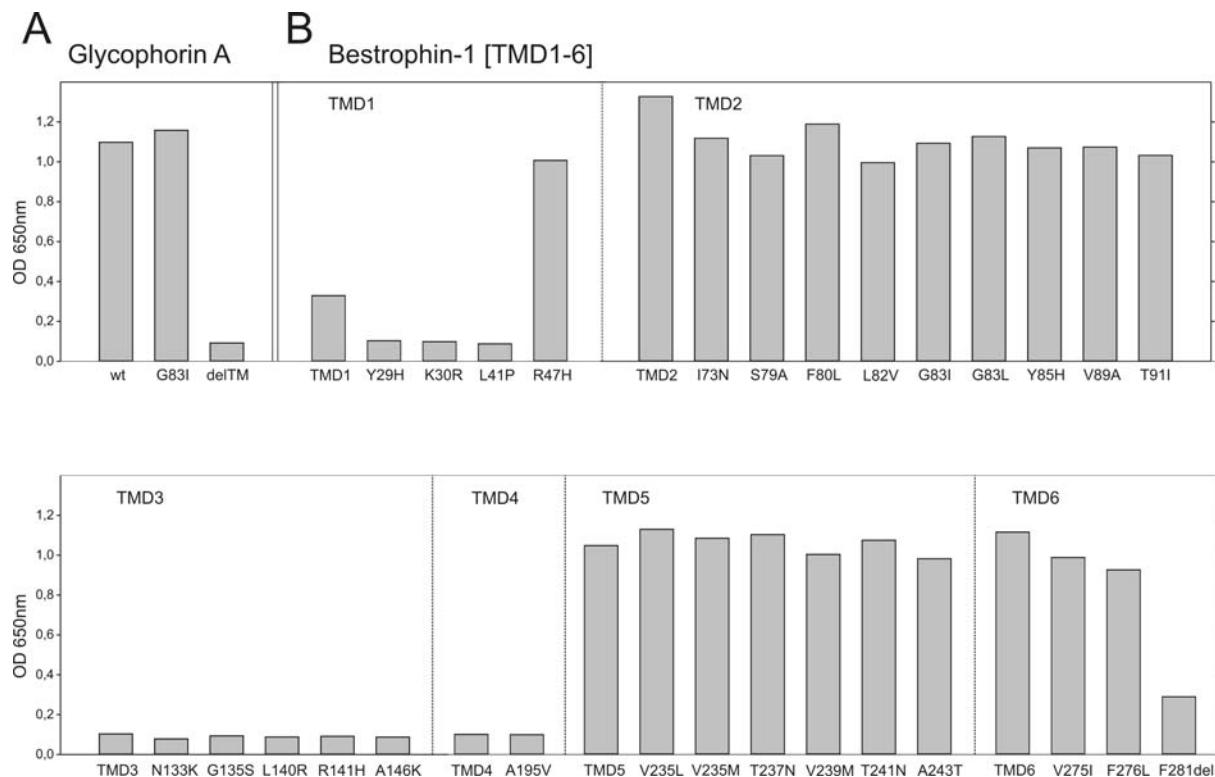


Abbildung 21

Ergebnisübersicht MalE-Komplementierungsassays:

Zelldichte nach 72h im Minimalwachstumsmedium der mit pToxRIV\_VMD\_TMD (wildtypische und mutierte TMD1-6 von Bestrophin-1) und Kontrollkonstrukten transformierten *E. coli* PD28 Kulturen.

A) Kontrollkonstrukte: GpA wt, GpA G83I und delTM

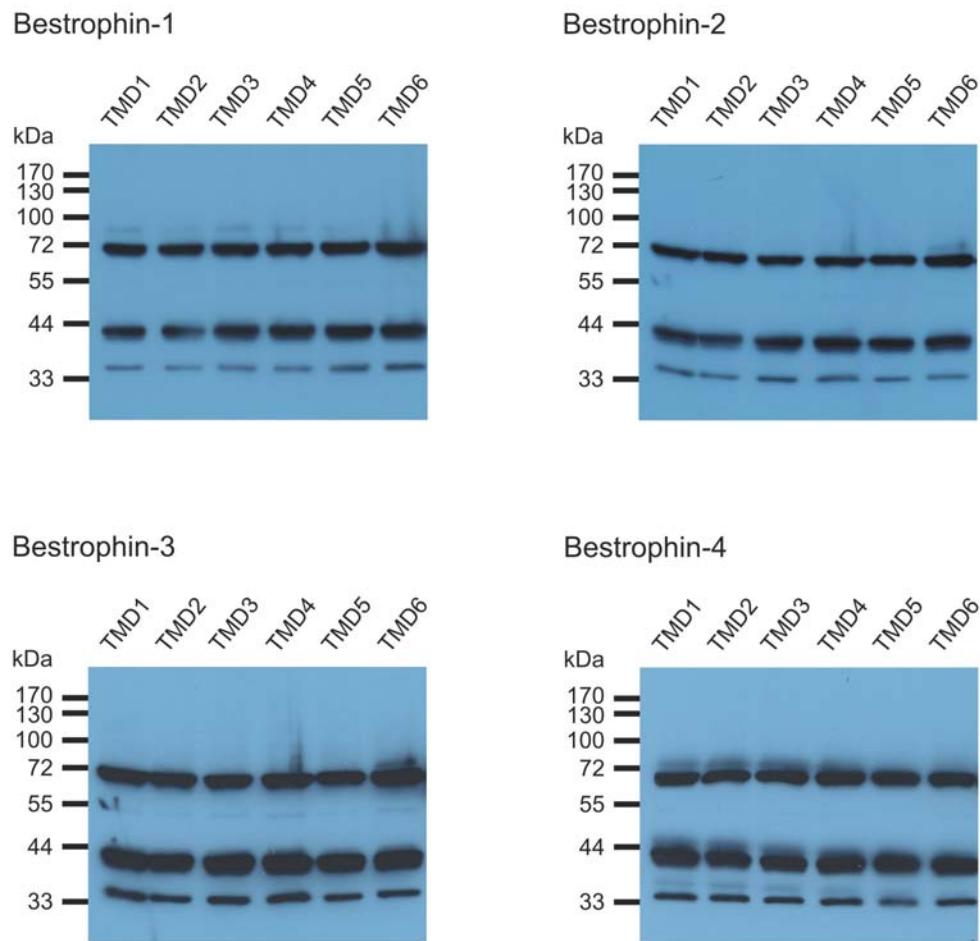
B) TMD1-6 wildtypisch und mutiert (28 Mutationen) von Bestrophin-1

#### 4.1.2.9 Kontrolle der Fusionsproteinexpression

Zur Kontrolle der Expressionsstärke der einzelnen Fusionsproteine wurden aus den ToxR-basierten Dimerisierungssassay Analysekulturen 100µl Zellsuspension mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt. Aliquots der denaturierten Proteine wurde anschließend in 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und die Fusionsproteine mit anti-MBP Antikörper detektiert sowie durch Sekundärantikörper vermittelte Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen visualisiert. Es wurden Aliquots der Bakterienlysate aus mit pToxRIV\_VMD\_TMD (TMD1-6 von Bestrophin-1-4) transformierten *E. coli* FHK12 Kulturen analysiert.

Die visuelle Auswertung der Western Blot Analysen mit anti-MBP Antikörpern zeigte innerhalb der einzelnen Bestrophin Familienmitgliedern ein sehr gleichmäßiges Expressionsniveau der ToxR+TMD+MBP Fusionsproteine der TMD1-6 zueinander. Neben

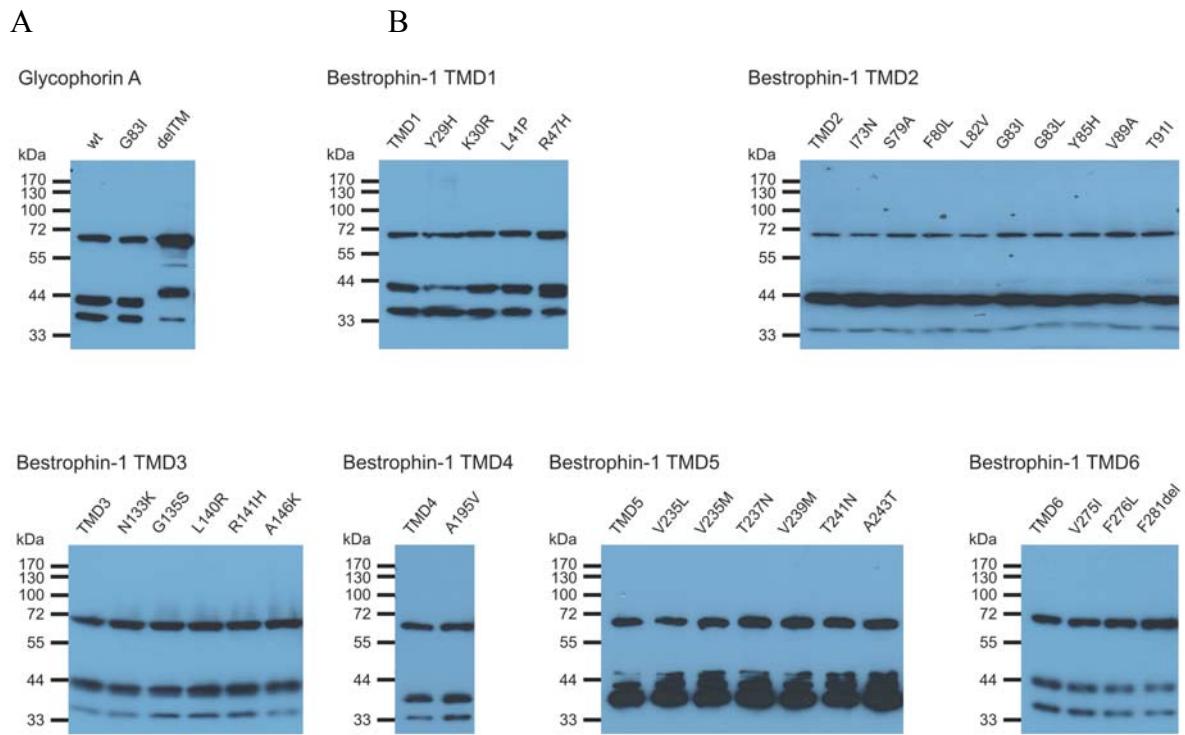
den ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteinen mit ca. 69 kDa detektiert der verwendete anti-MBP Antikörper auch endogenes bakterielles MBP bei ca. 42 kDa, sowie kleinere Degenerationsfragmente bei ca. 36 kDa (siehe Abb. 22).



**Abbildung 22**  
Ergebnisse Western Blot Analyse:  
Visualisierung des Expressionsniveaus der ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteine (ca. 69 kDa) von TMD1-6 der Bestrophine 1-4 sowie des endogenen MBP (ca. 42 kDa) mit anti-MBP Antikörper.

Neben den wildtypischen TMD der Bestrophine 1-4 wurde auch die Expression der TMD1-6 Mutationskonstrukte von Bestrophin-1, sowie der verwendeten Kontrollkonstrukte kontrolliert. Bei den Kontrollkonstrukten zeigte sich für delTM im Vergleich zu den beiden Glycophorin A-Konstrukten (GpA wt und GpA G83I) ein erhöhtes Expressionsniveau an Fusionsprotein; hingegen ist das Expressionsniveau der GpA wt und GpA G83I Konstrukte vergleichbar (siehe Abb. 23 A). Die wildtypischen und mutanten TMD1-6 Fusionsproteine

von Bestrophin-1 wurden innerhalb der zu vergleichenden Gruppen (jeweilige wildtypische TMD zu Mutationen) gleich stark exprimiert (siehe Abb. 23 B). Wie auch bei der Analyse der Bestrophin Familienmitglieder entsprechen die 69 kDa Banden den ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteinen und die tiefer laufenden Banden den endogenen bakteriellen MBP (37 kDa) und möglichen Abbauprodukten (siehe Abb. 23).



**Abbildung 23**  
Ergebnisübersicht Western Blot Analyse:  
Expressionsniveaus der ToxR\_TMD\_MBP Fusionsproteine (69 kDa) von wildtypischen und mutiertem TMD1-6 von Bestrophin-1, sowie der Glycophorin A Kontrollkonstrukte und des endogenen MBP (37 kDa) mit anti-MBP Antikörper.

#### 4.1.3 *In vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse

Der *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay analysiert rekombinant exprimierte Fusionsproteine auf ihre TMD–TMD vermittelte Dimerisierung innerhalb von Detergenzien-Mizellen. In wässriger Lösung bilden Detergenzien durch ihre chemischen Eigenschaften Mizellen mit ähnlichen Eigenschaften wie Phospholipidmembranen. Hierbei lagern sich bevorzugt unpolare Proteinabschnitte an die hydrophoben Detergenzienseitenketten und TMD-TMD Interaktionen so werden stabilisiert. Für diverse TMD-Proteine, z.B. GpA, PsbG, ErbB konnte Dimerisierung in Detergenzien-Mizellen gezeigt werden (Dreher et al. 2007;

Lemmon et al. 1992; Mendrola et al. 2002; Prodohl et al. 2007; Prodohl et al. 2007). Zielsetzung dieses *in vitro* Versuchsansatzes war es zu klären, ob auch Bestrophin-1 mittels hydrophober Wechselwirkungen der TMD in einer Detergenzienumgebung dimerisieren kann.

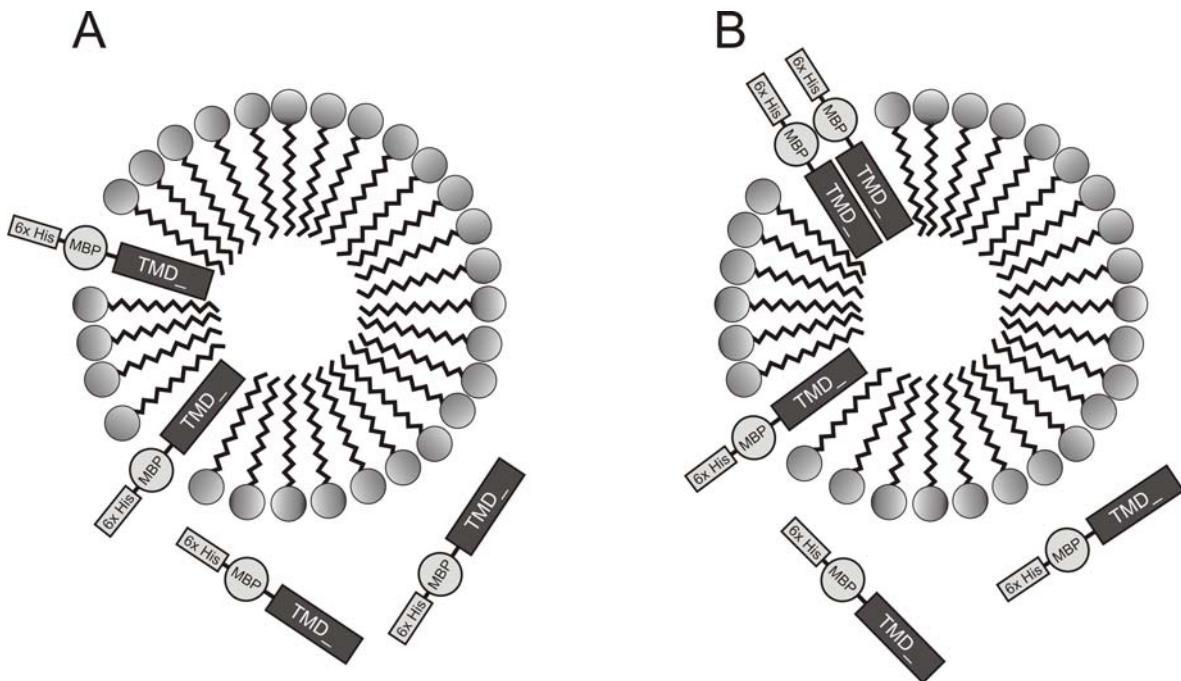


Abbildung 24

Schematische Darstellung des *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassays:  
Rekombinant exprimierte Fusionsproteine (6xHis-MBP-TMD) in wässriger Lösung mit Detergenzien-Mizellen

A) Keine Dimerisierung der Fusionsproteine

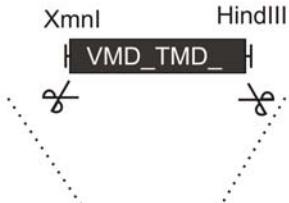
B) Dimerisierung über hydrophobe Wechselwirkungen zwischen TMDen

#### **4.1.3.1 Klonierung der wildtypischen und mutierten TMD1-6 des Bestrophin-1**

Die einzelnen TMD kodierenden Sequenzen wurden mittels PCR amplifiziert. Hierbei wurden über die Oligonukleotide an die 63bp langen DNA-Fragmente zusätzlich eine 5'-Xmn-I- und eine 3'-Hind-III-Restriktionsschnittstelle angefügt. Nach dem Restriktionsdoppelverdau mit Xmn-I und Hind-III und der Ligation in den pMalc2x\_leer Vektor wurden die Reaktionsansätze in kompetente *E. coli* transformiert und die pMalc2x\_ Klone mit dem Antibiotikum Ampizillin auf LB-Platten selektioniert. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli* Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Integration der entsprechenden Insertionen überprüft. Im nächsten Schritt wurden die MalE\_VMD\_TMD

DNA-Fragmente durch einen Restriktionsdoppelverdau mit Nde-I und Hind-III ausgeschnitten und anschließend in den Zielvektor pRSET\_leer ligiert, in kompetente *E. coli* transformiert und die pRSET\_MalE\_VMD\_TMD\_Klone mit dem Antibiotikum Ampizillin auf LB-Platten selektioniert. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli* Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Integration der entsprechenden Insertionen überprüft. Im Allgemeinen wurden die positiven Klone mittels Kolonie-PCR durch die zugehörigen Oligonukleotidpaare pMalc2x-F und pMalc2x-R (in pMalc2x\_VMD\_TMD) sowie pRSET-F und pRSET-R (in pRSET\_MalE\_VMD\_TMD) identifiziert und durch Sequenzierung abschließend bestätigt. Die resultierenden pRSET\_VMD\_TMD Plasmide kodieren unter der Kontrolle des T7-Promotors für die Fusionsproteine. Diese bestehen aus drei Teilen, dem penta-His-Tag, dem MBP sowie der entsprechenden TMD aus Bestrophin-1, insgesamt mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Neben den wildtypischen TMD1-6 wurden auch die Mutationskonstrukte von TMD1 und TMD5 entsprechend obigem Schema kloniert (siehe Abb. 25).

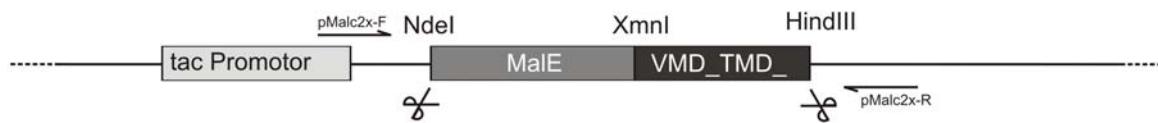
PCR Fragmente VMD\_TMD\_:



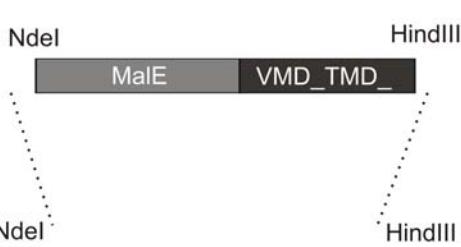
pMalc2x leer:



pMalc2x\_VMD\_TMD\_:



Restriktionsfragmente  
VMD\_TMD\_:



pRSET leer:



pRSET\_MalE\_VMD\_TMD\_:



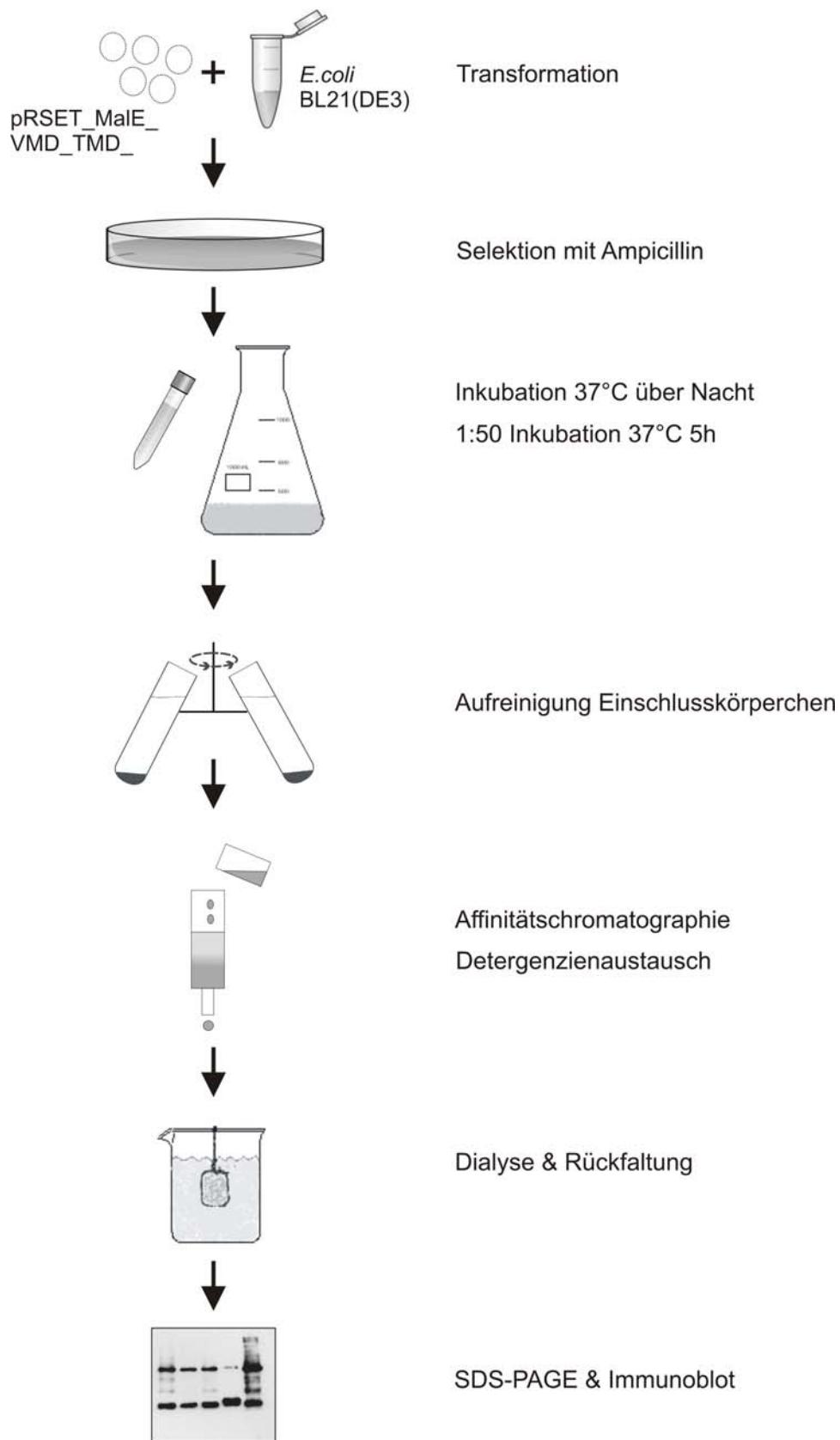
Abbildung 25

Klonierungsstrategie der pRSET\_MalE\_VMD\_TMD\_ Plasmide für die *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse:

An die den einzelnen TMDen entsprechenden DNA-Fragmente wurden eine 5'-Xmn-I- und 3'-Hind-III-Restriktionsschnittstelle mittels PCR angefügt. Zwischenklonierung der PCR-Fragmente erfolgte in den pMalc2x Vektor. Zielklonierung wurde über die Nde-I- und Hind-III-Schnittstellen in den Expressionsvektor pRSET realisiert. Finale pRSET\_MalE\_VMD\_TMD\_ Plasmide kodieren für Fusionsproteine aus 6x His, MBP und TMD unter Kontrolle des T7-Promotors. Position der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide ist entsprechend ihrer Position durch Pfeile angedeutet.

#### **4.1.3.2 Analyseablauf Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay**

Zunächst wurden die unterschiedlichen pRSET\_TMD\_VMD\_Plasmide in kompetente *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Die Transformanten wurden anschließend über Nacht bei 37°C auf LB-Platten mit Ampizillin selektioniert. Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37°C in 5ml Vorkulturen in LB-Medium mit 100µg/ml Ampizillin inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Vorkulturen 1:50 in 50ml Expressionskulturen verdünnt und bei 37°C ca. 5h nach Zugabe von 1mM IPTG bis zu einer Zelldichte von OD<sub>600</sub> ~0,6 kultiviert. Durch Zentrifugation (15min 4.000g) wurden die Zellen sedimentiert und durch zweimaliges Waschen mit 1x PBS aufgereinigt sowie in 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8,0 resuspendiert. Die Bakterienzellen wurde mit 1,5 mg/ml Lysozym lysiert, gefolgt von Zellfragmentierung und DNA-Abbau mit Ultraschall und DNaseI Behandlung. Die die Fusionsproteine enthaltenden Einschlußkörperchen wurden anschließend durch Zentrifugation (15min 10.000g) sedimentiert und nach Resuspendierung in 10 mM Tris, pH 8,0, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 mM SDS für 10min bei 90°C denaturiert. Unlösliche Fragmente wurden in einem Zentrifugationsschritt (20min 10.000g) abgetrennt, der Überstand filtriert, auf Eis gelagert und schrittweise im Überschuss mit KCl versetzt, um die SDS Konzentration zu reduzieren und abzutrennen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10min 10.000g) und Filtration, wurde der Überstand auf Ni-NTA Agarosesäule geladen und im Folgenden vier Mal mit 10 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM SDS gewaschen. Die Affinitäts-aufgereinigten an die Säulen gebunden Fusionsproteine wurden durch pH-Verschiebung mit 10 mM Tris, 100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM SDS, pH 4,5 eluiert. Nach einem Detergenziaustausch von SDS zu 5 mM n-dodecyl β-D-maltoside wurde das SDS durch Zugabe von KCl im Überschuss ausgefällt und abzentrifugiert (10min 10.000g), wonach der Überstand abschließend durch eine 0,45-µm PVDF Membran feinfiltriert wurde. Über Nacht wurde eine Dialyse mit regenerierter Zellulosemembran (MWCO 10 kDa) in 50 mM Tris, 50mM NaCl, pH 8,0 durchgeführt. Mittels Zentrifugation (10-30min 1.000g) mit „Amicon ultrafiltration devices“ (MWCO 10 kDa) wurden die Proteinlösungen auf ca. 1 mg/ml aufkonzentriert. Aliquots mit ca. 5,0 µg Protein wurden im 10%igen SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf PVDF-Membran transferiert und die Fusionsproteine mit anti-penta-His Antikörper detektiert sowie durch Sekundärantikörper vermittelte Chemolumineszenz auf Röntgenfilmen visualisiert (siehe Abb. 26).



## Abbildung 26

### Analyseablauf Detergenzien-Mizellen Assay:

*In vitro* Bestimmung der Dimerisierungseigenschaften wildtypischer und mutierter Transmembrandomänen von humanen Bestrophin-1. pRSET\_MalE\_VMD\_TMD Plasmide wurden in den *E. coli* BL21(DE3) Expressionsstamm transformiert. Einzelkolonien wurden als Übernachtkulturen und anschließend als 1:50 Analysenkulturen inkubiert, sowie die Proteinexpression mit IPTG induziert. Nach Zelllyse wurden die Einschlussskörperchen aufgereinigt, die enthaltenen Fusionsproteine in Lösung gebracht und anschließend mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Nach einem Detergenzientausch erfolgte die Proteinrückfaltung durch Regeneration in Dialysepuffer, gefolgt von SDS-PAGE und Immunoblot mit Sekundärantikörper vermittelten Chemolumineszenz, abgebildet auf Röntgenfilm.

### 4.1.3.3 Ergebnisse *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay

#### Kontrollkonstrukte sowie wildtypische & mutierte TMD1-6 des Bestrophin-1

Zusätzlich zur *in vivo* ToxR-basierten Dimerisierungsanalyse wurde mit dem *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay eine unabhängige Methode verwendet, um die TMD von Bestrophin-1 bezüglich ihrer Dimerisierungseigenschaften näher zu charakterisieren. Im Gegensatz zur *in vivo* Analyse mit den Glycophorin A basierten Kontrollen wurden beim *in vitro* Assay Kontrollkonstrukte, basierend auf Cytochrom b559 PsbF verwendet (Dreher et al. 2007). Wie zuvor beschrieben wurden die Fusionsproteine der Kontrollkonstrukte und der TMD von Bestrophin-1 rekombinant exprimiert, aufgereinigt, in wässriger Detergenzien-Lösung regeneriert und mittels SDS-PAGE und Immunoblot visualisiert. Monomerische Fusionsproteine liefen auf der Höhe von ca. 50 kDa, während Dimere der Fusionsproteine auf doppelter Höhe bei ca. 100 kDa im SDS-Gel aufgetrennt wurden. Wildtypisches PsbF fungierte als Positivkontrolle für starke Dimerformation, während die PsbF Mutation P28G mittelstarke Dimerisierung aufwies und die PsbF Mutante G34I als Negativkontrolle mit stark verminderter Dimerisierung diente. (siehe Abb. 27 A)

Bei der Analyse der TMD1-6 von Bestrophin-1 zeigten die Fusionsproteine mit TMD1 und TMD5 eine deutliche Dimerbildung, sichtbar durch die zusätzliche Proteinbanden bei ca. 100 kDa neben der 50 kDa Monomer Proteinbande. Die restlichen TMD2, TMD3, TMD4 und TMD6 wurden nur als monomerische Proteinbanden bei ca. 50 kDa nachgewiesen (siehe Abb. 27 B).

Als weitere Analyse wurde der Einfluss von patientenbezogenen Mutationen in der *in vitro* dimerisierenden TMD1 und TMD5 untersucht. Hierzu wurden die entsprechenden mutationstragenden Fusionsproteine in parallelen Versuchsansätzen zu den wildtypischen Varianten exprimiert und analysiert. Es zeigte sich für die Fusionsproteine mit den Aminosäureaustauschen Y29H und K30R keine wesentliche Abweichung im Monomer :

Dimer Verhältnis im Vergleich zu der wildtypischen Variante der TMD1. Hingegen führte die Substitution L41P zu einer verminderten Bildung an Dimeren, während die R47H Mutation zu verstärker Dimerbildung der Fusionsproteine beitrug (siehe Abb. 27 C). Die wildtypische TMD5 wurde mit den fünf Mutationskonstrukten V235L, V235M, T237N, T241N und A243T verglichen. Hierbei konnte bei keiner der analysierten Variationen eine deutliche Abweichung der Dimerisierung zur wildtypischen TMD5 nachgewiesen werden (siehe Abb. 27 D).

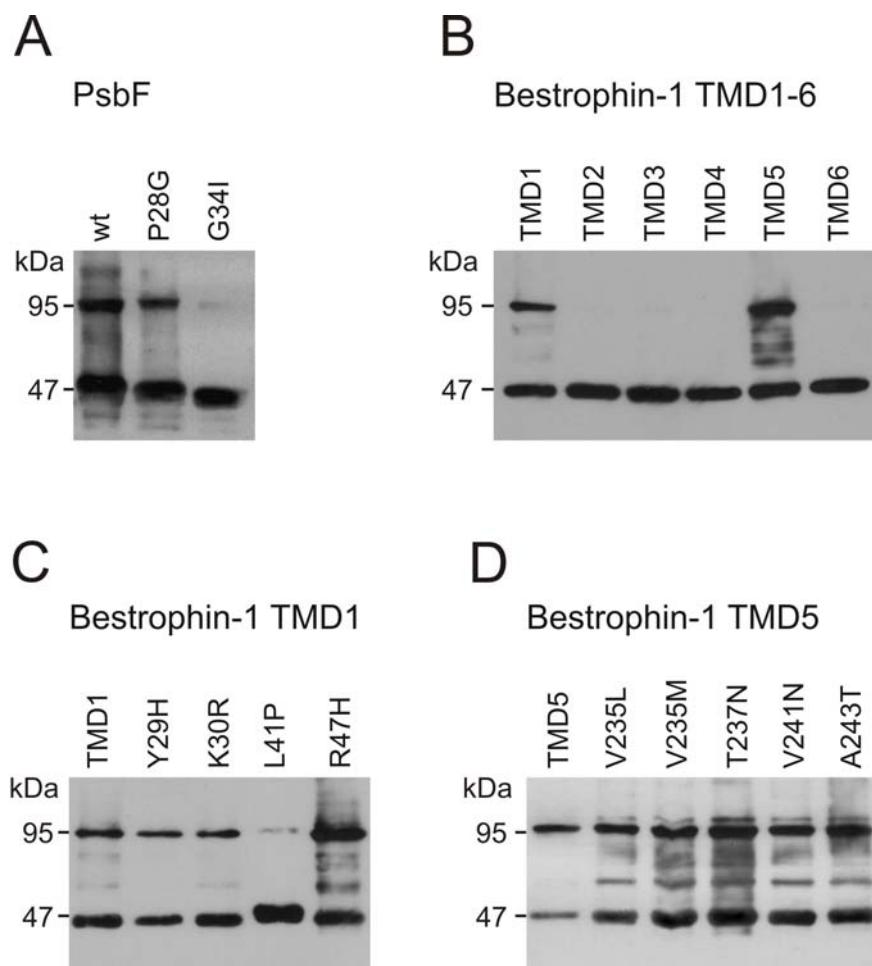


Abbildung 27

Ergebnisübersicht Immunoblots der *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse: Rekombinant exprimierte Fusionsproteine (*His<sub>6</sub>-MBP-TMD*) wurden aufgereinigt und in wässriger Detergenzienlösung bezüglich ihrer Dimerisierungseigenschaften analysiert. Immunoblots wurden sondiert mit anti-penta-His Antikörpern

A) Wildtypische und mutante Variationen von PsbF Cytochrom b<sub>559</sub>

B) TMD1-6 von humanen Bestrophin-1

C + D) TMD1 + TMD5 inkl. patientenbezogener Mutationen

## **4.2 Charakterisierung des humanen VMD2 Promoters**

Neben den biochemischen Untersuchen zu den TMD Dimerisierungseigenschaften der vier Mitglieder der humanen Bestrophinfamilie wurde im Rahmen dieser Arbeit auch eine VMD2 Promotoranalyse durchgeführt. Hierbei wurde basierend auf den bereits veröffentlichten Daten (Esumi et al. 2007; Esumi et al. 2004), der Einfluss des Promotors auf die Krankheitsbilder der Bestrophin-1 korrelierten Retinopathien in einer erweiterten Analyse untersucht. Im diesen Kontext sollte auch geklärt werden, ob DNA-Sequenzalterationen im Promotorbereich eine Erklärung für die z.t. variablen Phänotypen der Krankheitsbilder liefern könnten. Bisher konnte die zelluläre Funktion von Bestrophin-1 nicht eindeutig geklärt werden, weshalb über mögliche Pathomechanismen nur spekuliert werden kann. Um ein grundlegendes besseres Verständnis zu VMD2 / Bestrophin-1 zu erlangen, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Regulation der humanen Bestrophin-1 Expression mit bioinformatischen Auswertungen (Komparative Genomik, Promotorvorhersage und Transkriptionsfaktorbindestellenvorhersage) und *in vitro* Experimenten (Luziferase-Reportergen-Assay und EMSA) untersucht.

### **4.2.1 Identifikation von evolutionär konservierten Sequenzabschnitten des VMD2 Promotors**

Um im Bereich von -5.000bp bis +2.000bp um den Transkriptionsstartpunkt von VMD2 potentiell regulatorische Elemente zu identifizieren, wurde dieser 7kb Sequenzabschnitt mit dem ECR Browser (<http://ecrbrowser.dcode.org>) mittels komparativer Genomik analysiert (Ovcharenko et al. 2004). Hierzu wurde die humane Sequenz (hg18 chr11:61469500-61476500) mit den Sequenzen der Homologen von Rhesusaffe (*Macaca mulatta*), Hund (*Canis familiaris*), Maus (*Mus musculus*) und Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*) verglichen. Es kamen die Standardeinstellungen des ECR (Evolutionary Conserved Regions) Browsers zur Anwendung (ECR Längenminimum: 100bp; ECR Identitätsminimum: 70%). Zur vereinfachten Berechnung und Darstellung wurden im Folgenden die Sequenzen relativ zum Transkriptionsstartpunkt (= +1) abgebildet, was der Position (hg18) chr11:61474402 entspricht. Für die analysierte Säugetiergruppe wurden 5 hoch konservierte Sequenzabschnitte im 5'-Bereich von VMD2 identifiziert (siehe Abb. 28 A). Diese Sequenzbereiche, im Weiteren bezeichnet als RE1 - RE5, wurden anschließend bezüglich ihrer potentiell regulatorischen Funktion hin untersucht.

Zusätzlich wurde der 7kb Sequenzabschnitt mit dem Promotorvorhersageprogramm ElDorado / PromoterInspector (Genomatix Inc.) analysiert (Scherf et al. 2000). Hierbei wurden 3 potentielle Promotorbereiche vorhergesagt, im Weiteren bezeichnet als P1 - P3, deren Positionen sich sehr stark mit den evolutionär konservierten Sequenzabschnitten RE1 ~ P1, RE4 ~ P2 und RE5 ~ P3 decken (siehe Abb. 28 B).

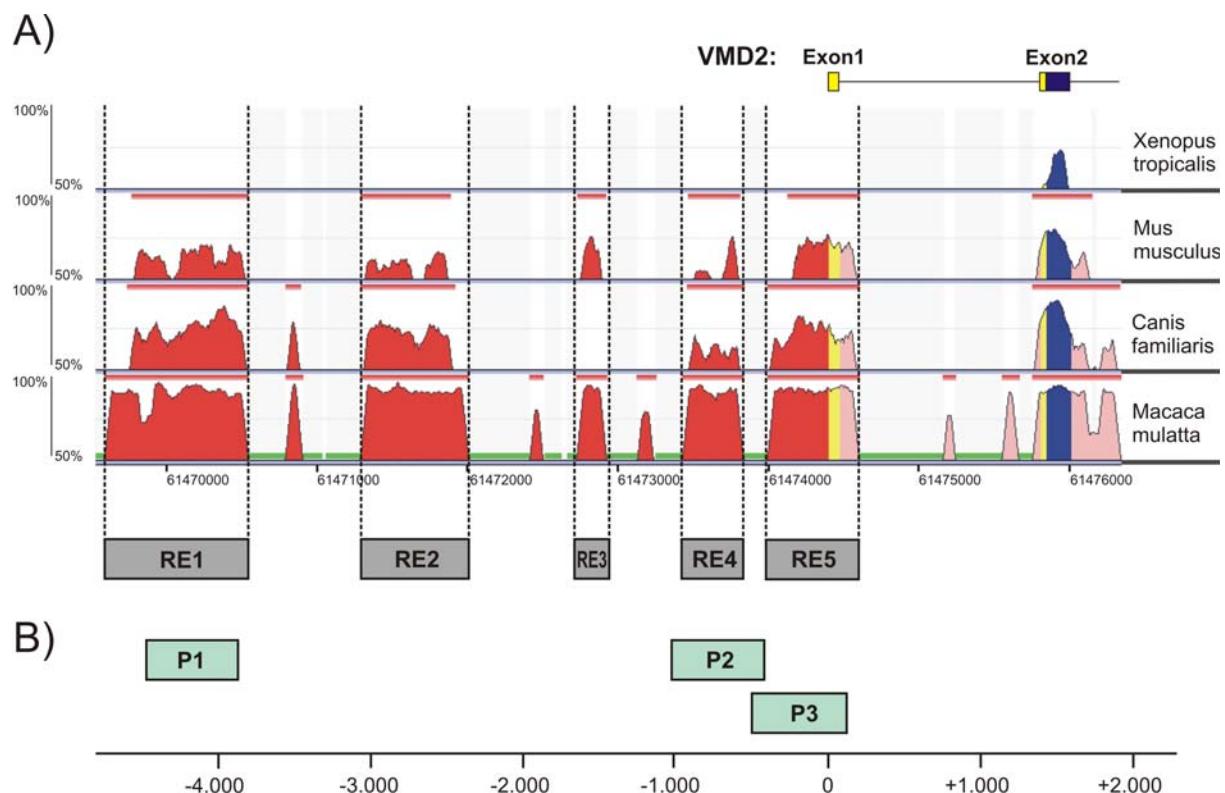


Abbildung 28  
Komparative Genomik Analyse und Promotorenvorhersage (hg18 chr11:61469500-61476500):

A) ECR-Browser Schema: Vergleich -5.000bp bis +2.000bp relativ zum Transkriptionsstartpunkt von VMD2 mit den homologen Sequenzen von Rhesusaffe, Hund, Maus und Krallenfrosch. Farbkennzeichnung: Gelb= Exone VMD2, blau= Translationsbereich VMD2, rot & rosa= nichtkodierende evolutionär konservierte Sequenzabschnitte. Fünf potentiell regulatorische Elemente (RE) wurden identifiziert. RE1: -4805 / 3.853; RE2: -3105 / -2.390; RE3: -1.673 / -1.472; RE4: -969 / -563; RE5: -404 / +208

B) Genomatix PromoterInspector Schema (maßstabsgetreu zu Abb. 27 A): Identifikation von 3 potentiellen Promotoren (P1-P3), dargestellt relativ zum Transkriptionsstartpunkt (= 0). P1: -4.471 / -3.870; P2: -1.027 / -426; P3: -501 / +109

#### **4.2.2 Analyse der regulatorischen Funktion der evolutionär konservierten Sequenzabschnitte und vorhergesagten Promotorbereiche in der 5'-Region von VMD2**

*In silico* Analysen identifizierten evolutionär konservierte Sequenzabschnitte (RE1-5). Diese zusammen mit den bereits publizierten VMD2 Promotormodulen Pmin1 & Pmin2 (Esumi et al. 2007; Esumi et al. 2004) wurden mittels eines Luziferase-basierten Reportergenassays bezüglich ihrer potentiellen Promotoraktivität untersucht. Im Rahmen der hierfür notwendigen Klonierung wurde für optimiertes Oligonukleotiddesign und zur Vermeidung der Verkürzung von regulatorischen Motiven die Sequenzbereiche der RE\_ um 20-50bp in 5'- und 3'-Richtung erweitert (siehe Abb. 29).

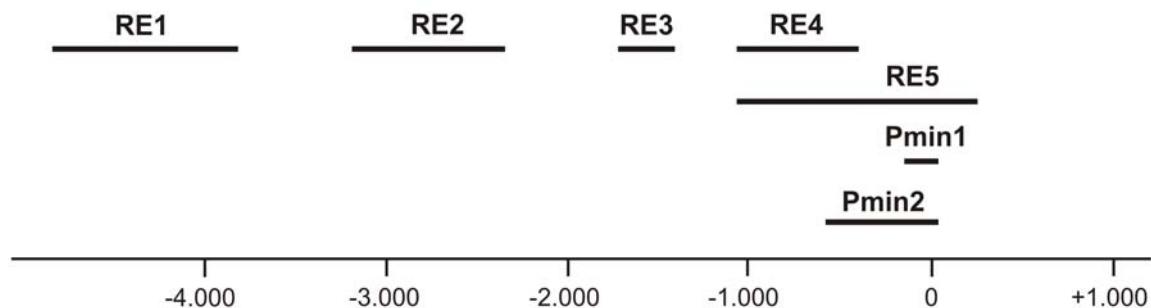
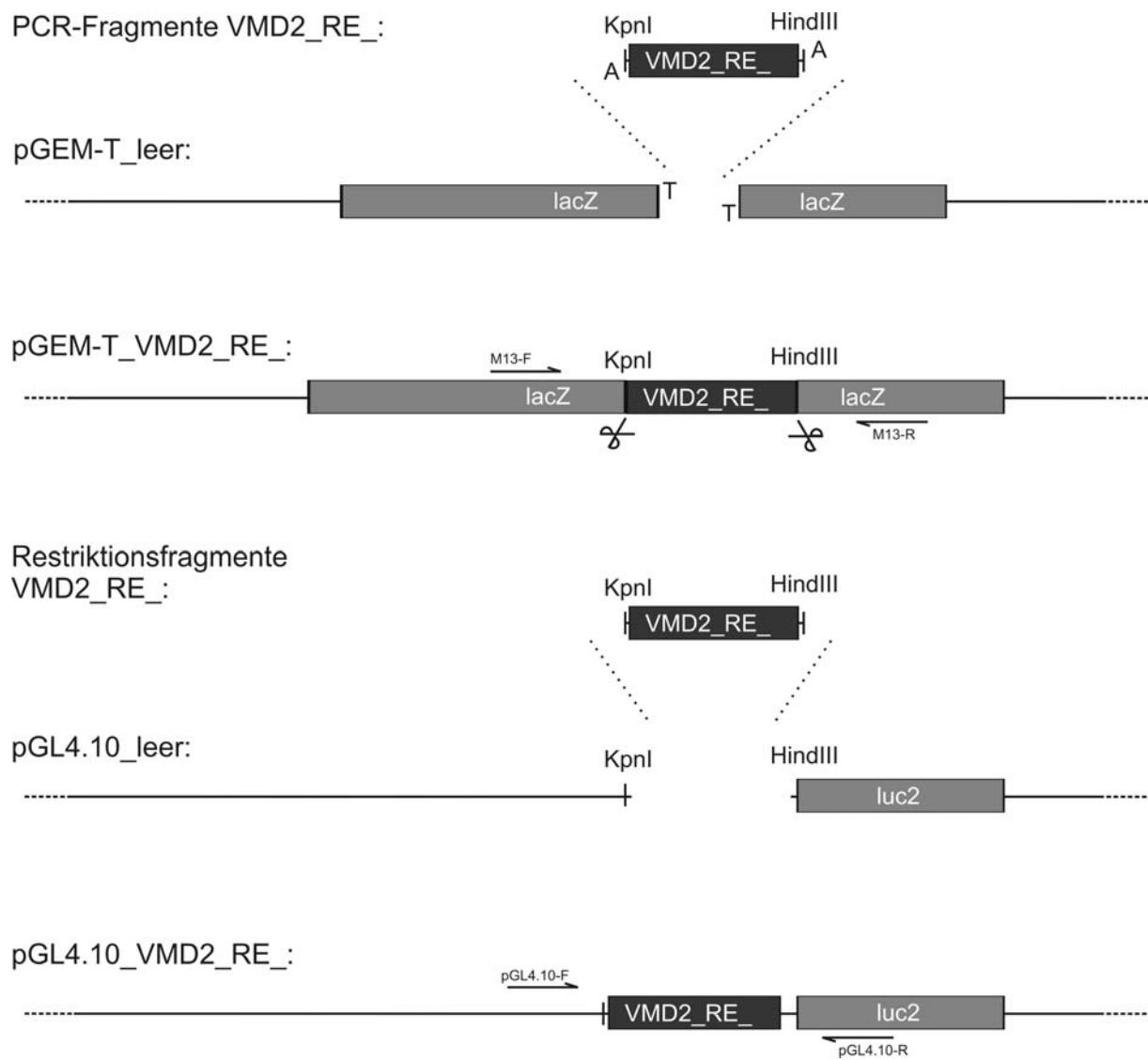


Abbildung 29  
Klonierungsabschnitte der RE\_ für die experimentelle Promotoranalyse:  
RE1: -4828 / -3807; RE2: -3.183 / -2.345; RE3: -1.724 / -1.414; RE4: -1.071 / -402; RE5: -1.071 / +251; Pmin1: -154 / +38; Pmin2: -585 / +38

#### **4.2.3 Klonierung der potentiell regulatorischen Sequenzabschnitte (RE) aus dem 5'-Bereich von VMD2**

Die den RE entsprechenden Sequenzabschnitte wurden mittels PCR von genomischer DNA amplifiziert. Über Oligonukleotide wurden hierbei zusätzlich eine 5'-Kpn-I- und eine 3'-Hind-III-Restriktionsschnittstelle angefügt. Die PCR Produkte wurden über die durch die Taq DNA-Polymerase bedingten 3'-Adeninüberhänge in pGEM-T Vektoren zwischenkloniert. Nach der Selektion der Klone erfolgte über einen Restriktionsdoppelverdau mit Kpn-I und Hind-III die Klonierung aus den pGEM-T Plasmiden in die pGL4.10 Vektoren. Hierzu wurden die Reaktionsansätze nach der Ligation in kompetente *E. coli* Ansätze transformiert und die pGL4.10\_VMD2\_RE\_ Klone mit dem Antibiotikum Ampicillin auf LB-Platten selektioniert. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die *E. coli* Kolonien gepickt und

mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Integration der entsprechenden Insertionen überprüft. Die finalen pGL4.10\_VMD2\_RE Plasmide enthalten das für die Luziferase kodierende Reportergen luc2 unter der Kontrolle des entsprechenden eingefügten RE. Im Allgemeinen wurden positive Klone bei der Kolonie-PCR durch die zugehörigen Oligonukleotidpaare M13-F und M13-R (in pGEM-T) sowie pGL4.10-F und pGL4.10-R (in pGL4.10) identifiziert und durch Sequenzierung abschließend bestätigt (siehe Abb. 30).



**Abbildung 30**  
**Klonierungsstrategie der pGL4.10\_VMD2\_RE Plasmide für den Luziferase-basierten Reportergenassay:**  
An die RE DNA-Fragmente wurden eine 5'-Kpn-I- und 3'-Hind-III-Restriktionsschnittstelle mittels PCR angefügt. Zwischenklonierung der PCR-Fragmente erfolgte in den pGEM-T Klonierungsvektor. Zielklonierung wurde über die Kpn-I und Hind-III-Schnittstellen in den

Expressionsvektor pGL4.10 realisiert. Finale pGL4.10\_VMD2\_RE\_ Plasmide kodieren für das Luziferasegen luc2 unter der Kontrolle des jeweiligen klonierten RE als Promotor. Position der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide ist entsprechend ihrer Position durch Pfeile angedeutet.

#### **4.2.4 Analyseablauf Luziferasen Reportergenassay**

Die pGL4.10\_VMD2\_RE Plasmide (jeweils ~ 250µg) wurden aus LB Übernachtkulturen isoliert, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O auf 250ng/µl eingestellt. Unter Verwendung eines Transfektionsreagenzes wurden ARPE-19 Zellen mit den pGL4.10 Plasmiden transfiziert. Hierzu wurden die Zellen in 10cm Zellkulturschalen bis zu einer Zelldichte von 60-70% im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C kultiviert. Die Transfektionen erfolgten mit jeweils 10µg Plasmid-DNA pro 10cm Zellkulturschale. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen, zwei Mal mit 1x PBS gewaschen und die Zellen mit 500µl 1x Reporter-Lysis-Buffer durch 15min Inkubation lysiert. Das Zelllysat wurde anschließend in 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und unlösliche Zellbestandteile durch Zentrifugation (2min 13.000g) abgetrennt. Abschließend wurden 10µl Zelllysat zu 100µl Luciferin-Reaktionsgemisch pipettiert und die Lumineszenz im Luminometer quantifiziert (siehe Abb. 31).

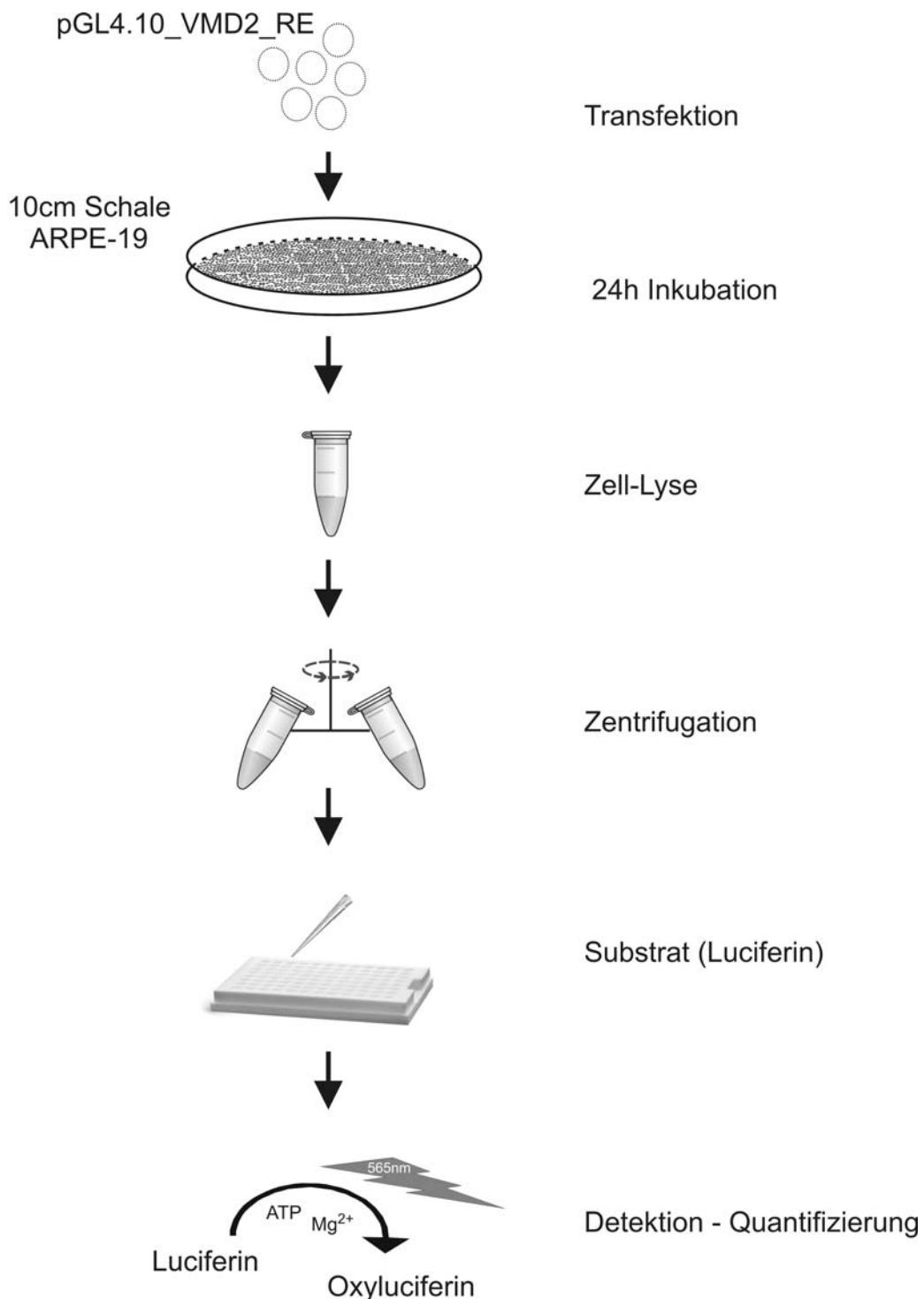


Abbildung 31

Analyseablaufes des Luziferase-Reportergenassays zur Bestimmung der regulatorischen Eigenschaften der VMD2 RE:

pGL4.10\_VMD2\_RE Plasmide wurden in auf 10cm Zellkulturschalen gezüchteten ARPE-19 Zellen transfiziert. Nach 24h Inkubation bei 37°C im Zellkulturinkubator erfolgte die Lysierung der Zellen, gefolgt von der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile. Abschließend erfolgte die Quantifizierung der Reportergenexpression (Luziferase) nach Zugabe des Luciferinsubstrates im Luminometer.

Der Versuch wurde in ARPE-19 Zellen im Triplikat durchgeführt und die gewonnenen Daten in Excel und SigmaPlot bezüglich ihrer Mittelwerte und Standardabweichungen ausgewertet. Neben den pGL4.10\_VMD2\_RE\_ Plasmiden wurden parallel Versuchsansätze mit pGL4.10\_leer durchgeführt. Die Luziferase-Messwerte von pGL4.10\_leer dienten als Bezugswerte für die Auswertung, wobei die Promotoraktivitäten der RE\_ als x-facher Wert von pGL4.10\_leer als relative Promotoraktivität ausgegeben wurden. Hierbei wurden für RE1 0,2-fache, RE2-2,7 fache, RE3 0,4-fache, RE4 149,9-fache und RE5 4,1-fache relative Promotoraktivität detektiert. Die bereits charakterisierten und publizierten Promotor Pmin1 und Pmin2 wiesen 5,5-fache und 0,8-fache relative Promotoraktivität auf (siehe Abb. 32).

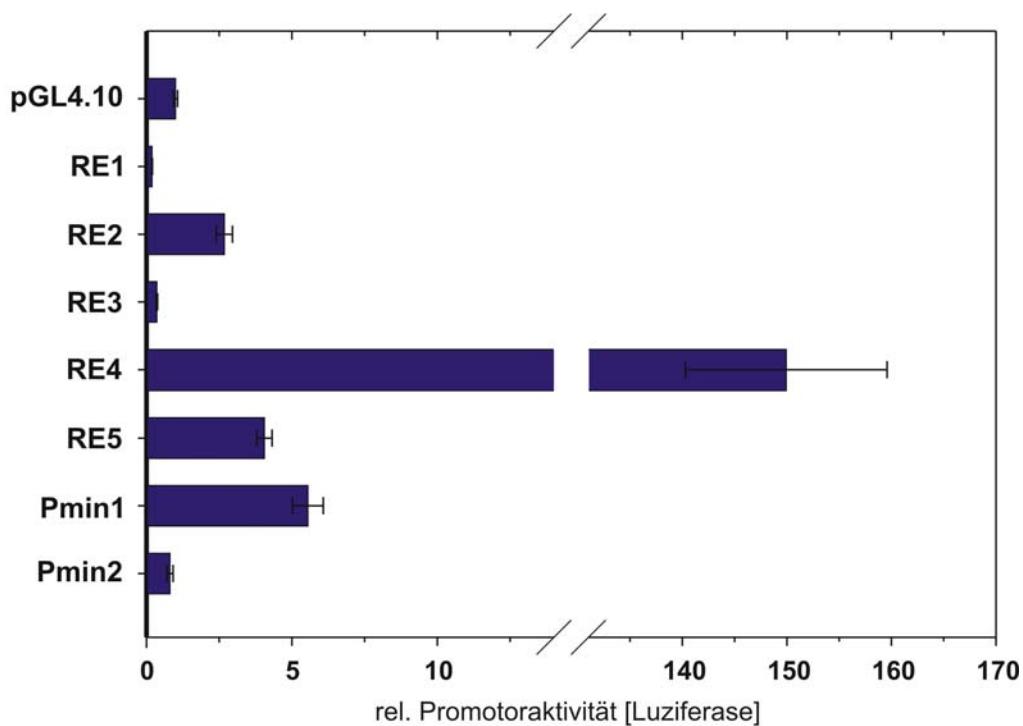


Abbildung 32

Ergebnisübersicht *in vitro* Luziferase-basierten Promotoranalyse von 5 potentiellen Promotormodulen und 2 bekannten Promotormodulen von VMD2:  
Werte sind als relative Promotoraktivität in x-fach zu pGL4.10\_leer dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Triplikate. Unterbrechung der Abszisse von 15 – 120

Basierend auf der Analyse der RE\_ von VMD2 und der hierbei detektierten sehr starken Promotoraktivität von RE4 wurde dieser Sequenzabschnitt intensiver analysiert. Nachdem Promotor im Gegensatz zu Enhancern eine gerichtete Aktivität von 5' nach 3' ausüben, wurde das RE4 (-1.072 / -403) in umgekehrter Orientierung (-403 / -1.072) kloniert, um hierdurch gegebenenfalls eine signifikante Reduktion der Promotoraktivität zu erreichen. Zusätzlich wurden trunkierte Konstrukte zur Feinkartierung erzeugt, sowohl von der 5'- als auch der 3'-Seite (siehe Abb. 33).

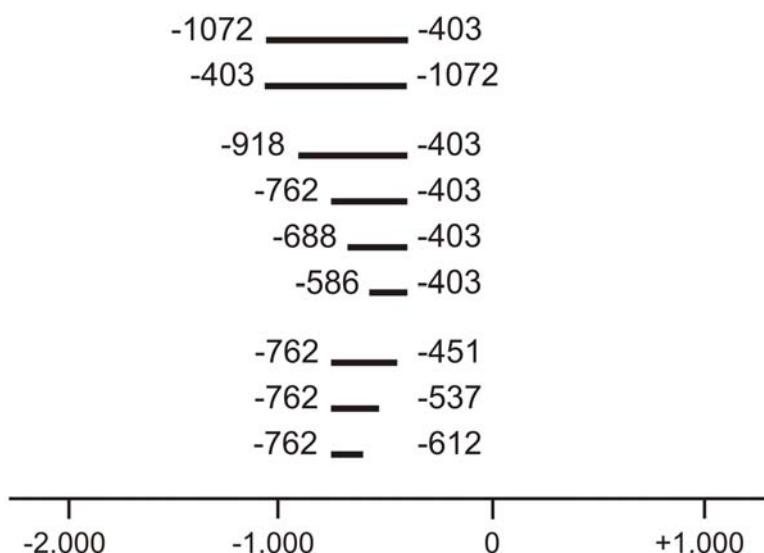


Abbildung 33

Klonierungsabschnitte von RE4 (-1.072 / -403) für die experimentelle Promotoranalyse: Konstrukt mit umgekehrter Orientierung (-403 / -1.072), 4 Konstrukte mit 5'-Verkürzungen (-918; -762; -688; -586 / -403) sowie 3 Konstrukte mit 3'-Verkürzungen (-762 / -451; -537; -612)

Die Analyse der modifizierten RE4 (-1.072 / -403) zeigte für das Konstrukt mit vertauschter Orientierung -403 / -1.072 drastisch verminderte Werte, auf nur noch 3,8-fache im Vergleich zu ca. 150-fache Promotoraktivität bei dem -1.072 / -403 Konstrukt. Innerhalb der Gruppe an 5'- verkürzten Sequenzabschnitten stellte das -762 / -403 Konstrukt mit 193,8-facher Aktivität vor den Konstrukten -918 / -403 (87,7-fach) und -688 / -403 (74,3-fach) das Maximum dar. Die weitere 5'-Verkürzung des -586 / -403 Konstruktes führte zu einer radikalen Reduzierung der Promotoraktivität auf nur noch 3,8-fachen Wert. Die Trunkierung des maximal aktiven Konstruktes -762 / -403 aus 3'-Direktion führt mit den -762 / -451 (125,8-fach), -762 / -537 (-58,9-fach) und -762 / -612 (16,5-fach) Konstrukten zu kontinuierlich verminderten Promotoraktivitäten (siehe Abb. 34).

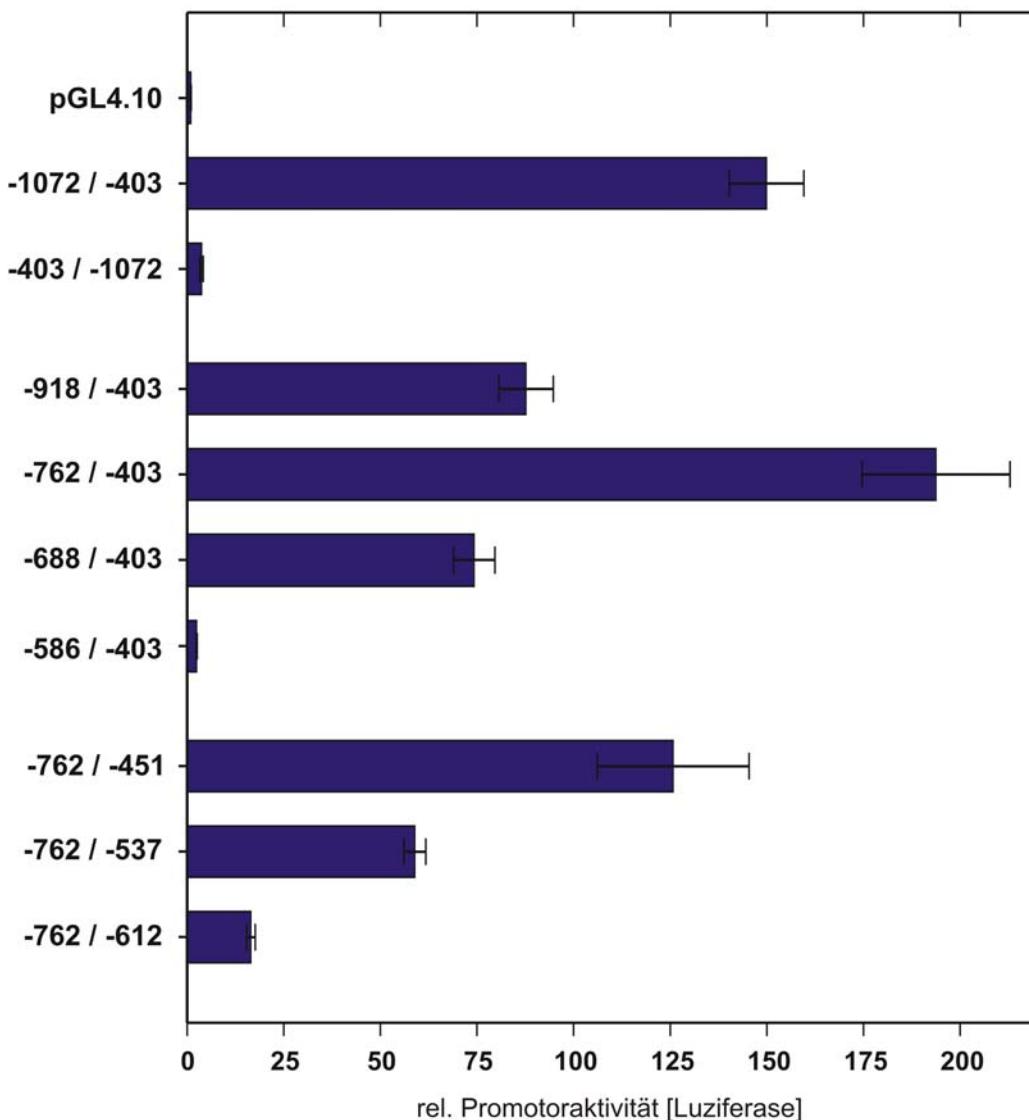


Abbildung 34

Ergebnisübersicht *in vitro* Luziferase-basierten Promotoranalyse der Feincharakterisierung von RE4 (-1.072 / -403):

Analyse eines Konstruktes mit umgekehrter Orientierung (-403 / -1.072), 4 Konstrukte mit 5'-Verkürzungen (-918; -762; -688; -586 / -403) sowie 3 Konstrukte mit 3'-Verkürzungen (-762 / -451; -537; -612). Werte sind als relative Promotoraktivität in x-fach zu pGL4.10\_leer dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung der Triplikate.

#### **4.2.5 Identifizierung von Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphisms, SNPs) in der Sequenz von RE4 von VMD2**

Um zu klären, ob SNPs in dem Sequenzabschnitt -762 / -403 starker Promotoraktivität liegen, wurde die SNP-Annotation Funktion des ECR Browser genutzt. Hierbei konnten die beiden SNPs rs3758976 und rs972355 in diesem Sequenzabschnitt identifiziert werden (siehe Abb. 35 A). Über eine Abfrage mit der „Reference SNP ID(rs)“ in der SNP-Datenbank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) zeigte sich, dass beide SNPs hochfrequent sind. Beispielsweise verteilen sich die Allele in der CEU-Gruppe (Einwohner von Utah mit Nord- und Westeuropäischer Abstammung) bei rs3758976 C : G mit 77,5% : 22,5% und bei rs972355 G : C mit 69,8% : 30,2% (siehe Abb. 35 B).

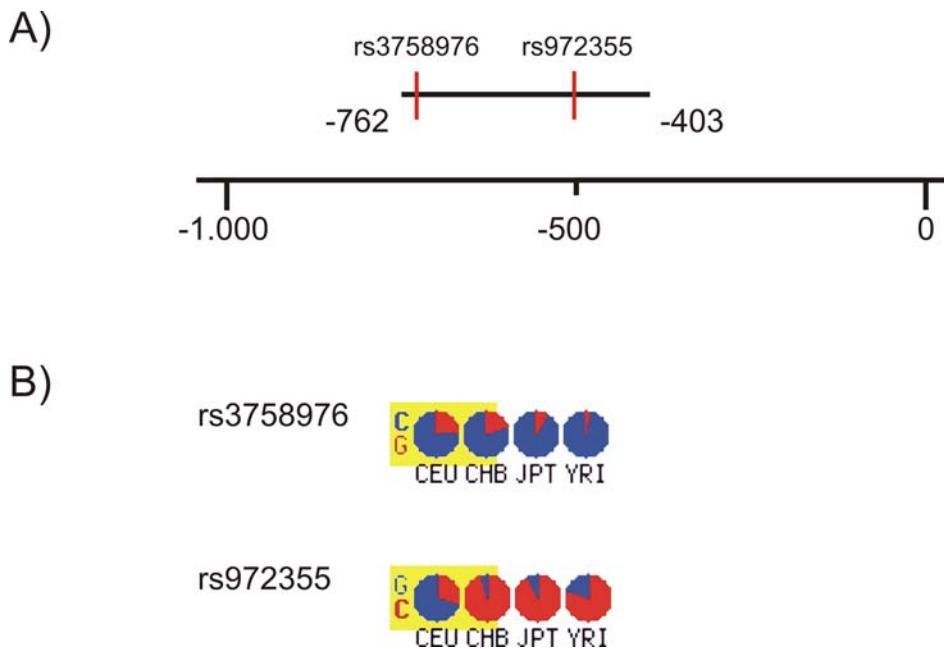


Abbildung 35

SNPs im Sequenzabschnitt -762 / -403:

- A) SNP rs3758976 und rs972355 innerhalb des regulatorischen Sequenzabschnittes
- B) SNP Allelfrequenz innerhalb von Populationsgruppen

Um zu klären, ob die beiden SNPs rs3758976 und rs972355 einen Einfluss auf die Promotoraktivität des Sequenzabschnittes -762 / -403 besitzen, wurden die vier möglichen SNP-Allelkombination GG, GC, CG und CC innerhalb von -762 / -403 in den pGL4.10 Vektor kloniert. Die Klonierungsstrategie wurde wie zuvor bei den RE\_ Konstrukten angewendet (siehe 4.2.3 „Klonierung der potentiell regulatorischen Sequenzabschnitte (RE) aus dem 5'-Bereich von VMD2“). Die Promotoraktivität der vier Varianten von -762 / -403: RE4-GG, RE4-GC, RE4-CG und RE4-CC wurde anschließend mittels Luziferase-basiertem Reportergenassay bestimmt in pGL4.10\_VMD2\_ RE4\_ transfizierten ARPE-19 Zellen, entsprechend der bereits zuvor angewendeten Versuchsdurchführung.

Wie auch zuvor dienten die Luziferase-Messwerte von pGL4.10\_leer als Bezugswerte für die Auswertung, wobei für die vier -762 / -403 SNP Varianten folgende Werte ermittelt wurden:

$\text{RE4-GG} = 97,5$ -fach;  $\text{RE4-GC} = 96,2$ -fach;  $\text{RE4-CG} 193,8$ -fach;  $\text{RE4-CC} 121,9$ -fach womit insbesondere für die SNP Kombination RE4-CG ein deutlich stärkere Promotoraktivität im Vergleich zu den anderen Konstrukten gezeigt wurde (siehe Abb. 36).

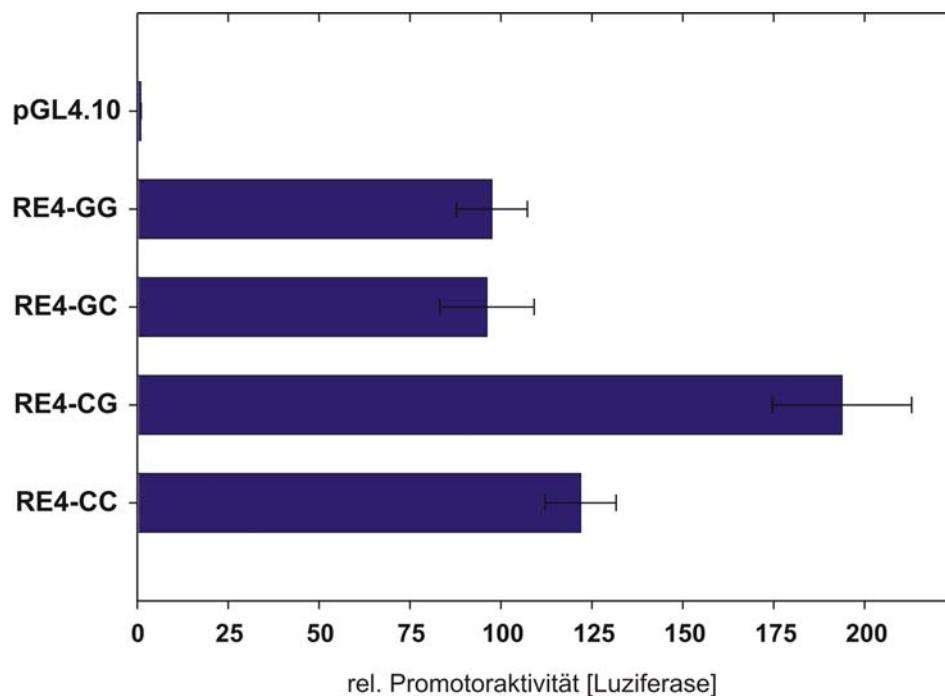


Abbildung 36

Ergebnisübersicht *in vitro* Luziferase-basierten Promotoranalyse:

Vier SNP Variationen GG, GC, CG und CC von rs3758976 und rs972355 im Sequenzbereich von -762 / -403.

Werte sind als relative Promotoraktivität in x-fach zu pGL4.10\_leer dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

#### 4.2.6 *In silico* Analyse des Einflusses der beiden SNPs auf Transkriptionsfaktor-

#### Bindestellen im VMD2\_RE4

Die Reportergen Untersuchungen zeigten, dass die Allelvarianten von SNP rs3758976 und rs972355 im Sequenzbereich von -762 / -403 zumindest *in vitro* einen Einfluss auf die Promotoraktivität haben. Basierend hierauf wurde eine *in silico* Analyse durchgeführt, um zu klären, ob die unterschiedlichen Allele von SNP rs3758976 und rs972355 Einfluss auf Transkriptionsfaktorbindestellen nehmen könnten. Hierfür wurde das Softwareprogramm MatInspector (Genomatix Inc.) genutzt, indem die Sequenzabschnitte +/-50bp um die SNPs rs3758976 und rs972355 für jeweils beide Allele (C & G) bezüglich potentieller

Transkriptionsfaktorbindestellen analysiert wurden. Als Suchoption wurden die Einstellungen augenspezifische Transkriptionsfaktoren „Eye“, sowie die Schwellenwerte für Core und Matrix Identität = 0,75 für die Transkriptionsfaktorbindestellen angewandt (Cartharius et al. 2005; Quandt et al. 1995).

Die Ergebnisse finden sich in den folgenden Übersichtslisten (Abb. 37-38). Beim Vergleich der putativen Transkriptionsfaktorbindestellen an den beiden Allelen C & G am SNP rs3758976 zeigte sich, dass an den Sequenzabschnitt mit G-Allel für 8 Transkriptionsfaktoren (-familien) keine Bindung mehr vorhergesagt wurde. Für zwei Transkriptionsfaktoren, KLF15 und IA-1 war der Core-Bereich der Bindestellen durch das G Allel betroffen (siehe Abb. 37). Bei der Analyse der Auswirkung der SNP rs972355 Allele C & G waren durch das G Allel 4 Transkriptionsfaktoren (-familien) betroffen. Hierbei wurde der Core-Bereich für die Bindestellen von „Winged Helix Protein“ affektiert. Durch das G-Allel wurde auch eine neue potentielle Transkriptionsfaktorbindestelle für das „Sterol Regulatory Element Binding Protein“ induziert (siehe Abb. 38).

**A)**

rs3758976 C

1        10        20        30        40        50        60        70        80        90        100  
 CAGCAGCATAAACTCCAGGGCTGTTCTGTCAACCCCCACCAGACTCACCCCCCTCCACCAGCCCCGGCAGGCTTCTCCTCCATCTCTGAAGCAACTTACT  
 GTCGTCGTATTGAGGTCCCACAAGACAGTTGGGGTGGTCTGAGTGGGGGAGGTGGTCGGGGCGTCCGAAGAGGAAGGTAGAGAGACTTCGTTGAATGA

1        gcataaaactCCAGggctgt  
 2                gggggtTGACagaacagccct  
 3                tctggTGGGgggttgaca  
 4                tggtgGGGGttga  
 5                acccccACCAgactcacccccc  
 6                accagactcaCCCCctccacca  
 7                aggGGGGttagtc  
 8                agactcaCCCCctccaccaggcc  
 9                gacTCACccccctcc  
 10               ggaGGGGgggtagtc  
 11               ggttgaGGGGgggtgagt  
 12               tggagGGGGgttga  
 13               GGGGctgtggaggggggtga  
 14               ggttGAGGgggggt  
 15               ccccccTCCAaccagccccggcag  
 16               ttcatAGAGatggaaaggagaagcct

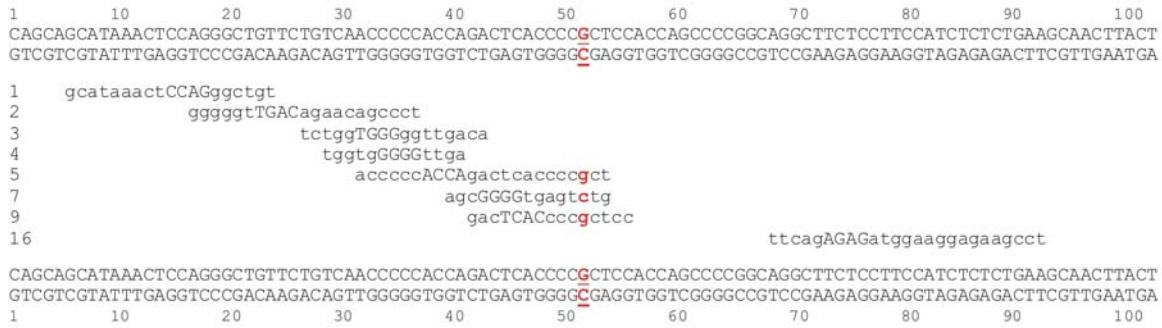
1        10        20        30        40        50        60        70        80        90        100  
 CAGCAGCATAAACTCCAGGGCTGTTCTGTCAACCCCCACCAGACTCACCCCCCTCCACCAGCCCCGGCAGGCTTCTCCTCCATCTCTGAAGCAACTTACT  
 GTCGTCGTATTGAGGTCCCACAAGACAGTTGGGGTGGTCTGAGTGGGGGAGGTGGTCGGGGCGTCCGAAGAGGAAGGTAGAGAGACTTCGTTGAATGA

**B)**

	Family/matrix	Further information	Opt. thresh.	Start pos.	End pos.	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
1	VSPAX6/PAX6.02	PAX6 paired domain and homeodomain are required for binding to this site	0.89	6	24	+	1.000	0.890	gcataaaactCCAGggctgt
2	VSCREB/TAXCREB.01	Tax/CREB complex	0.81	17	37	-	1.000	0.845	gggggtTGACagaacagccct
3	VSEGRF/WT1.01	Wilms Tumor Suppressor	0.92	27	43	-	1.000	0.924	tctggTGGGgggttga
4	VSINSM/INSM1.01	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	29	41	-	1.000	0.904	tggtgGGGGgttga
5	VSZBPF/ZNF202.01	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	0.73	32	54	+	0.761	0.765	acccccACCAgactcacccccc
6	VSZBPF/ZBP89.01	Zinc finger transcription factor ZBP-89	0.93	38	60	+	1.000	0.948	accagactcaCCCCctccacca
7	VSSP1F/TIEG.01	TGFbeta-inducible early gene (TIEG) / Early growth response gene alpha (EGRAalpha)	0.83	40	54	-	1.000	0.878	aggGGGGttagtctg
8	VSZBPF/ZNF219.01	Kruppel-like zinc finger protein 219	0.91	41	63	+	1.000	0.940	agactcaCCCCctccaccaggcc
9	VSSREB/SREBP.02	Sterol regulatory element binding protein	0.80	42	56	+	1.000	0.832	gacTCACccccctcc
10	VSSP1F/TIEG.01	TGFbeta-inducible early gene (TIEG) / Early growth response gene alpha (EGRAalpha)	0.83	42	56	-	1.000	0.849	ggaGGGGgggtagtc
11	VSEKLF/KLF.01	Kidney-enriched kruppel-like factor, KLF15	0.91	43	59	-	1.000	0.971	ggttgaGGGGgggtgagt
12	VSINSM/INSM1.01	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	45	57	-	1.000	0.915	tggagGGGGgttga
13	VSPLAG/PLAG1.01	Pleomorphic adenoma gene (PLAG) 1, a developmentally regulated C2H2 zinc finger protein	0.88	45	65	-	0.958	0.925	GGGGctgtggaggggggtga
14	VSMZF/MAZ.01	Myc associated zinc finger protein (MAZ)	0.90	47	59	-	1.000	0.929	ggttGAGGgggt
15	VSZBPF/ZNF202.01	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	0.73	48	70	+	0.761	0.742	ccccccTCCAaccagccccggcag
16	VSGABF/GAGA.01	GAGA-Box	0.78	69	93	-	1.000	0.797	ttcagAGAGatggaaaggagaagcct

C)

rs3758976 G



D)

	Family/matrix	Further Information	Opt. thresh.	Start pos.	End pos.	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
1	V\$PAX6/PAX6.02	PAX6 paired domain and homeodomain are required for binding to this site	0.89	6	24	+	1.000	0.890	gcataaaactCCAGggctgt
2	V\$CREB/TAXCREB.01	Tax/CREB complex	0.81	17	37	-	1.000	0.845	ggggggTGACagaacagccct
3	V\$EGRF/WT1.01	Wilms Tumor Suppressor	0.92	27	43	-	1.000	0.924	tctggTGGGgggttgaca
4	V\$INSM/INSM1.01	Zinc finger protein insulinoma-associated 1 (IA-1) functions as a transcriptional repressor	0.90	29	41	-	1.000	0.904	tggtgGGGGttga
5	V\$ZBPF/ZNF202.01	Transcriptional repressor, binds to elements found predominantly in genes that participate in lipid metabolism	0.73	32	54	+	0.761	0.761	acccccACCAactcaccc <del>g</del> ct
7	V\$SP1F/TIEG.01	TGFbeta-inducible early gene (TIEG) / Early growth response gene alpha (EGRaLpha)	0.83	40	54	-	1.000	0.878	agcGGGGtgagt <del>c</del> tg
9	V\$SREB/SREBP.02	Sterol regulatory element binding protein	0.80	42	56	+	1.000	0.832	gacTCA <del>Cccc</del> <del>g</del> ctcc
16	V\$GABF/GAGA.01	GAGA-Box	0.78	69	93	-	1.000	0.797	ttca <del>g</del> AGAGatggagaaggagaagctt

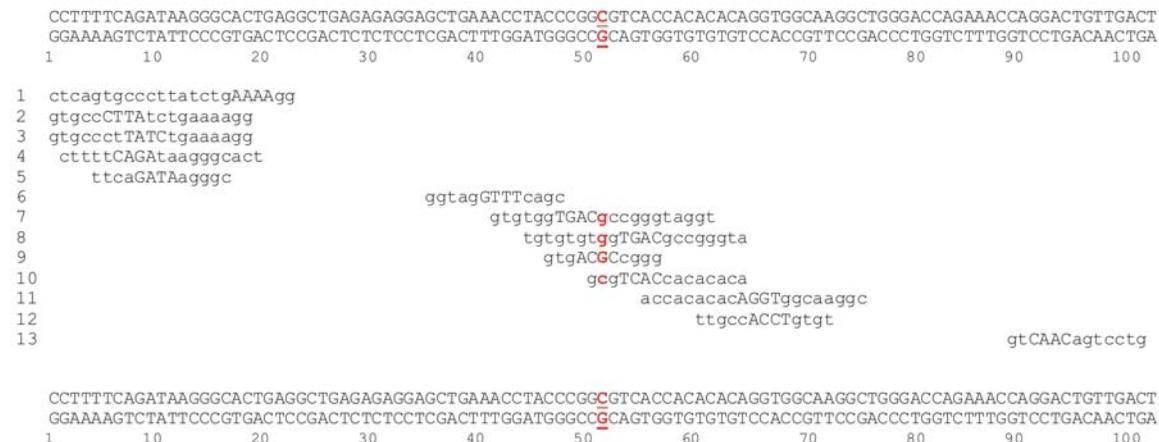
Abbildung 37

Effekt der SNP rs3758976 Allele C & G auf potentielle Transkriptionsfaktor-bindestelle:  
 A & C) DNA-Sequenz von SNP rs3758976 +/- 50bp. Rote Buchstaben SNP und Position in den Transkriptionsfaktorbindestellen, hierbei Großbuchstaben Core-Sequenz & Kleinbuchstaben Matrixsequenz

B & D) MatInspector vorhergesagte Transkriptionsfaktor (-familien) -bindestellen

A)

rs972355 C



B)

	Family/matrix	Further Information	Opt. thresh.	Start pos.	End pos.	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
1	V\$PAX2/PAX2.01	Zebrafish PAX2 paired domain protein	0.78	1	23	-	0.789	0.818	ctcagtgccttatctgAAA <sup>Agg</sup>
2	V\$SNAP/PSE.02	Proximal sequence element (PSE) of RNA polymerase III-transcribed genes	0.73	1	19	-	0.857	0.753	gtgccCTTAtctgaaaagg
3	V\$SRFF/SRF.01	Serum response factor	0.66	1	19	-	0.757	0.774	gtgcctTATCtgaaaaagg
4	V\$SRFF/SRF.02	Serum response factor	0.84	2	20	*	0.822	0.862	ctttCAGAtaagggcact
5	V\$GATA/GATA1.06	Complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 2	0.96	5	17	+	1.000	0.998	ttcaGATAagggc
6	V\$ZFHX/AREB6.04	AREB6 (Atplai regulatory element binding factor 6)	0.98	36	48	-	1.000	0.980	ggttagGTTTcagc
7	V\$CREB/ATF.01	Activating transcription factor	0.90	42	62	-	1.000	0.901	gtgtggTGACccgggtaggt
8	V\$CREB/CREB.02	cAMP-responsive element binding protein	0.89	45	65	-	1.000	0.972	tgtgtgtggTGACccgggta
9	V\$WHNF/WHN.01	Winged helix protein, involved in hair keratinization and thymus epithelium differentiation	0.95	47	57	-	1.000	0.952	gtgACGCggg
10	V\$SREB/SREBP.02	Sterol regulatory element binding protein	0.80	51	65	*	1.000	0.856	gcgTCACcacacaca
11	V\$BRAC/BRACH.01	Brachury	0.66	56	76	+	1.000	0.706	accacacacAGGTggcaaggc
12	V\$ZFHX/AREB6.01	AREB6 (Atplai regulatory element binding factor 6)	0.93	61	73	-	1.000	0.930	ttgccACCTgtt
13	V\$MYBL/CMYB.01	c-Myb, important in hematopoiesis, cellular equivalent to avian myoblastosis virus oncogene v-myb	0.90	90	102	-	1.000	0.976	gtCAA <sup>C</sup> agtctg

C)

rs972355 G

CCTTTCAAGATAAGGGCACTGAGGCTGAGAGAGGAGCTGAAACCTACCCGGGGTCACCACACAGGTGGAAGGCTGGGACCAGAAACCAGGACTGTTGACT  
GGAAAAGTCTATTCCCGTACTCGACTCTCCTCGACTTTGGATGGGCCAGTGGTGTGTGTCACCGTCCGACCCCTGGCTTTGGTCTGACAACGTGA  
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

```

1 ctcagtgcgccttatctgAAAAGg
2 gtgccCTTAtctgaaaagg
3 gtgcgcctTATCtgcggcact
4 cttttCAGAtaagggcact
5 ttcaGATAaggc
6 ggttagGTTTcagc
14 ggTCACcacacaca
11 accacacacAGGTggcaaggc
12 ttgccACCTgtgt
13 gtCAACagtcctg

```

CCTTTCAAGATAAGGGCACTGAGGCTGAGAGAGGAGCTGAAACCTACCCGGGGTCACCACACAGGTGGAAGGCTGGGACCAGAAACCAGGACTGTTGACT  
GGAAAAGTCTATTCCCGTACTCGACTCTCCTCGACTTTGGATGGGCCAGTGGTGTGTGTCACCGTCCGACCCCTGGCTTTGGTCTGACAACGTGA  
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100

D)

	Family/matrix	Further Information	Opt. thresh.	Start pos.	End pos.	Strand	Core sim.	Matrix sim.	Sequence
1	V\$PAX2/PAZ2.01	Zebrafish PAX2 paired domain protein	0.78	1	23	-	0.789	0.818	ctcagtgcgccttatctgAAAAGg
2	V\$SNAP/PSE.02	Proximal sequence element (PSE) of RNA polymerase II-transcribed genes	0.73	1	19	-	0.857	0.753	gtgccCTTAtctgaaaagg
3	V\$SRPF/SRF.01	Serum response factor	0.66	1	19	-	0.757	0.774	gtgcgcctTATCtgcggcact
4	V\$SRPF/SRF.02	Serum response factor	0.84	2	20	+	0.822	0.862	cttttCAGAtaagggcact
5	V\$GATA/GATA1.06	Complex of Lmo2 bound to Tal-1, E2A proteins, and GATA-1, half-site 2	0.96	5	17	+	1.000	0.998	ttcaGATAaggc
6	V\$ZFHX/AREB6.04	AREB6 (Atplal regulatory element binding factor 6)	0.98	36	48	-	1.000	0.980	ggttagGTTTcagc
14	V\$SREB/SREBP.02	Sterol regulatory element binding protein	0.80	51	65	+	1.000	0.867	gggTCACcacacaca
11	V\$BRAC/BRACH.01	Brachury	0.66	56	76	+	1.000	0.706	accacacacAGGTggcaaggc
12	V\$ZFHX/AREB6.01	AREB6 (Atplal regulatory element binding factor 6)	0.93	61	73	-	1.000	0.930	ttgccACCTgtgt
13	V\$MYBL/CMYB.01	c-Myb, important in hematopoiesis, cellular equivalent to avian myoblastosis virus oncogene v-myb	0.90	90	102	-	1.000	0.976	gtCAACagtcctg

Abbildung 38

Effekt der SNP rs972355 Allele C & G auf potentielle Transkriptionsfaktor-bindestelle:  
 A & C) DNA-Sequenz von SNP rs972355 +/- 50bp. Rote Buchstaben SNP und Position in den Transkriptionsfaktorbindestellen, hierbei Großbuchstaben Core-Sequenz & Kleinbuchstaben Matrixsequenz  
 B & D) MatInspector vorhergesagte Transkriptionsfaktor (-familien) -bindestellen

#### **4.2.7 Experimentelle Analyse von Allel-spezifischen Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich von rs3758976 und rs972355**

Nachdem die *in silico* Vorhersagen Allel-spezifische Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich von rs3758976 und rs972355 zeigten, sollte dies durch eine *in vitro* Analyse weiter eruiert werden. Hierzu kam EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) zur Anwendung zur Charakterisierung der Interaktion von DNA und DNA-bindenden Proteinen (z.B. Transkriptionsfaktoren). Im Rahmen dieser Arbeit wurden hierzu 21bp-lange Sequenzabschnitte verwendet, jeweils +/- 10bp zu den beiden SNPs rs3758976 und rs972355 für das C- und G-Allel. Kultivierte ARPE-19 Zellen wurden, wie auch für den Luziferase-basierten Reportergenassay, zur Gewinnung von Kernproteinextrakten verwendet. Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Protein-Komplexe im Polyacrylamidgel wurden die Allel-spezifischen Interaktionskomplexe durch die vorab durchgeführte radioaktive Markierung der DNA-Fragmente nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Spezifität durch kompetitive Blockierung mit nicht-radiaktiv markierten DNA-Fragmenten analysiert.

#### **4.2.8 Analyseablauf EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

Als erster Schritt wurden 21bp lange komplementäre Oligonukleotide zu dsDNA hybridisiert, indem 20 $\mu$ l Reaktionsansätze (100 $\mu$ M Oligonukleotide) für 10min bei 90°C erhitzt und für 1h bei Raumtemperatur abgekühlt wurden. Verdünnt auf 5 $\mu$ M wurden die jetzt dsDNA-Abschnitte mit [ $\gamma$ -32P]-dATP durch T4-Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert (1h 37°C). Ungebundene Radioaktivität wurde durch Zentrifugation mit G-25 Sephadex Säulen (2x 1.100g 2min) abgetrennt. Parallel hierzu wurden mit dem kommerziellen Kernprotein-extraktion-Kit (Pierce) nukleäre Zellextrakte aus ARPE-19 Zellen isoliert und aufgereinigt. Für die einzelnen Allele wurden Reaktionsansätze mit nukleären Zellextrakten (4 $\mu$ g) und den entsprechenden radioaktiv markierten dsDNA-Abschnitten inkubiert (20min 37°C) unter Verwendung des kommerziellen Gel Shift Assay System (Promega). Optional wurden bei Kompetitionsansätzen nicht-markierte dsDNA-Abschnitte im Überschuss (ca. 500-fach Molarität) zugegeben. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte im 5% Polyacrylamidgel (1,5h 250V bei 50mA). Anschließend wurde das Gel auf Filterpapier getrocknet und die DNA-Protein-Komplexe durch die radioaktive Markierung der dsDNA auf Röntgenfilmen visualisiert (siehe Abb. 39).

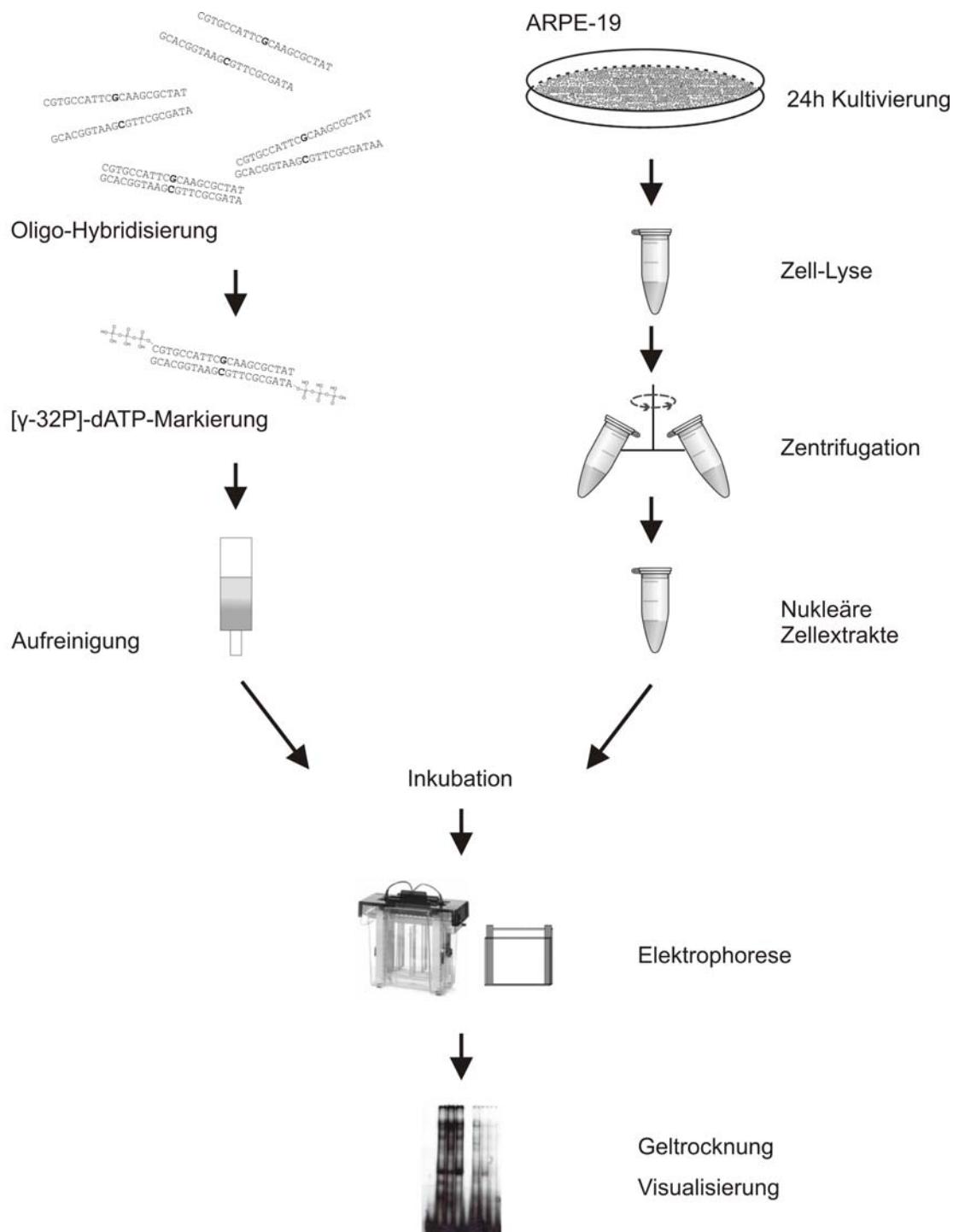


Abbildung 39

Analyseablauf EMSA zur Bestimmung Allel-spezifischer Transkriptionsfaktor-bindestellen: Hybridisierung der 21bp lange komplementäre Oligonukleotide zu dsDNA; Kinase-vermittelte radioaktive Markierung mit  $\gamma$ -32-dATP und Aufreinigung der radioaktiv markierten dsDNA. Kultivierung gefolgt von Isolierung der Protein-Kernextrakte aus ARPE-19 Zellen. Inkubation unterschiedlicher Reaktionsansätze aus dsDNA und Protein-Kernextrakt. Elektrophoretische Auftrennung der dsDNA – Protein-Gemische, sowie abschließend Geltrocknung und Visualisierung der radioaktiven dsDNA-Protein-Komplexe auf Röntgenfilm.

Wie zuvor beschrieben wurden die radioaktiv markierten Allel-spezifischen dsDNA-Abschnitte der beiden SNPs rs3758976 und rs972355 jeweils mit den ARPE-19 Kernproteinextrakt inkubiert, bezeichnet als rs3758976\_C, rs3758976\_G, rs972355\_C und rs972355\_G. Hierbei bestehen die 21bp langen dsDNA Abschnitte aus dem mittig positionierten Allel des SNPs flankiert jeweils von 10bp in 5'- und 3'-Richtung (siehe Abb. 40 A).

Für jedes Allel wurden 4 Reaktionsansätze verwendet:

Erstens: Spur 1, 5, 9 und 13 radioaktiv markierte dsDNA-Abschnitte ohne Kernproteinextrakt. Zweitens: Spur 2, 6, 10 und 14 radioaktiv markierte dsDNA-Abschnitte mit Kernproteinextrakt. Drittens: Spur 3, 7, 11 und 15 radioaktiv markierte dsDNA-Abschnitte mit Kernproteinextrakt und identisches Allel als nicht radioaktiver dsDNA-Abschnitte im Überschuss. Viertens: Spur 4, 8, 12 und 16 radioaktiv markierte dsDNA-Abschnitte mit Kernproteinextrakt und anderes Allel als nicht radioaktiver dsDNA Abschnitte im Überschuss (siehe Abb. 40 B).

Die Spuren ohne Kernproteinextrakt zeigten wie erwartet keine Banden von DNA-Protein-Komplexen, während für alle Spuren mit Kernproteinextrakt diverse Banden von DNA-Protein-Komplexen detektiert werden konnten. Beim Vergleich innerhalb eines Allels und zwischen den korrespondierenden C- und G-Allelen der beiden SNPs zeigten sich unterschiedliche Bandenmuster. Der Vergleich der Allele rs3758976\_C zu rs3758976\_G zeigte für das C-Allel allgemein stärkere Banden an DNA-Protein-Komplexen (Spur 2, 3, 4 vs. 5, 6, 7). Zusätzlich konnte eine hohe Spezifität der detektierten DNA-Protein-Komplexe durch die spezifische Inhibierung der Interaktionen mit nicht radioaktiv-markierten dsDNA rs3758976\_C im Überschuss (Spur 2 vs 3 // weiße Kreise) gezeigt werden. Bei einem Überschuss von dsDNA rs3758976\_G trat dieser Effekt nicht auf (Spur 4).

Allele rs972355\_C zu rs972355\_G zeigten allgemein vergleichbare Signalstärken der detektierten DNA-Protein-Komplexe, wobei sich aber bei rs972355\_G ein starkes Signal für einen hochmolekularen DNA-Protein-Komplex zeigte (Spur 14 // weißer Kreis), was auf eine rs972355\_G Allel-spezifische stärkere Bindung im Vergleich zu rs972355\_C (Spur 10) hindeutet. Hohe Spezifität konnte auch bei weiteren DNA-Protein-Komplexen gezeigt werden durch die Inhibierung der Interaktionen mit nicht radioaktiv-markierten dsDNA. Im Detail sichtbar sowohl bei rs972355\_C im Überschuss (Spur 10 vs 11 // schwarze Kreise), ein Effekt der bei Verwendung von Überschuss an dsDNA rs972355\_G nicht auftrat (Spur 12), als auch bei rs972355\_G im Überschuss (Spur 14 vs 15 // schwarze Kreise), was wiederum bei Überschuss an dsDNA rs972355\_C nicht auftrat (Spur 16) (siehe Abb. 40 B).

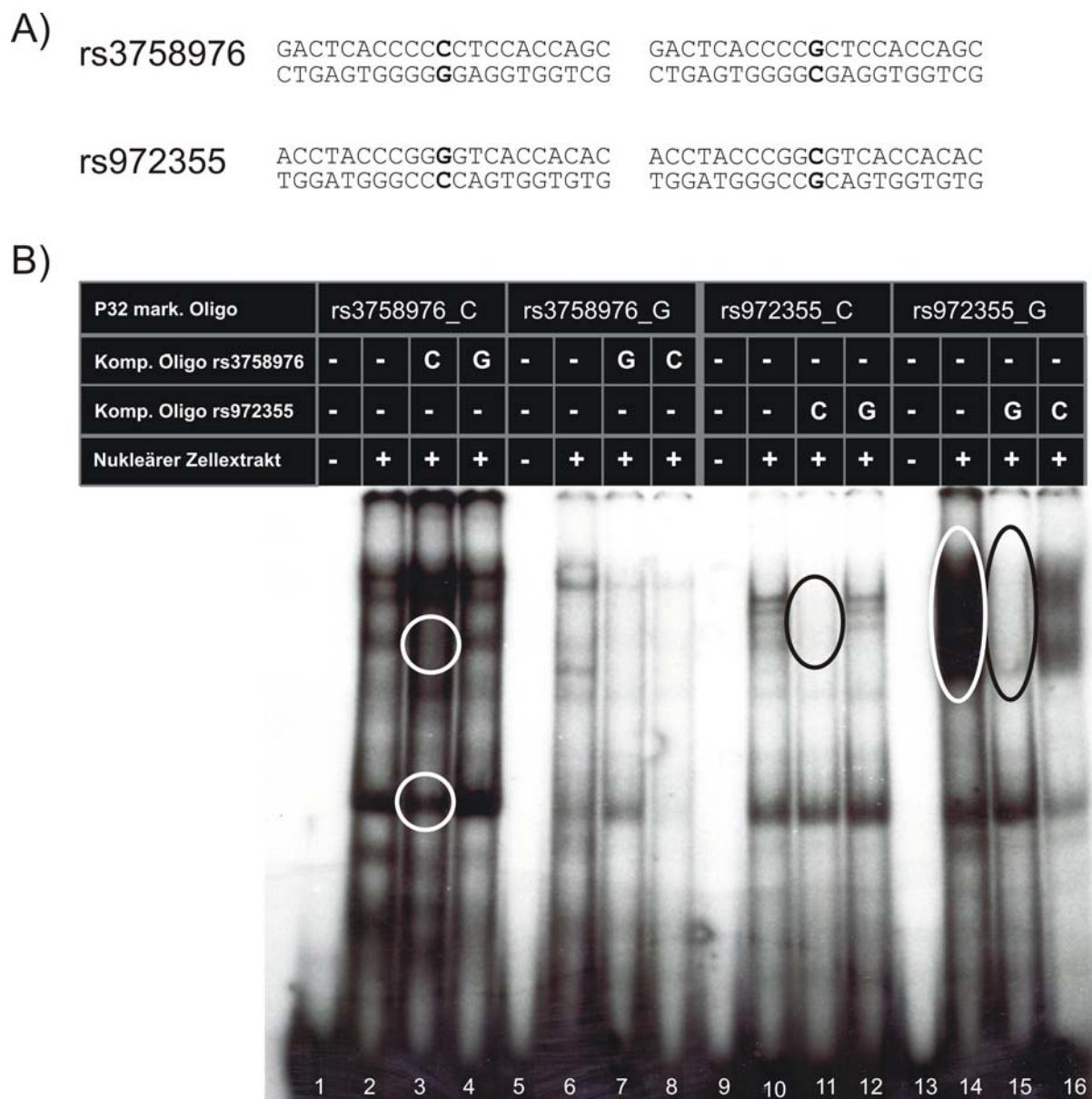


Abbildung 40  
 EMSA Allel-spezifische Transkriptionsfaktorbindestellen bei SNP rs3758976 und rs972355 mit ARPE-19 Kernextrakt:  
 A) dsDNA Abschnitte der rs3758976 und rs972355 Allele (SNP = Fettschrift)  
 B) Allel-spezifische DNA-Protein-Komplexe und Spezifitäts-Kompetitionsversuche mit nicht radioaktiv-markierten desDNA Abschnitten.

## 4.3 Mutation im Exon 6 des humanen VMD2 Gens – Auswirkungen auf das Spleißen

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Analyse von Mutationen im Exon 6 des humanen VMD2 Gens. Insbesonders sollte geklärt werden, ob Nukleotidaustausche in der Nähe des Exon-Intron-Übergangs am 3'-Ende von Exon 6 Einfluss auf das Spleißen der mRNA haben. Für die Analyse wurde ein sogenannter „Mini-Gene Assay“ verwendet, eine sensitive Methode, um den Einfluss von Mutationen auf das Spleißen in vitro zu charakterisieren. Der Vorteil dieser Methode besteht darin, dass Zellmaterial von mutationstragenden Patienten nicht erforderlich ist und der Einfluss der Mutationen quantitativ eruiert werden kann.

### cDNA-Sequenz von Exon6 hVMD2 wt & mut:

(chr11: 61481425-61481522; cDNA 626-714)

|<sup>cDNA 626</sup>  
...tgcccccagGAGATGAACACCTTGC~~G~~TACTCAGTGTGGACACCTGTAT  
GCCTACGACTGGATTAGTATCC**CACTGGTGT**A**TAC**ACAGgtgaggacta...  
| / | | | |  
**A** **A** C G G G  
Mutationen:  
698C>A  
703G>A  
703G>C  
704T>G  
707A>G  
710C>G

atgc = Intron  
ATGC = Exon  
**ATCG** = Mutation

Abbildung 41

DNA-Sequenz von Exon 6 hVMD2 mit flankierenden Intronübergängen:  
Exon-Sequenz dargestellt in Großbuchstaben und Intron-Sequenzen in Kleinbuchstaben. Die Position des Exons in der cDNA-Sequenz ist numerisch angegeben. Zusätzlich sind die Patientenbezogenen Mutationen am 3'-Ende von Exon 6 in Fettschrift hervorgehoben und der Nukleotidaustausch entsprechend der angeführten Mutationsliste eingezeichnet.

### 4.3.1 Klonierung des Mini-Gen Konstuktes

In einem ersten Schritt wurde Exon 6 hVMD2 wildtypisch inklusive der 5'- und 3'-flankierenden intronischen Sequenzen mit spezifischen Oligonukleotiden mittels PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide waren so gewählt, dass an das 268 bp lange DNA-Fragment

zusätzlich eine EcoR-I- an das 5'-Ende und eine BamH-I-Restriktionsschnittstelle an das 3'-Ende angefügt wurden. Über diese beiden Restriktionsschnittstellen wurde das Fragment anschließend in die Multiple Cloning Site (MCS) des pSPL3 Plasmidvektors zwischen die beiden Mini-Gen Exone „pSPL3-Exon1“ und „pSPL3-Exon2“ kloniert. Die Reaktionsansätze wurden in kompetente DH5alpha *E. coli* Ansätze transformiert und die Klone mit dem Antibiotikum Ampizillin auf LB-Platten selektioniert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die *E. coli* Kolonien gepickt und mittels Kolonie-PCR auf erfolgreiche Integration des Inserts „VMD2-Exon6“ überprüft. Abschließend wurde die Sequenz des finalen Vektors pSPL3\_hVMD2\_Exon6\_wt durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden SD6 und SA2 bestätigt (siehe Abb. 42).

PCR-Fragment Exon6\_wt:

GAATTCgaccataggtaccaggccctggtacctggagaagagggtggggcgagcccagggtggggcagg  
tggttcagaacccatcccccatttgcccccccag**GAGATGAACACCTTGC****GTA****CTCAGTG****GGAC**  
**CCTGTATGC****CTACGACTGGATTAGTATCCC****ACTGGTGTATACACAG**gtgaggactaggctggtgaggctg  
ccctttggaaactgaggctagaaggaccaaggaaggcagtgggtggqaagggctcactaggatcc

Restriktionsschnittstellen:  
GAATTC = EcoR-I  
GGATCC = BamH-I

atgc = Intron  
**ATGC** = Exon

PCR-Fragment Exon6\_wt:



pSPL3\_leer:



pSPL3\_VMD2\_Exon6\_wt:

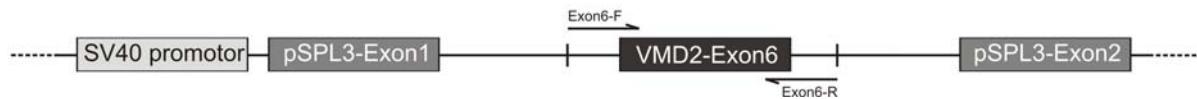


Abbildung 42

Schema zur Klonierung von Exon 6 hVMD2 mit flankierenden intronischen Sequenzen in den Zielvektor pSPL3:

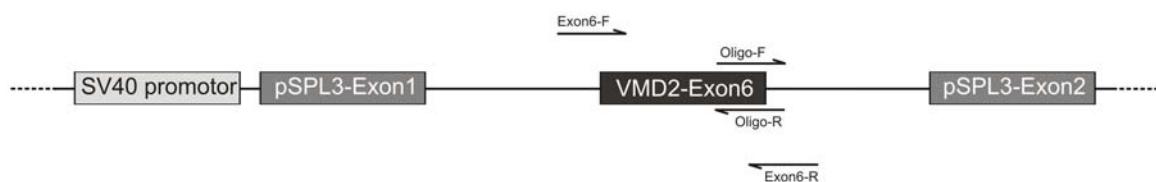
Großbuchstaben (fett) entsprechen Exon 6 hVMD2, die Kleinbuchstaben den flankierenden Intronen. Über die für PCR verwendeten Oligonukleotide (unterstrichene Sequenzen) wurde

am 5'-Ende eine EcoR-I- und am 3'-Ende eine BamH-I-Restriktionsschnittstelle zusätzlich angefügt. Dargestellt ist das 280bp lange PCR-Fragment, das über die MCS in den Vektors pSPL3\_leer integriert wurde. Finaler Vektor pSPL3\_VMD2\_Exon6\_wt enthält zwischen den beiden pSPL3-Exonen 1+2 das DNA-Fragment von hVMD2 Exon 6 mit flankierenden intronischen Sequenzen. Position der zur Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide ist entsprechend ihrer Position durch Pfeile angedeutet.

#### 4.3.2 Klonierung der Patienten-spezifischen Mutationen

Im zweiten Schritt wurden die Patienten-spezifischen Mutationen am Ende von Exon 6 über positionsgerichtete Mutagenesen mittels PCR und DpnI-Restriktionsverdau in den Vektor pSPL3\_hVMD2\_Exon6\_wt eingefügt. Die für die PCR-Mutagenese verwendeten Oligonukleotide wurden so positioniert, dass die auszutauschende Nukleotide (= Mutation) jeweils 5' und 3' von 15 Nukleotiden flankiert wurde. Der PCR-Amplifikation mit den Mutagenese-Oligonukleotiden folgte ein Restriktionsverdau mit DpnI. Diese Restriktionsendonuklease schneidet nur methylierte DNA, wodurch ausschließlich die methylierte PCR-Vorlage Vektor pSPL3\_hVMD2\_Exon6\_wt spezifisch verdaut wird, während die neuen PCR-Produkte mit eingefügter Mutation unverdaut bleiben. Die Reaktionsansätze wurden anschließend in kompetente *E. coli* DH5alpha transformiert und die Klone mit dem Antibiotikum Ampizillin (amp) auf LB-Platten selektioniert. Von den positiv selektionierten Klonen wurden die Plasmide isoliert und die Sequenzen der finalen pSPL3 Mutantenkonstrukte mittels Sequenzierung mit den Oligonukleotiden Exon6-F und Exon6-R verifiziert (siehe Abb. 43).

#### Mutagenes-PCR pSPL3\_VMD2\_Exon6:



- > Dpn-I Restriktionsverdau
- > Transformation in *E. coli*
- > Selektionierung & Kolonie-PCR
- > Sequenzierung mit Oligonukleotiden Exon6-F & Exon6-R

#### Abbildung 43

Mutagenese des Vektors pSPL3\_VMD2\_Exon6 zur Erzeugung der patientenbezogenen Mutationen:

Positionsgerichtete Mutagenese-PCR wurde mit den Oligonukleotiden Oligo-F und Oligo-R entsprechend der aufgeführten Liste durchgeführt. Die fett hervorgehobenen Nukleotide kodieren für die einzufügenden Mutationen. Auflistung des Arbeitsablaufes mit den Schritten methylierungsspezifischer DNA-DpnI-Restriktionsverdau, Transformation in kompetente *E. coli*, Identifizierung der positiven Klone über Kolonie-PCR und finale Sequenzierung der Mutationskonstrukte mit den Oligonukleotiden Exon6-F & Exon6-R. Die Position der Mutations- und Klonierungs-Oligonukleotide sind entsprechend ihrer Positionierung durch Pfeile dargestellt.

#### 4.3.3 Analyseablauf Exon-Trapping

Im dritten Schritt wurden große Mengen (~250µg) der pSPL3 Plasmide aus LB Übernachtkulturen isoliert, die DNA-Konzentration photometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit dH<sub>2</sub>O auf 500ng/µl eingestellt. Unter Verwendung eines Transfektionsreagens wurden ARPE-19 bzw. Cos-7 Zellen mit den pSPL3 Plasmiden transfiziert. Hierzu wurden die Zellen in 10cm Zellkulturschalen bis zu einer Zelldichte von 70-80% im CO<sub>2</sub>-Inkubator bei 37°C kultiviert. Die Transfektionen erfolgten mit jeweils 10µg Plasmid-DNA pro 10cm Zellkulturschale. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgenommen und die RNA aus den transfizierten Zellen unter Verwendung eines kommerziellen Isolierungskits basierend auf Affinitätsbindesäulen. Sofern nicht direkt verwendet zur weiteren Analyse, wurden die RNA-Proben bei -80°C zwischengelagert. Die Konzentrationen der RNA-Proben wurden photometrisch bestimmt und anschließend 3µg totale RNA in die cDNA-Synthese mit polyT-Oligonukleotiden eingesetzt. Für die cDNA-Synthese wurde ein kommerzielles Synthesekit basierend auf dem Enzym Reverse Transkriptase entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Sofern nicht direkt verwendet, wurden die cDNA-Syntheseprodukte bei -20°C bis zur weiteren Analyse zwischengelagert.

Im vierten Schritt wurden je 50ng der zuvor synthetisierten cDNAs als Templates für die RT-PCR eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide (SD6 & SA2) hybridisierten an dem 5'- und 3'- Enden der beiden Mini-Gene Exone. Die Amplifikationsprodukte der RT-PCR wurden anschließend im 2% Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Basierend auf dem vorangegangen natürlichen Spleißvorgang in den Zellen wurden den mRNAs korrigierende Mengen an den beiden möglichen Spleißvarianten per PCR amplifiziert. Abschließend nach der DNA-Gelelektrophorese wurden die RT-PCR-Produkte densitometrisch quantifiziert (siehe Abb. 44).

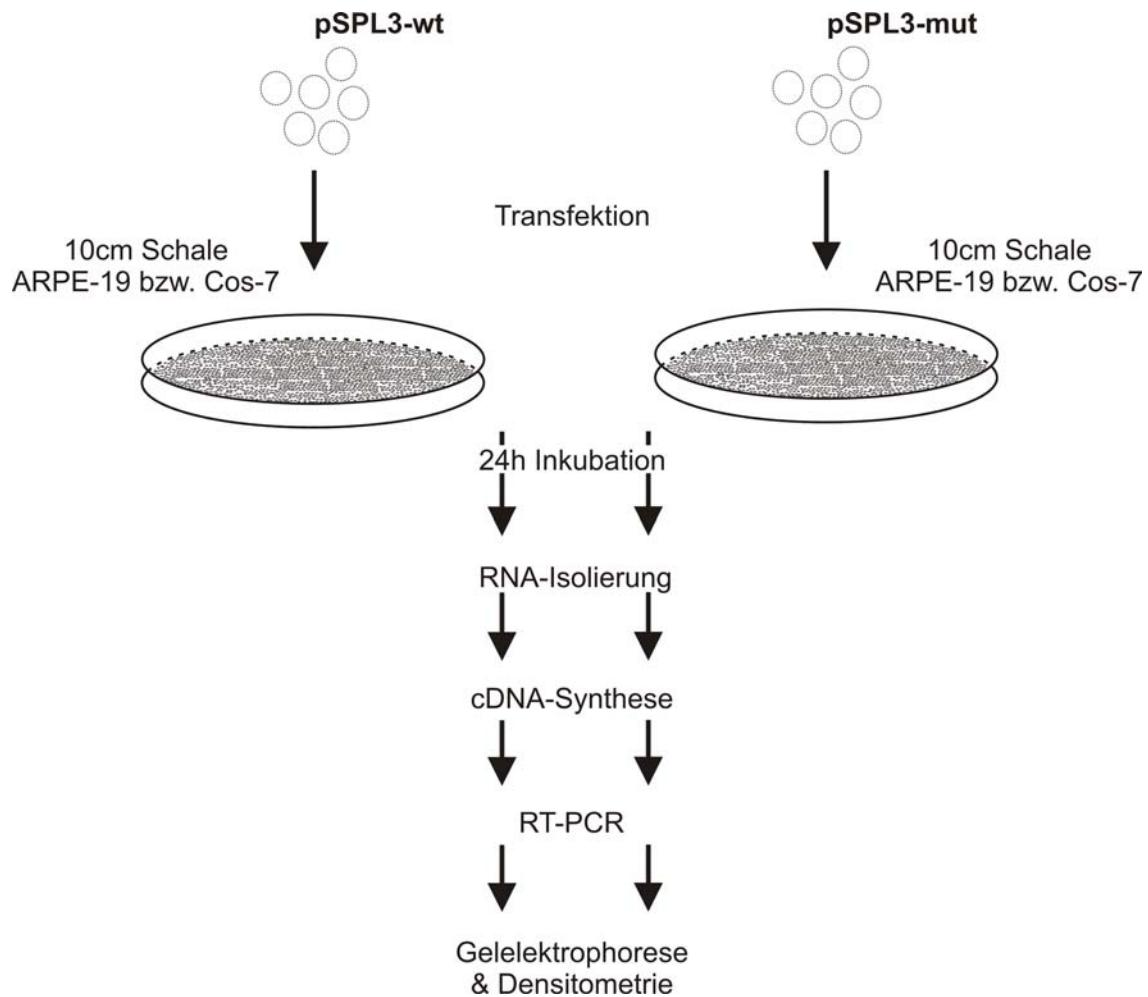


Abbildung 44

#### Analyseablauf Exontrapping:

pSPL3-wt und pSPL3-mut Vektoren wurden in auf 10cm Zellkulturschalen gezüchteten ARPE-19 bzw. Cos-7 Zellen transfiziert. Nach 24h Inkubation bei 37°C im Zellkulturinkubator erfolgte die Isolierung der RNA, gefolgt von der cDNA-Synthese und RT-PCR. Abschließend erfolgte die densiometrische Quantifizierung der RT-PCR-Produkte nach der Gelelektrophorese im Agarosegel.

Der Versuch wurde für die Zelllinien ARPE-19 und Cos-7 jeweils drei Mal unabhängig durchgeführt und die gewonnenen Daten in Excel und SigmaPlot bezüglich ihrer Mittelwerte, Standardabweichungen und Signifikanzen analysiert.

Da die Identifizierung von Insertionen und Deletionen von nur wenigen Nucleotiden auf mRNA Ebene, die durch die Mutationen im Exon 6 verursacht werden könnten, durch die zu geringe Auftrennung im 2%-Agarosegel nicht möglich ist, wurden die RT-PCR Produkte aus

dem Gel eluiert und bidirektional sequenziert. Bei keinem der analysierten RT-PCR Fragmenten konnte eine Abweichung in Form einer Insertion oder Deletion im Vergleich zu den wildtypischen Fragmenten detektiert werden (siehe Abb. 45).

#### RT-PCR & Spleißvarianten:

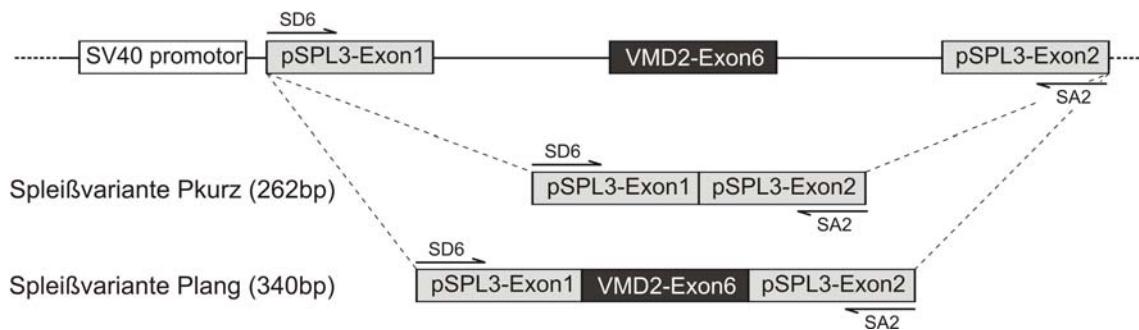


Abbildung 45

Schematische Übersicht des pSPL3\_VMD2\_Exon6 Vektors und möglicher Spleißvarianten: Entsprechend der Berücksichtigung an Spleißstellen entstehen während der Prozessierung der mRNA Transkripte zwei Varianten. Variante 1: Exon 6 wird herausgespleißt → Nachweis in der RT-PCR in Form des 262bp kurzen Amplifikates „Pkruz“, Variante 2: Exon 6 verbleibt in der prozessierten mRNA → Nachweis in der RT-PCR in Form des 340bp langen Amplifikates „Plang“. Die Position der RT-PCR Oligonukleotide SD6 und SA2 sind durch Pfeile gekennzeichnet.

Die elektrophoretische Auf trennung der RT-PCR amplifizierten Spleißvarianten aus den pSPL3 hVMD2 Exon6 transfizierten ARPE-19 und Cos-7 Zellen erfolgte in 2% Agarosegelen (siehe Abb. 46 & 47). Hierbei konnten für die Transfektionsansätze sowohl bei pSPL3 hVMD2 Exon6 wildtypisch als auch bei den diversen pSPL3 hVMD2 Exon6 Mutanten über die gleichmäßigen RT-PCR-Produkte mit 262bp (Pkruz) und 340bp (Plang) eine gleichmäßige Transfektionseffizienz gezeigt werden. Die Menge an 262bp kurzem RT-PCR-Amplifikat korrelierte mit den prozessierten mRNA Transkripten nach „Exonskipping“, also dem Herausspleißen von Exon 6, während das 340bp lange RT-PCR-Amplifikat mit dem normal prozessierten mRNA-Transkript korrelierte (ohne Herausspleißen von Exon 6). Als Negativkontrolle dienten Versuchsansätze mit untransfizierten ARPE-19 und Cos-7 Zellen, um Kontaminationen im gesamten Analyseablauf auszuschließen.

Zur Beurteilung, ob die Mutationen am Ende von Exon6 hVMD2 einen Einfluss auf das Spleißen haben, wurden die elektrophoretisch aufgetrennten RT-PCR-Produkte densiometrisch quantifiziert. In dieser relativen Quantifizierung wurden mittels der Software

„Totallab 100“ die Menge an RT-PCR Produkten der beiden Spleißvarianten Pkruz und Plang in den Graphikdateien der Agarosegelbilder ausgewertet. Die Zusammenfassung der drei, jeweils voneinander unabhängig durchgeführten Versuchsreihen wurde in den Programmen Excel und SigmaPlot berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 46 & 47).

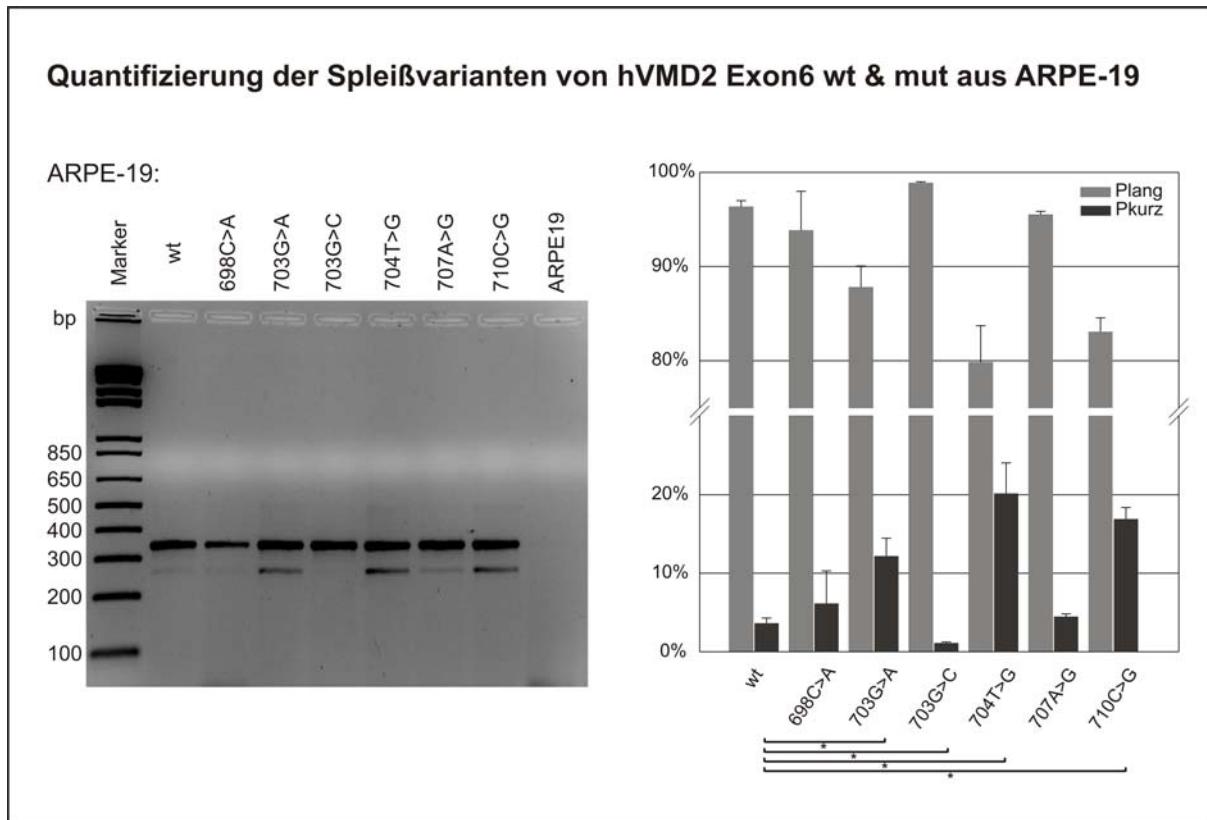


Abbildung 46

Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel mit RT-PCR-Produkten des Exontrapping Assays durchgeführt in ARPE-19 Zellen:

Auswertungsübersicht der densiometrischen Quantifizierung der mit den Spleißvarianten korrelierenden RT-PCR-Produkte. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegen wt wurde mit t-Test berechnet, wobei p-Werte <0,05 mit Sternen gekennzeichnet sind. Unterbrechung der Ordinate von 30-75%.

### Quantifizierung der Spleißvarianten von hVMD2 Exon6 wt & mut aus Cos-7

Cos-7:

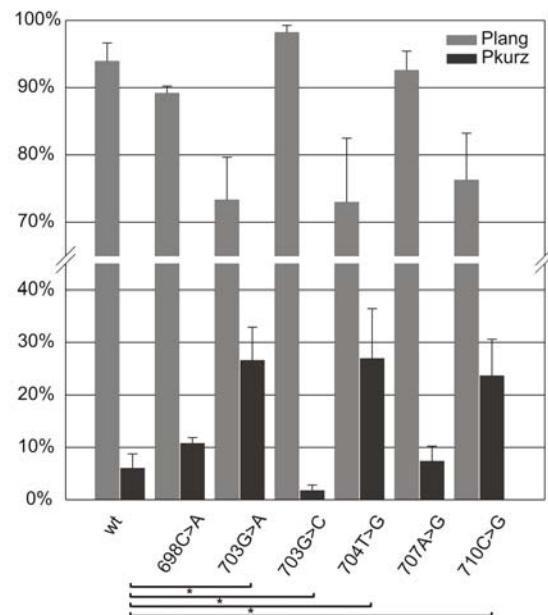
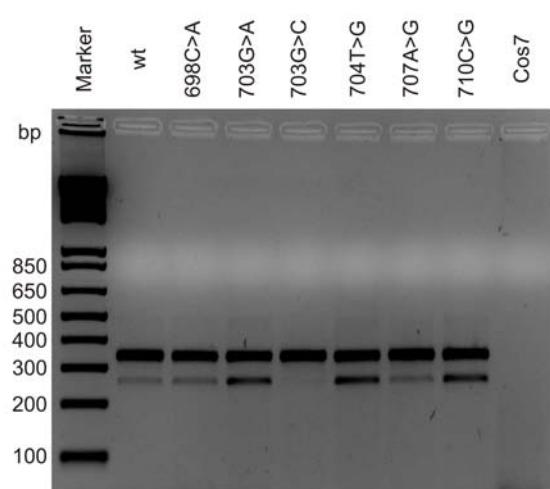


Abbildung 47

Ethidiumbromid gefärbtes 2% Agarosegel mit RT-PCR-Produkten des Exon-trapping Assays durchgeführt in Cos-7 Zellen:

Auswertungsübersicht der densiometrischen Quantifizierung der mit den Spleißvarianten korrelierenden RT-PCR-Produkte. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Signifikanz gegen wt wurde mit t-Test berechnet, wobei p-Werte <0,05 mit Sternen gekennzeichnet sind. Unterbrechung der Ordinate von 45-65%.

#### 4.3.4 Ergebnisse Exon-trapping

Die Auswertung zeigte, dass die relative Expression der kurzen Spleißvariante Pkurz abhängig von der jeweiligen Mutation konsistent zwischen 1 – 20% in ARPE-19 Zellen und 2-27% in Cos-7 Zellen variierte. Der Einfluss der Mutationen auf das Spleißen konnte in zwei Gruppen aufgeteilt werden. Zum einen Mutationen, die ähnlich wie auch die wildtypische Variante, zu einem relativen geringen Anteil an Pkurz Spleißvariante führten. Zum anderen die Mutationen, die zu einem im Vergleich zur wildtypischen Variante signifikant erhöhte Proportion an Pkurz Spleißvariante führten. Bei den Versuchen in APRE-19 Zellen gehören zu der ersten Gruppe neben dem Wildtyp (4%), die hVMD2 Exon 6 Mutationen 698C>A (6%), 703G>C (1%) und 707A>G (4%). Zur Gruppe mit erhöhten Anteilen an der Pkurz Spleißvariante zählten 703G>A (12%), 704T>G (20%) und 710C>G (17%). In Cos-7 Zellen durchgeführt zeigte sich eine identische Aufteilung in die zwei Gruppen mit wildtypisch

niedrigem Anteil an der Pkuz Spleißvariante und signifikant erhöhtem Anteil an der Pkuz Spleißvariante. Die Gruppe mit niedrigem Niveau an Pkuz: Wildtyp (6%), 698C>A (11%), 703G>C (2%) und 707A>G (7%), sowie die Gruppe mit erhöhtem Niveau an Pkuz: 703G>A (27%), 704T>G (27%) und 710C>G (24%).

Die statistische Signifikanz wurde mittels des t-Tests berechnet. Hierbei erwiesen sich die Analysen der Mutationen 703G>C, 703G>A, 704T>G und 710C>G in beiden Zelllinien als signifikant gegenüber dem Wildtyp wobei bei  $p<0,05$  als Schwelle definiert worden war. Im Detail p-Werte() t-Test zu Wildtyp in ARPE-19: 698C>A (0,342), 703G>C (0,018), 703G>A (0,025), 704T>G (0,016), 707A>G (0,227) und 710C>G (0,008). Im Detail p-Werte() t-Test zu Wildtyp in Cos-7: 698C>A (0,038), 703G>C (0,050), 703G>A (0,012), 704T>G (0,034), 707A>G (0,009) und 710C>G (0,019).

## 5. Diskussion

### 5.1 Dimerisierungsanalysen

#### 5.1.1 Grundlagen

Die autosomal dominante Erkrankung Morbus Best wird durch Mutationen im VMD2 Gen verursacht (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998). VMD2 kodiert für das integrale Membranprotein Bestrophin-1, dessen Funktion im RPE noch immer unvollständig verstanden ist. Zwei publizierte Arbeiten gaben starke Hinweise auf eine mögliche Oligomerisierung von Bestrophin-1. Dabei wurden durch Immunopräzipitationen von in eukaryotischer Zellkultur überexprimiertem Bestrophin-1 Proteinquartärstrukturen nachgewiesen, die aus 4-5 Bestrophin-1 Untereinheiten bestehen könnten (Sun et al. 2002). Zum anderen konnte mit Detergenzien solubilisiertem nativem Bestrophin-1 aus Schweineaugen Dimerformationen nachgewiesen werden (Stanton et al. 2006). Eine kontrovers diskutierte Funktion von Bestrophin 1 ist die eines  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Chloridkanals. Für gut charakterisierte Chloridkanäle wie beispielsweise die CLC-Chloridkanal-Familie konnten ebenfalls Dimerisierungen gezeigt werden (Jentsch et al. 2002; Weinreich et al. 2001). Ob Bestrophin-1 als potentieller Chloridkanal zur Dimerisierung überhaupt fähig ist, wurde im Rahmen dieser Arbeit detailliert untersucht. Insbesondere wurden die genauen molekularen Mechanismen sowie der Einfluss von Patienten-bezogenen Mutationen auf die Dimerisierung näher betrachtet. Hierzu wurden zwei unabhängige Methoden verwendet, ein *in vivo* ToxR-basierter Reporterassay und ein *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay mit rekombinant exprimierten Proteinen.

#### 5.1.2 Vorteile der ToxR basierten Dimerisierungsanalyse

Der ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsassay dient der Charakterisierung von Helix-Helix-Interaktionen von Transmembrandomänen. Ein Vorteil im Vergleich zu *in vitro* Analysen, wie z.B. Co-Immunopräzipitationen, ist hierbei, dass die Analysen in einem nativen Membransystem durchgeführt und über ein Reportergen quantifiziert werden können, wobei die native Faltung des Proteins und die natürliche Lokalisation durch Membranintegration bewahrt bleiben; unspezifische Bindungen werden somit reduziert. Grundlage dieses Assays ist die Expression von chimären Fusionsproteinen in der inneren *E. coli* Membran. Diese Fusionsproteine bestehen aus dem ToxR Transkriptionsfaktor von *Vibrio Cholerae*, der zu

charakterisierenden TMD und dem Maltosebindeprotein. Die Stärke der Interaktion der TMD-TMD führt durch die Aktivierung durch den dann ebenfalls dimerischen ToxR-Transkriptionsfaktor zu einer proportionalen Expression des ctx-Promotor kontrollierten Reportergens lacZ. Die Leistungsfähigkeit dieses Versuchsansatzes wurde bereits für Membranproteine unterschiedlicher Funktion wie z.B. Glycophorin A (GpA) (Brosig et al. 1998), ErbB Rezeptor (Mendrola et al. 2002) und verschiedener Integrine (Li et al. 2004) gezeigt.

### **5.1.3 ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsanalyse der TMD1-6 der humanen**

#### **Bestrophin-Proteinfamilie**

Basierend auf den Ergebnissen einer vorangegangen Dissertation (Milenkovic 2005) und einer daraus resultierenden Publikation (Milenkovic et al. 2007) wurden die TMD der vier Mitglieder der Bestrophin-Proteinfamilie entsprechend den Hydrophobizitätsvorhersagen für die Dimerisierungsanalysen ausgewählt. Die Auswertung der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalysen für die TMD1-6 von Bestrophin-1-4 offenbarte ein sehr ähnliches Muster. Insbesondere findet sich bei keinem der Bestrophine eine Dimerisierung für die TMD3 und TMD4, während TMD5 einheitlich eine Dimerisierung aufweist. Die beobachteten Messwerte liegen bei den Bestrophinen nur etwas unter denen der GpA Kontrollen, was auf eine relativ starke Helix-Helix-Interaktion der entsprechenden Bestrophin TMD hinweist. Die gemeinsamen phylogenetischen Wurzeln der Bestrophinproteine durch Genduplikationen (Milenkovic et al. 2008) und die sich daraus ergebende hohe Aminosäuresequenzkonservierung in den N-terminalen Primärsequenzen zwischen den Familienmitgliedern (Milenkovic et al. 2007), reflektiert sich ebenfalls in einem nahezu einheitlichen TMD Muster der Dimerisierungseigenschaften. Dies lässt vermuten, dass die humanen Bestrophine eine ähnliche, eventuell sogar identische Funktion besitzen. Zu beachten ist, dass Bestrophin-1 abweichend von den Bestrophinen-2-4 hohe Dimerisierungssignale für TMD2 und TMD6, aber nicht für TMD1 aufweist. Ob sich hierdurch eine divergente Funktion ableiten lässt bleibt abzuklären.

### **5.1.4 ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsanalyse der TMD1-6 Mutationen von Bestrophin-1**

Um zu klären, ob Bestrophin-1-Mutationen Einfluss auf die Dimerisierung der jeweiligen TMD nehmen, wurden alle bekannten Mutationen der öffentlichen VMD2 Datenbank ([http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2\\_database](http://www-huge.uni-regensburg.de/VMD2_database)) zum Zeitpunkt dieser Arbeit mit Stand 2006/07 entnommen und mit der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse untersucht. Bei 6 von 28 analysierten Mutationen wurden im Vergleich zu den wildtypischen TMD deutliche Unterschiede detektiert. Die Mutationen R47H (Kramer et al. 2003), I73N (Marchant et al. 2001), T91I (Lotery et al. 2000) und A195V (Boon et al. 2007) zeigten im Vergleich zu den wildtypischen TMD verstärkte Dimerisierung. Hingegen kommt es durch die Mutationen T237N und F281del (Lotery et al. 2000) zu verminderter Dimerisierung. Die ergänzende Analyse mit dem MalE-Komplementierungsassay zur Überprüfung der Membranintegration der Fusionsproteine zeigte für die Mutationen identische Eigenschaften zu den wildtypischen TMD, abgesehen von den Mutationen R47H und F281del. Während sich bei R47H die Membranintegration verbessert, zeigte sich bei F281del eine sehr stark verminderte Membranintegration. Ein identischer Effekt wurde bereits bei Integrationsuntersuchungen mit endoplasmatische Retikuli Membranen im sogenannten Lep System gezeigt (Nilsson et al. 1993) (Milenkovic et al. 2007). Veränderte Dimerisierungseigenschaften bzw. eine verminderte Membranintegration stellen somit für die oben aufgeführten Mutationen mögliche pathologische Mechanismen dar. Durch gestörte Quartärstrukturausbildung bzw. Misslokalisierung der Bestrophin-1-Dimere könnte folglich eine fehlende Funktion als z.B. Chloridkanal pathologische Folgen haben.

### **5.1.5 Analyse des putativen Dimerisierungsmotives in TMD2 von Bestrophin-1**

Milenkovic beschreibt in seiner Dissertation (Milenkovic 2006) ein potentielles Dimerisierungsmotiv in der TMD2 von Bestrophin-1, identifiziert über eine bioinformatische Suche. Dieses Motiv ähnelt dem gut charakterisierten Dimerisierungsmotiv von Glycophorin A.

Motiv in Glycophorin A:  $^{75}\text{L}\text{IxxGxxxGxxxT}^{87}$

Motiv in Bestrophin-1 TMD2:  $^{75}\text{L}\text{IxxSxxxGxxxT}^{87}$

Für Glycophorin A konnte Homodimerisierung sowohl in Detergenzienlösung als auch durch ToxR-basierte und LexA-basierte Dimerisierungsanalysen nachgewiesen werden (Brosig et

al. 1998; Lemmon et al. 1992; Schneider et al. 2003). Essentiell für die Dimerisierung dieses Erythrozyten-Membranproteins ist eine Peptidsequenz in der TMD.

Zur Überprüfung des Dimerisierungsmotivs in Bestrophin-1 wurden die Mutationskonstrukte S79C, G83I und G83L der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse unterzogen. Hierbei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Dimerisierungsverhalten im Vergleich zu nicht-mutierter TMD2. Die kleinen Aminosäuren Glycin und Serin besitzen sehr ähnliche Eigenschaften, scheinen aber in Bestrophin-1 nicht essentiell an der Dimerisierung beteiligt zu sein. Im Kontext der möglichen Proteinfunktion von Bestrophin-1 als Kanalprotein, könnte diesem Proteinabschnitt aber eine Funktion als Ionen-Selektionsfilter zukommen (Qu et al. 2006; Qu et al. 2004). Nachdem die Bestrophine eine eigene Proteinfamilie mit sehr geringer Sequenzhomologie zu anderen Proteinen darstellen, bieten aktuell verfügbare *in silico* Analysen keine Hilfestellung zur weiteren Charakterisierung von Bestrophin Dimerisierungsmotiven. Um eventuell vorhandene Dimerisierungsmotive in den TMD von Bestrophin-1-4 zu identifizieren, könnten umfassende Rasteranalysen mittels Mutationskonstrukten im ToxR-basierten Dimerisierungsassay angedacht werden.

### **5.1.6 Rückschlüsse auf die Topologie der Bestrophin-Proteinfamilie**

Zur Überprüfung der Membranintegration der Fusionsproteine in die innere *E. coli* Membran wurden die ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalysen mit dem MalE-Komplementierungsassay gekoppelt. Insbesondere die Ergebnisse für die F281del Mutation, die eine Integration von Bestrophin-1 in die Membran verhindert bzw. sehr stark reduziert, sind konsistent mit dem Befund der Charakterisierung der Mutation mit Hilfe des Lep Systems (Milenkovic et al. 2007). Die Befunde des MalE-Komplementierungsassay können zu Topologievorhersagen beitragen. Die bisher publizierten Ergebnisse konnten die Topologie von Bestrophin-1 noch nicht abschließend klären. Die Topologie wurde hierbei abgeleitet über die Analyse von Glykosylierungsstellen und TEV Proteaseschnittstellen (Tsunenari et al. 2003), sowie Integrationsstudien von *in vitro* translatierten Bestrophin-1 TMD-Sequenzabschnitten in die Membran von Mikrosomen (Milenkovic et al. 2007). Speziell die Frage, ob die TMD 4, 5, oder 6 membrandurchspannend sind, konnte nicht geklärt werden. Die hier durchgeführte Membranintegration der Fusionsproteine in die innere *E. coli* Membran mittels des ToxR Assays unterstützt das Topologiemodell mit 4 membrandurchspannenden TMD. Sowohl für Bestrophin-1 als auch für die restlichen Proteinfamilienmitgliedern konnte für TMD1 & TMD2 und TMD5 & TMD6, aber nicht für

TMD 3 & TMD4 Membranintegration gezeigt werden. Das hier beschriebene 4 TMD-Modell wird auch von Marmorstein und Kollegen favorisiert (Marmorstein et al. 2009).

### **5.1.7 Zusammenfassung und Limitierungen der ToxR-basierten *in vivo***

#### **Dimerisierungsanalyse**

Die Ergebnisse der ToxR-basierten Dimerisierungsanalyse und des ergänzenden MalE-Komplementierungsassays lassen sich hinsichtlich der Dimerisierung und der Topologie der Bestrophin-Proteinfamilie wie folgt zusammenfassen:

- Alle Bestrophin-Proteinfamilienmitglieder zeigen in mindestens 3 von 6 TMD Dimerisierungspotential.
- Alle Mitglieder der Bestrophinfamilie dimerisieren nach einem einheitlichen charakteristischen Muster mit leichten Abweichungen bei Bestrophin-1.
- Von 28 untersuchten Mutationen zeigen mindestens 6 signifikant abweichende Dimerisierungseigenschaften im Vergleich zu den wildtypischen TMD.
- Bei den Mutationen R47H und F281del lassen sich die abweichenden Dimerisierungseigenschaften auf veränderte Membranintegration zurückführen. Ein Befund der sich mit den Untersuchungen von Milenkovic et al. deckt.
- Das für Bestrophin-1 *in silico* vorhergesagte Dimerisierungsmotiv in TMD2 lässt sich durch Mutagenese-Untersuchungen nicht bestätigen. Hierauf aufbauend könnte das putative Dimerisierungsmotiv durch simultanes Einfügen mehrerer Mutationen zusätzlich charakterisiert werden.
- Die Befunde des MalE-Komplementierungsassay unterstützen das Topologiemodell mit 4 membrandurchspannenden TMD einheitlich für die Bestrophine 1-4.

Auch wenn der ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsassay und der MalE-Komplementierungsassay elegante Möglichkeiten bieten, TMD Helix-Helix-Interaktionen in einer nativen Membranumgebung zu untersuchen, sind diese Methoden mit einigen Nachteilen behaftet und die Folgerungen unbedingt kritisch zu bewerten:

- Die physiologischen Eigenschaften von Membranen werden stark durch ihre Zusammensetzung beeinflusst. Durch Unterschiede in der Zusammensetzung der Membranen (z.B. Steroide, Phospholipide, usw) bei Eukaryoten und Prokaryoten ist

die Untersuchung der eukaryotischen Bestrophine in dem prokaryotischen Analysesystem nur bedingt aussagekräftig.

- Es wurden isolierte TMD und nicht die vollständigen Bestrophin Proteine analysiert. Die verwendeten Fusionsproteine sind mit ihren chimären ToxR- und MBP-Anteilen artifiziell und in einem Überexpressionssystem eingesetzt worden.
- Die Auswahl der TMD-Sequenzabschnitte erfolgte auf *in silico* Hydrophobizitätsvorhersagen, wobei zur Vereinfachung 21 AS lange Sequenzen gewählt wurden. Längenvarianzen blieben unberücksichtigt (Langosch et al. 1996).
- Bedingt durch die Restriktionsstellen für die Klonierungen finden sich zwischen den chimären Teilen der Fusionsproteine zusätzliche AS (Alanin+Serin+TMD\_+Glycin+Isoleucin) mit potentieller Auswirkung auf die Dimerisierung.
- Für die Bestrophine sind deren endogenen subzellulären Lokalisationen ungeklärt. Hierdurch bleiben evtl. Einflüsse von spezifischen Zellkompartimenteigenschaften (z.B. pH-Wert) unberücksichtigt.
- Es können nur Homodimerisierung zwischen identischen TMD und keine potentiellen Heterodimerisierungen analysiert werden.

### **5.1.8 Vorteile des *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsansatzes**

Zusätzlich zur ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse wurde für Bestrophin-1 eine *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsanalyse durchgeführt. Diese Technik wurde bereits zur Charakterisierung der Dimerisierungseigenschaften diverser Proteine verwendet wie Glycophorin A (Fisher et al. 2003; Lemmon et al. 1992), BNIP3 (Sulistijo et al. 2006) und CCK4 (Kobus et al. 2005). Grundlage dieses Assays ist die Analyse von in *E. coli* rekombinant exprimierten Fusionsproteinen, die nach Aufreinigung über Affinitätschromatographie und Renaturierung im Dialyseverfahren in Detergenzien-Mizellen Lösung inkubiert und mittels SDS-Page bezüglich ihrer Dimerbildung untersucht werden.

### **5.1.9 *In vitro* Dimerisierung von TMD1-6 von Bestrophin-1**

Wie bei den vorangegangenen Analysen wurden die Sequenzabschnitte der TMD von Bestrophin-1 untersucht. Zusätzlich wurde die Integrität des Versuchs mit den Kontrollen

PsbF wildtypisch, P28G und G34I überprüft. Die hierbei detektierten Variationen der Dimerisierungseigenschaften sind konsistent mit den Literaturwerten (Prodohl et al. 2007).

Von den 6 *in vitro* untersuchten Bestrophin-1 TMD konnte für TMD1 und TMD5 eine starke Helix-Helix-Interaktion gezeigt werden.

### **5.1.10 *In vitro* Dimerisierung der TMD1 und TMD5 Mutationen von Bestrophin-1**

Für die Dimerisierung positiv identifizierte TMD1 und TMD5 wurden auf 9 krankheitskorrelierte Mutationen untersucht. Während die Mutationen in TMD5 unauffällig blieben, zeigten sich in TMD1 bei zwei Mutationen Abweichungen. Die Mutation L41P, wobei die basische AS Leucin gegen die neutrale AS Prolin wechselt, reduzierte die Dimerbildung. Dies könnte durch die alpha-helikal unterbrechende Eigenschaft von Prolin verursacht sein, d.h. durch Störung der nativen Sekundärstruktur von TMD1. Die Mutation R47H, wobei die schwach basische AS Arginin gegen die stark basische AS Histidin wechselt, führte zu einer stark erhöhten Dimerbildung; ein Befund, der sich auch mit den Ergebnissen der ToxR-basierten *in vivo* Dimerisierungsanalyse deckt. Teilweise Unterschiede im Dimerisierungsverhalten zwischen biologischen Membran-basierten *in vivo* Analysen und *in vitro* Detergenzien-Mizellen basierten Untersuchen finden sich nicht nur bei Bestrophin-1. Auch bei PsbF kann dieser Effekt beobachtet werden und ist auf die unterschiedlichen Eigenschaften von biologischen Membranen und Detergenzien zurückzuführen. Grundsätzlich lassen Detergenzien flexiblere TMD Anordnungen zu als Lipiddoppelschichten. Insbesondere das verwendete Detergenz SDS kann sowohl TMD stabilisieren als auch über Bindung an stark geladenen AS die Helix-Helix-Interaktion stören (Prodohl et al. 2007).

### **5.1.11 Zusammenfassung und Limitierungen der *in vitro* Detergenzien-Mizellen**

#### **Dimerisierungsanalyse**

Die Ergebnisse des *in vitro* Detergenzien-Mizellen Tests lassen sich hinsichtlich der Dimerisierung von Bestrophin-1 wie folgt zusammenfassen:

- 2 der 6 TMD von Bestrophin-1 zeigen starke Dimerbildung.
- Die Mutation L41P führt zu verminderter Dimerisierung, eventuell verursacht durch Störungen bei der Bildung der alpha-helikalen Sekundärstruktur.

- Die Mutation R47H verstärkt die Dimerisierung, was konsistent mit den Daten der *in vivo* Analysen ist.
- Diskrepanzen zwischen den *in vitro* und den *in vivo* Untersuchung lassen sich durch die unterschiedlichen Eigenschaften von Detergenzien und biologischen Membranen erklären.

Wie auch der ToxR-basierte *in vivo* Dimerisierungsassay unterliegt der *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay konzeptionellen Limitierungen, wodurch die Ergebnisse differenziert diskutiert werden sollten:

- Es wurden einzelne TMD und nicht die vollständigen Bestrophin Proteine analysiert. Die verwendeten Fusionsproteine sind mit ihren chimären MBP-Anteil und His<sub>6</sub>-Tag artifiziell.
- Expression der eukaryotischen Sequenzen erfolgte in einem prokaryotischen Überexpressionssystem.
- Bedingt durch die Restriktionsstellen für die Klonierungen finden sich zwischen den chimären Teilen der Fusionsproteine zusätzliche AS (Isoleucin+Serin+TMD\_+Stop) mit potentieller Auswirkung auf die Dimerisierung.
- Für die Bestrophine ist die endogene subzelluläre Lokalisierung ungeklärt, hierdurch bleiben evtl. spezifische Zellkompartimenteigenschaften (z.B. pH-Wert) unberücksichtigt.
- Es konnten nur Homodimerisierungen zwischen identischen TMD und keine potentielle Heterodimerisierung analysiert werden.
- Die physiologischen Eigenschaften von biologischen Membranen und Detergenzien weisen teilweise Unterschiede auf.

## **5.2 Charakterisierung des humanen VMD2 Promoters**

### **5.2.1 Grundlagen**

Trotz der Entdeckung vor bereits über 12 Jahren, dass Mutationen im VMD2 Gen die autosomal dominante Erkrankung Morbus Best bedingen (Marquardt et al. 1998; Petrukhin et al. 1998), konnten die zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen bisher nur unzureichend geklärt werden. Die meisten der mehr als 100 bekannten Mutationen führen im Genprodukt von VMD2, dem Bestrophin-1 Protein, zu einem Aminosäureaustausch. Bestrophin wird überwiegend im RPE exprimiert (Marquardt et al. 1998) und konnte dort über histologische Färbungen im Bereich der basolateralen Plasmamembran lokalisiert werden (Bakall et al. 2003; Marmorstein et al. 2000). Die bisherigen Hypothesen schreiben Bestrophin-1 entweder eine Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Chloridkanal (Fischmeister et al. 2005; Qu et al. 2004; Qu et al. 2003; Sun et al. 2002; Tsunenari et al. 2006; Tsunenari et al. 2003), oder die Funktion eines Regulators der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in RPE-Zellen zu (Boudes et al. 2009; Marmorstein et al. 2006). Eine der größten Schwierigkeiten bei den Analysen der Proteinfunktion liegt in der sehr niedrigen endogenen Proteinexpression. Auch lassen sich primäre murine RPE-Zellen nur sehr unzureichend kultivieren, wodurch die direkte Analyse anhand von krankheitsrelevanten Mausmodellen wesentlich erschwert wird. Die Untersuchungen zur potentiellen Chloridkanalfunktion beruhen überwiegend auf heterologen Überexpressionsexperimenten und sind somit nur eingeschränkt aussagekräftig. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit, als unabhängiger Ansatz, eine Analyse des VMD2 Promoters durchgeführt, um ein besseres Verständnis der degenerativen Prozesse der Bestrophin assoziierten Erkrankungen zu erlangen. Wenn auch über Promotoranalysen nicht direkt die Proteinfunktion abgeleitet werden kann, so lässt sich hierüber zumindestens die Regulation des Gens analysieren und evtl. eine Einordnung in einen funktionellen Kontext vornehmen. In drei aufeinander aufbauenden Publikationen wurde der VMD2 Promotor bereits teilweise charakterisiert. Hierbei wurde der Bereich von -585 zu +38 (relativ zum Transkriptionsstartpunkt) mittels *in vitro* Luziferasereporterassays und *in vivo* mit transgenen Mäusen als ein wesentliches Promotorelement identifiziert. In diesem Bereich liegen zwei E-Box Transkriptionsfaktorbindestellen, die über Bindung von MITF, TFE3 und TFEB als positive Regulatoren des VMD2 Promoters fungieren (Esumi et al. 2007; Esumi et al. 2004). Darüber hinaus konnte *in vitro* mit ChiP- und EMSA-Experimenten gezeigt werden, dass an diesen proximalen Promotorbereich auch Transkriptionsfaktoren der OTX-Familie (OTX2 & CRX) binden und ebenfalls die Promotoraktivität erhöhen können (Esumi et al. 2009).

Während sich diese Arbeiten fast ausschließlich mit dem unmittelbar proximalen Promotorelement auseinandersetzen, lag der Fokus dieser Arbeit auf einer erweiterten Analyse, um auch weiter distal lokalisierte regulatorische Elemente zu berücksichtigen.

### **5.2.2 Bioinformatische Vorhersage von evolutionär konservierten Regionen und Promotoren**

Die Suche nach evolutionär konservierten Sequenzabschnitten im Bereich -5.000bp bis +2.000bp von VMD2 mittels komparativer Genomik (Ovcharenko et al. 2004) führte zur Identifizierung von 5 hochkonservierten Sequenzregionen (RE1-5). Zusätzlich wurde dieser 7kb lange Bereich mit einem Promotorvorhersageprogramm (PromoterInspector; Scherf et al. 2000) untersucht. Es wurden 3 potentielle Promotoren (P1-3) vorhergesagt, wovon der proximal gelegene P3 mit dem von Donald Zack und Kollegen postulierten Promotor im Bereich von -585 bis +38 übereinstimmt (Esumi et al. 2007; Esumi et al. 2004). Die beiden anderen Promotoren P1 (-4.471kb bis -3.870kb) und P2 (-1.027kb bis -426bp) sind bisher nicht beschrieben. Interessanter Weise sagen diese beiden unabhängigen bioinformatischen Methoden identische Sequenzbereiche für regulatorische Regionen vorher. Insbesondere stimmen RE1 & P1, RE4 & P2 sowie P3 & RE5 in ihren Sequenzabschnitten stark überein und besitzen mit hoher Wahrscheinlichkeit essentielle regulatorische Funktionen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals in *in vitro* Untersuchungen überprüft worden sind.

### **5.2.3 *In vitro* Analyse der evolutionär konservierten Regionen und der *in silico* vorhergesagten Promotoren**

Die über die komparative Genomikanalyse identifizierten RE1-5, sowie die bereits charakterisierten Promotorelemente Pmin1 und Pmin2, wurden mittels eines Luziferasebasierten Reportergenassays bezüglich ihrer potentiellen Promotoraktivität untersucht. Hierbei wurden bei der Analyse in ARPE-19 Zellen für Pmin1 vergleichbare Werte (relative Aktivität ca. 6-fach) gemessen wie in der Literatur beschrieben (Esumi et al. 2004). Zusätzlich konnte mit RE4 (-1.072 / -403) mit ca. 150-facher relativer Promotoraktivität ein sehr starkes regulatorisches Element identifiziert werden. Die Analyse eines RE4-Konstruktions mit inverser Orientierung (-403 / -1.072) zeigte nur noch 3,8 fache anstatt ~ 150-fache Aktivität. Somit ist davon auszugehen dass es sich bei RE4 um ein Promotorelement mit gerichteter Aktivität handelt, während ein Enhancerelement sowohl in 5'- als auch 3'-Richtung aktiv ist. Das neue Promotorelement RE4 wurde im Folgenden feinkartiert, indem

schrittweise der Sequenzbereich von 5'- und 3'-Richtung verkürzt wurden. Hierbei konnte der Kernbereich auf -762 bis -403 bei einer ca. 194-fachen relativen Aktivität eingegrenzt werden. Somit ist davon auszugehen, dass dieser 360bp langen Sequenzabschnitt essentielle und am stärksten positiv regulierenden TSF-Bindestellen enthält. In dem hier beschrieben neuen Promotorelement (-762 bis -403) finden sich 5 Zirbeldrüsen-spezifische TSF-Bindestellen der Familie der „cAMP-responsive element binding proteins“. Unter der hypothetischen Annahme, dass Bestrophin-1 eine Rolle bei der zirkadian kontrollierten Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente spielen könnte, kann auch über einen zirkadianen Rhythmus der Bestrophin-1 Expression spekuliert werden. Die in dieser Arbeit identifizierten Zirbeldrüsen-spezifischen TSF-Bindestellen im neuen Promotorelement (-762 bis -403) könnten als Grundlage für weitergehende Analysen für diese Fragestellung dienen. Während die Zirbeldrüse diverse augenspezifischen Genen wie z.B. RS1 (Takada et al. 2006) exprimiert, wird auch das Zirbeldrüsen-spezifische Gen CRX (cone-rod homeobox protein) im Auge exprimiert (Furukawa et al. 1997; Furukawa et al. 1999). Der proximale VMD2 Promotor wird u.a. durch CRX kontrolliert und CRX Expression konnte zudem in humanen und bovinen RPE-Zellen nachgewiesen werden (Esumi et al. 2009). Als ein neuer experimenteller Ansatzpunkt könnten Tiermodell-basierte Expressionsstudien von RPE-Zellen / Augen, zu verschiedenen Zeitpunkten des Tag-Nacht-Rhythmus, Informationen zur potentiellen zirkadianen Regulierung von Bestrophin-1 und weiteren an der Phagozytose der äußeren Photorezeptorsegmente beteiligten Gene liefern.

#### **5.2.4 Einfluss von SNPs auf die VMD2 Promotoraktivität**

SNPs sind nach Abschluss des Humangenomprojektes in das Zentrum der genetischen Grundlagenforschung gerückt. Es wird geschätzt, dass im menschlichen Genom über 1 Million SNPs im Bereich von Exonen, Introns und Promotoren enthalten sind (Brookes 1999; Collins et al. 1998). Inzwischen konnten diverse Studien den Einfluss von SNPs auf Proteine (Henikoff et al. 2003), sowie auf die mRNA Stabilität durch Nonsense-Mutationen verursachten mRNA-Abbau (Han et al. 2007) und auf Spleißstellen in Form von alternativem Spleißen (ElSharawy et al. 2006) zeigen.

Bei Augenerkrankungen ist beispielsweise ein SNP im Promotorbereich des HtrA1 Gens möglicherweise mit einem erhöhten Risiko zur altersbedingten Makuladegeneration (AMD) korreliert (Dewan et al. 2006; Yang et al. 2006). In einer Arbeitsgruppe des Instituts für

Humangenetik Regensburg konnten SNPs im Apolipoprotein E -Promotor in Kombination mit Protein-Isoformen als Risikofaktor für die AMD definiert werden (Fritsche et al. 2009).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob auch SNPs einen Einfluss auf die VMD2 Promotoraktivität haben könnten. Mit einer SNP-Datenbankabfrage wurden die hochfrequenten SNPs rs3758976 und rs972355 identifiziert. Beide SNPs sind in dem zuvor beschrieben höchst aktiven Promotorelement (-762 bis -403) lokalisiert. Die 4 möglichen Allelkombinationen der beiden SNPs wurden im -762 bis -403 Sequenzabschnitt bezüglich ihres Einflusses auf die Promotoraktivität untersucht. Die Allelkombination rs3758976: „C“ und rs972355: „G“ wies in der Luziferase-basierten *in vitro* Analyse im Vergleich zu den anderen 3 Varianten eine erhöhte Promotoraktivität auf. Über eine *in silico* Analyse der allel spezifischen Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich der beiden SNPs konnten Variationen in der Bindungsvorhersage gezeigt werden. SNP-bedingte Änderungen in den essentiellen Transkriptionsfaktorbindemotiven (Core-Bereich) betreffen die TSF (KLF15 und IA-I am SNP rs3758976, sowie Winged Helix Protein und Sterol Regulatory Element Binding Protein am SNP rs375897). Mittels EMSA wurden die Sequenzabschnitte an den beiden SNPs rs3758976 und rs972355 auf allel spezifische Transkriptionsfaktorbindemuster mit ARPE-19 Kernproteinextrakten untersucht. An beiden SNPs konnten für die Allele variable Transkriptionsfaktorbinde eigenschaften nachgewiesen werden, eventuell verursacht durch die zuvor bioinformatisch identifizierten TSF.

Die *in vitro* gezeigten allel spezifischen Variationen der Transkriptionsfaktorbinde eigenschaften und die damit korrelierten Abweichungen in der VMD2 Promotoraktivität bieten eine mögliche Erklärung für die sehr variablen Phänotypen bei Bestrophin-Retinopathien. In diversen Publikationen wurden bei Patienten mit VMD2 Mutationen stark schwankende Manifestationswahrscheinlichkeit und Expressivität beschrieben. Sogar innerhalb einzelner Familien mit identischer Mutation im VMD2 Gen zeigen sich bei Patienten oft sehr variable Phänotypen (Boon et al. 2007; Maloney et al. 1977; Ponjavic et al. 1999). In manchen Fällen finden sich bei Mutationsträgern kein pathologisch veränderter Augenhintergrund und teilweise ist auch die Elektrookulographie (EOG) unauffällig (Pollack et al. 2005; Wabbels et al. 2006). In diesem Kontext könnte man auch die VMD2 assoziierten AVMD (Adult Vitelliform Macular Dystrophy dito) Patienten, die typischerweise eine verzögerte Manifestation der Erkrankung haben, auch als Morbus Best Patienten mit variablem Phänotyp interpretieren. Ein mögliches Modell zu den variablen Phänotypen wäre die Verschiebung des Expressionsverhältnisses von wildtypischen zu mutanten VMD2

Transkripten in Abhängigkeit der identifizierten, oder bisher unbekannter SNPs im VMD2 Promotorbereich.

### **5.2.5 Zusammenfassung und Limitierungen der *in vitro* VMD2 Promotoranalyse**

Die Ergebnisse der VMD2 Promotoranalyse im Bereich -5.000bp bis +2.000bp um den Transkriptionsstartpunkt lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- *In silico* Analysen identifizieren innerhalb der Säugetiergruppe 5 hochkonservierte Sequenzabschnitte und 3 potentielle Promotoren.
- *In vitro* zeigt der Sequenzbereich -1072 bis -403 sehr starke Promotoraktivität. Eine Enhancer-Funktion dieses Elementes kann ausgeschlossen werden.
- Das neu identifizierte maximal aktive Promotorelement kann auf dem Bereich -762 bis -403 eingegrenzt werden.
- Zirbeldrüsen-spezifische Transkriptionsfaktorbindestellen im Bereich von -762 bis -403 und -154 bis +38 geben Hinweise auf eine zirkadiane Regulation der Bestrophin-1 Expression.
- Die im Promotorelement -762 bis -403 lokalisierten SNPs rs3758976 und rs972355 bedingen *in vitro* allelenspezifische Transkriptionsfaktorbinde-eigenschaften und variable Promotoraktivität.

Die Aussagekraft der hier diskutierten VMD2 Promotoranalyse ist relativiert zu betrachten, da sie ausschließlich auf *in silico* Vorhersagen und *in vitro* Experimenten basiert. Zur Absicherung der allelenspezifischen Promotoraktivität im Luziferaseassay, wäre eine Normalisierung der Messwerte durch Co-Transfektion mit einem Reportergen hilfreich. Erweiterte *in vitro* Analysen, wie z.B. andere Zelllinien für die Luziferase-basierten Untersuchungen und für die EMSA Experimente, könnten zu einem besseren Verständnis der VMD2 Promotorfunktion dienen. Auch *in vivo* Versuchsansätze, wie transgene Mäuse mit einem Reportergen unter Kontrolle des neu definierten Promotorelements, stellen eine chancenreiche Ergänzung dar.

## **5.3 Exontrapping: Mutation im Exon 6 des humanen VMD2 Gens – Auswirkungen auf das Spleißen**

### **5.3.1 Grundlagen**

Autosomal dominante Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC) wird bedingt durch Mutationen im VMD2 Gen (Yardley et al. 2004). Typischerweise weisen ADVIRC Patienten Netzhautdystrophien der Peripherie und ein pathologisch verändertes EOG auf. In einigen Fällen wurde auch eine Augenentwicklungsstörung, ein sogenannter Nanophthalmos beschrieben. Weitere klinische Befunde im Krankheitsverlauf sind die Zerstörung der Blut-Retina-Schranke sowie Neovaskularisierung (Blair et al. 1984; Goldberg et al. 1989). Funktionelle *in vitro* Untersuchungen weisen darauf hin, dass ADVIRC assoziierte Mutationen mit Störungen des Spleißvorgangs des VMD2 Transkriptes im Zusammenhang stehen (Yardley et al. 2004). Bei den anderen mit VMD2 Mutationen assoziierten Retinopathien hingegen wird die Ursache im Wesentlichen in Missensemutationen und dadurch bedingten Aminosäureaustauschen vermutet. In Zusammenarbeit mit Professor Gal (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden 6 VMD2-Mutationen definiert, basierend auf klinischen und molekularbiologischen Patientendaten. Diese Mutationen wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das Spleißen des VMD2 Transkriptes im Rahmen eines Nebenprojekts der vorliegenden Arbeit untersucht.

### **5.3.2 Einfluss von VMD2 Mutationen auf das Spleißverhalten in einer *in vitro* Analyse**

Zur Charakterisierung der Mutationen bezüglich ihres Einflusses auf das Speißenverhalten des VMD2 Transkriptes wurde ein sogenannter „Exontrapping Assay“ verwendet. Hierzu wurde das betroffene Exon mit der Mutation inklusive der flankierenden Introne in ein Expressionsplasmid zwischen zwei endogenen Exonen kloniert. Nach transiente Transfektion in Cos-7 und ARPE-19 Zellen wurde die RNA isoliert und über RT-PCR das Verhältnis an Spleißisoformen quantifiziert. Die hier durchgeführte Analyse wies für 3 der 6 analysierten Mutationen signifikant verändertes Spleißen des Exon 6 des VMD2 Gens nach. Im Detail führen die Mutationen 703G>A, 704T>G und 710C>G im Vergleich zum wildtypischen Konstrukt zu einer erhöhten Rate an Transkripten ohne Exon 6 von VMD2. Dies wird verursacht durch Überspringen von Exon 6 während des Spleißprozesses, ein Mechanismus der auch als Exon-skipping bezeichnet wird. Interessanter Weise findet sich dieser Befund, sowohl bei den Untersuchungen mit den vom humanen retinalen Pigmentepithel abgeleiteten

ARPE-19 Zellen, als auch bei den grünen Meerkatzen Fibroblastenzellen Cos-7. Der zugrunde liegende Mutationseffekt ist somit spezies- und gewebeübergreifend und wahrscheinlich auf eine veränderte Bindung von Spleißfaktoren zurückzuführen. Welche funktionellen Auswirkungen die hier nachgewiesenen verkürzten Spleißvarianten im Kontext des Krankheitsbildes haben, bleibt offen. Insbesondere, ob es sich um Funktionsgewinnmutationen (gain-of-function) oder Funktionsverlustmutationen (loss-of-function) handelt, kann mit dem hier angewandten Versuchsansatz nicht geklärt werden. Um die mit ADVIRC assoziierten Augenentwicklungsstörungen zu untersuchen, wären transgene Tiermodelle hilfreich. Insbesondere Embryonalstudien an transgenen Tieren, da beispielsweise bei Mäusen VMD2 Expression bereits ab Tag E15 nachgewiesen wurde, bietet sich das Mausmodell für weitere Untersuchungen an (Bakall et al. 2003). Proteinstabilitätsstudien wie auch *in silico* Proteinstrukturvorhersagen der trunkierten Bestrophin-Proteine könnten zum besseren Verständnis beitragen. Nachdem mit den 6 Mutationen im Exon 6 bereits ein großer Anteil an möglichen Nukleotidaustauschen untersucht wurde, könnte mit der Analyse der restlichen Nukleotidpositionen eine sehr detaillierte Charakterisierung dieses Exon-Intron Übergangs abgeschlossen werden.

Als wesentliche Aufgabe sollte noch die Interpretation der Ergebnisse zusammen mit den klinischen Daten erfolgen, um mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen der hier untersuchten Mutationen mit ADVIRC und Morbus Best zu klären.

## 6. Zusammenfassung - Summary

### 6.1 Zusammenfassung

Vitteliforme Makuladystrophie Typ 2 (VMD2; OMIM #153700) ist eine autosomal dominante Erkrankung, die durch Mutationen im VMD2 Gen verursacht wird. Charakteristische Krankheitsmerkmale sind Eidotter-ähnliche Läsionen im Bereich der Makula, die eine Atrophie des retinalen Pigmentepithels (RPE) sowie der Netzhaut bedingen und im progredienten Krankheitsverlauf zum zentralen Visusverlust führen können. Das Genprodukt von VMD2, das Bestrophin-1 Protein, wird überwiegend im RPE exprimiert und definiert mit den paralogen Bestrophinen 2-4 die humane Bestrophinfamilie. Das integrale Membranprotein Bestrophin-1 fungiert wahrscheinlich als  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Chloridkanal oder als ein Regulator der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in RPE-Zellen. VMD2 Mutationen sind außerdem noch mit drei weiteren seltenen erblichen Augenerkrankungen assoziiert, der Adulten Vitteliformen Makuladystrophie (AVMD; OMIM #608161), der Autosomal Rezessiven Bestrophinopathie (ARB; OMIM #611809) und der Autosomal Dominanten Vitreoretinochoroidopathie (ADVIRC; OMIM #193220). Bei ADVIRC zeigt sich abweichend von den anderen Erkrankungen als klinisches Bild unter anderem Nanophtalmos, was über eine zusätzliche Funktion von Bestrophin-1 in der okulären Entwicklung spekulieren lässt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Aspekte der molekularen Wirkungsweise von Bestrophin-1 genauer charakterisiert, um die pathologischen Mechanismen von VMD2 assoziierten Erkrankungen besser verstehen zu können. Zu diesem Zweck wurden *in silico*-, *in vitro*- und *in vivo* Analysen zur Protein-Dimerisierung, der Expression und dem RNA Spleißen durchgeführt.

Mit Hilfe eines ToxR-basierten Dimerisierungsassays und eines MalE-basierten Membranintegrationsassays wurden die 6 putativen TMD der Bestrophine 1-4 bezüglich ihrer Dimerisierungseigenschaft und Membranintegration in einem biologischen Membransystem untersucht. Hierbei konnte bei allen Bestrophinen in drei von sechs TMD Regionen Dimerisierung nachgewiesen werden. Bis auf eine leichte Abweichung bei Bestrophin-1 findet sich innerhalb der Bestrophin-Proteinfamilie ein einheitliches Dimerisierungsmuster der beteiligte TMD. Zusätzlich wiesen 6 der 28 untersuchten Bestrophin-1 Mutationen ein signifikant verändertes Dimerisierungsverhalten im Vergleich zu den wildtypischen TMDen auf. Die ergänzenden Membranintegrationanalysen zeigten ein einheitliches Muster bei Bestrophin-1-4 und unterstützen somit das postulierte Topologiemodell, bei dem vier von

sechs TMD membrandurchspannend sind. Mit einem unabhängigen Versuchsansatz wurde die Bestrophin-1 TMD Dimerisierung mit rekombinant exprimierten Fusionsproteinen in einem *in vitro* Detergenzien-Mizellen Dimerisierungsassay analysiert. Auch hier konnte für Bestrophin 1 für TMD1 und TMD5 Homodimerisierung nachgewiesen werden. Zwei von neun analysierten pathologischen Mutationen zeigten *in vitro* abweichende Dimerisierungseigenschaften. Die partielle Divergenz zwischen *in vivo* und *in vitro* Befunden kann durch die unterschiedlichen Eigenschaften von Detergenzien und biologischen Membranen erklärt werden; ein Effekt, der bereits bei der Analyse anderer Proteine beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass mit zwei unabhängigen Versuchsansätzen ein Dimerisierungspotential der TMD der Bestrophinproteinfamilie nachgewiesen werden konnte. Für einen kleinen Teil der bekannten humanen Mutationen stellen veränderte Dimerisierungseigenschaften einen möglichen Pathomechanismus dar.

In weitergehenden Analysen konnte ein neues proximales, sehr starkes VMD2 Promotorelement identifiziert und charakterisiert werden. SNPs in diesem Bereich können die VMD2-Promotoraktivität beeinflussen und bieten eine mögliche Erklärung für die starke Variabilität in der Penetranz und im Phänotyp bei VMD2-Patienten. Zusätzlich wurden Hinweise für eine zirkadiane Regulierung des VMD2 Promoters gefunden.

Weitere pathologische VMD2-Mutationen konnten mit der Bildung von alternativen Transkripten durch Spleiß-Variation korreliert werden, die jetzt zusammen mit den klinischen Daten als Genotyp-Phänotyp Korrelationen bei ADVIRC zu diskutieren sind.

Auch wenn durch diese Arbeit die genaue Funktion von Bestrophin nicht vollständig aufgeklärt wurde, konnten vielfältige neue Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen erarbeitet werden, wobei insbesondere ausgewählten Tiermodellen zukünftig eine wesentliche Rolle zukommen sollte.

## 6.2 Summary

Best Vitelliform Macular Dystrophy (VMD2; OMIM #153700) is an autosomal dominant disease, caused by mutations in the VMD2 gene. Disease hallmarks are egg yolk-like deposits in the macular area and an atrophy of the retinal pigment epithelium (RPE) and retina. These traits are linked to a progressive course of the disease, ultimately leading to loss of central vision. VMD2 encodes Bestrophin-1, which is predominantly expressed in RPE cells. Bestrophin-1 together with its paralogues Bestrophin-2-4 defines the human Bestrophin protein family. Bestrophin-1 as an integral membrane protein possibly functions as  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent chloride channel or as a regulator of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in RPE cells. VMD2 mutations are linked to three additional rare genetic eye diseases. Adult-onset Vitelliform Macular Dystrophy (AVMD; OMIM #608161), Autosomal Recessive Bestrophinopathy (ARB; OMIM #611809) and Autosomal Dominant Vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC; OMIM #193220). ADVIRC presents with the diagnosis of nanophthalmos, a distinguished clinical feature when compared to the other bestrophinopathies, indicating an additional developmental functional aspect of Bestrophin-1.

In this thesis, several lines of experiments were pursued to elucidate the molecular mode of action of Bestrophin-1 and the pathologic mechanisms of VMD2-associated mutations. To this end, *in silico*-, *in vitro*- and *in vivo* experiments assessing protein dimerisation, gene expression and RNA splicing were conducted. Using a ToxR-based dimerization assay and a MalE-based membrane integration assay, all six transmembrane domains (TMDs) of each one of the Bestrophins 1 to 4 were investigated in a biological membrane system regarding their dimerization and membrane integration capabilities. In the Bestrophins, three out of six possible TMDs showed dimerization. Beside a minor difference in Bestrophin-1, a similar pattern was detected for all members of the human Bestrophin family. In addition, 6 out of 28 Bestrophin-1 mutations exhibited significant alterations in their dimerization characteristics compared to corresponding nonmutated TMDs. Supplemental membrane integration analysis showed a consistent pattern of integrating TMDs, highly supporting the topology model with 4 membrane spanning TMDs for the human Bestrophin protein family. In an alternative approach the dimerization properties of the six Bestrophin-1 TMDs were determined by analyzing the recombinantly expressed fusion proteins in an *in vitro* detergent micelles assay. Dimerization of Bestrophin-1 was likewise demonstrated by through TMD1 and TMD5. Within these TMDs two mutations out of nine revealed distinguished dimerization properties. The partial divergence between the results of the *in vivo* and *in vitro* analysis could be easily

explained by the varying properties of detergents and biological membranes, as seen before while analysing other proteins.

In summary, dimerization of members of the Bestrophin family TMDs has been shown by two independent experimental approaches. Altered dimerization properties caused by patient related mutations could be a pathological mechanism for a small number of mutations.

In additional experiments, a new, strong VMD2 promotor element was identified and characterized. SNPs in this genomic region can influence the VMD2 promotor activity and may be responsible for the distinct variability in penetrance and in phenotypes of VMD2 patients. Furthermore, hints on a circadian regulation of the VMD2 promotor were found.

Additional pathological VMD2 mutations were correlated with the generation of alternative splicing products, which might be discussed together with the clinical data regarding their genotype-phenotype associations in ADVIRC and Best's disease.

Although the function of Bestrophin-1 could not be fully unravelled during the course of this thesis, several novel lines of thoughts for future investigations were given. Especially animal model systems will most likely play an important role in the future.

## 7. Literaturverzeichnis

- Allikmets, R., J. M. Seddon, et al. (1999). "Evaluation of the Best disease gene in patients with age-related macular degeneration and other maculopathies." *Hum Genet* 104(6): 449-53.
- Bakall, B., L. Y. Marmorstein, et al. (2003). "Expression and localization of bestrophin during normal mouse development." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(8): 3622-8.
- Best, F. (1905). "Über eine hereditaere Maculaaffektion." *Z. Augenheilkunde* 13(13): 199-212.
- Birndorf, L. A. and W. W. Dawson (1973). "A normal electrooculogram in a patient with a typical vitelliform macular lesion." *Invest Ophthalmol* 12(11): 830-3.
- Blair, N. P., M. F. Goldberg, et al. (1984). "Autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC)." *Br J Ophthalmol* 68(1): 2-9.
- Boon, C. J., B. J. Klevering, et al. (2007). "Clinical and genetic heterogeneity in multifocal vitelliform dystrophy." *Arch Ophthalmol* 125(8): 1100-6.
- Boudes, M., C. Sar, et al. (2009). "Best1 is a gene regulated by nerve injury and required for Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current expression in axotomized sensory neurons." *J Neurosci* 29(32): 10063-71.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brookes, A. J. (1999). "The essence of SNPs." *Gene* 234(2): 177-86.
- Brosig, B. and D. Langosch (1998). "The dimerization motif of the glycophorin A transmembrane segment in membranes: importance of glycine residues." *Protein Sci* 7(4): 1052-6.
- Burgess, R., I. D. Millar, et al. (2008). "Biallelic mutation of BEST1 causes a distinct retinopathy in humans." *Am J Hum Genet* 82(1): 19-31.
- Cartharius, K., K. Frech, et al. (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." *Bioinformatics* 21(13): 2933-42.
- Collins, F. S., L. D. Brooks, et al. (1998). "A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation." *Genome Res* 8(12): 1229-31.
- Dewan, A., M. Liu, et al. (2006). "HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration." *Science* 314(5801): 989-92.

- Dreher, C., A. Prodohl, et al. (2007). "Heme binding properties of heterologously expressed spinach cytochrome b(6): implications for transmembrane b-type cytochrome formation." FEBS Lett 581(14): 2647-51.
- ElSharawy, A., C. Manaster, et al. (2006). "SNPSplicer: systematic analysis of SNP-dependent splicing in genotyped cDNAs." Hum Mutat 27(11): 1129-34.
- Esumi, N., S. Kachi, et al. (2007). "VMD2 promoter requires two proximal E-box sites for its activity in vivo and is regulated by the MITF-TFE family." J Biol Chem 282(3): 1838-50.
- Esumi, N., S. Kachi, et al. (2009). "BEST1 expression in the retinal pigment epithelium is modulated by OTX family members." Hum Mol Genet 18(1): 128-41.
- Esumi, N., Y. Oshima, et al. (2004). "Analysis of the VMD2 promoter and implication of E-box binding factors in its regulation." J Biol Chem 279(18): 19064-73.
- Felbor, U., H. Schilling, et al. (1997). "Adult vitelliform macular dystrophy is frequently associated with mutations in the peripherin/RDS gene." Hum Mutat 10(4): 301-9.
- Fischmeister, R. and H. C. Hartzell (2005). "Volume sensitivity of the bestrophin family of chloride channels." J Physiol 562(Pt 2): 477-91.
- Fisher, L. E., D. M. Engelman, et al. (2003). "Effect of detergents on the association of the glycophorin a transmembrane helix." Biophys J 85(5): 3097-105.
- Fisher, S. A., G. R. Abecasis, et al. (2005). "Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration." Hum Mol Genet 14(15): 2257-64.
- Frangieh, G. T., W. R. Green, et al. (1982). "Histopathologic study of nine branch retinal vein occlusions." Arch Ophthalmol 100(7): 1132-40.
- Fritzsche, L. G., S. Freitag-Wolf, et al. (2009). "Age-related macular degeneration and functional promoter and coding variants of the apolipoprotein E gene." Hum Mutat 30(7): 1048-53.
- Fritzsche, L. G., T. Loenhardt, et al. (2008). "Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA." Nat Genet 40(7): 892-6.
- Furukawa, T., E. M. Morrow, et al. (1997). "Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation." Cell 91(4): 531-41.
- Furukawa, T., E. M. Morrow, et al. (1999). "Retinopathy and attenuated circadian entrainment in Crx-deficient mice." Nat Genet 23(4): 466-70.
- Goldberg, M. F., F. L. Lee, et al. (1989). "Histopathologic study of autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy. Peripheral annular pigmentary dystrophy of the retina." Ophthalmology 96(12): 1736-46.

- Guziewicz, K. E., B. Zangerl, et al. (2007). "Bestrophin gene mutations cause canine multifocal retinopathy: a novel animal model for best disease." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48(5): 1959-67.
- Hageman, G. S., D. H. Anderson, et al. (2005). "A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(20): 7227-32.
- Hagen, A. R., R. D. Barabote, et al. (2005). "The bestrophin family of anion channels: identification of prokaryotic homologues." *Mol Membr Biol* 22(4): 291-302.
- Han, A., W. Y. Kim, et al. (2007). "SNP2NMD: a database of human single nucleotide polymorphisms causing nonsense-mediated mRNA decay." *Bioinformatics* 23(3): 397-9.
- Hartzell, H. C., Z. Qu, et al. (2008). "Molecular physiology of bestrophins: multifunctional membrane proteins linked to best disease and other retinopathies." *Physiol Rev* 88(2): 639-72.
- Henikoff, S. and L. Comai (2003). "Single-nucleotide mutations for plant functional genomics." *Annu Rev Plant Biol* 54: 375-401.
- Jentsch, T. J., V. Stein, et al. (2002). "Molecular structure and physiological function of chloride channels." *Physiol Rev* 82(2): 503-68.
- Kachi, S., N. Esumi, et al. (2006). "Sustained expression after nonviral ocular gene transfer using mammalian promoters." *Gene Ther* 13(9): 798-804.
- Klein, R. J., C. Zeiss, et al. (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." *Science* 308(5720): 385-9.
- Klein, R., T. Peto, et al. (2004). "The epidemiology of age-related macular degeneration." *Am J Ophthalmol* 137(3): 486-95.
- Kobus, F. J. and K. G. Fleming (2005). "The GxxxG-containing transmembrane domain of the CCK4 oncogene does not encode preferential self-interactions." *Biochemistry* 44(5): 1464-70.
- Kramer, F., N. Mohr, et al. (2003). "Ten novel mutations in VMD2 associated with Best macular dystrophy (BMD)." *Hum Mutat* 22(5): 418.
- Kramer, F., K. White, et al. (2000). "Mutations in the VMD2 gene are associated with juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best disease) and adult vitelliform macular dystrophy but not age-related macular degeneration." *Eur J Hum Genet* 8(4): 286-92.
- Kyte, J. and R. F. Doolittle (1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein." *J Mol Biol* 157(1): 105-32.

- Langosch, D., B. Brosig, et al. (1996). "Dimerisation of the glycophorin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator." *J Mol Biol* 263(4): 525-30.
- Le, Y. Z., W. Zheng, et al. (2008). "Inducible expression of cre recombinase in the retinal pigmented epithelium." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49(3): 1248-53.
- Lemmon, M. A., J. M. Flanagan, et al. (1992). "Glycophorin A dimerization is driven by specific interactions between transmembrane alpha-helices." *J Biol Chem* 267(11): 7683-9.
- Li, R., R. Gorelik, et al. (2004). "Dimerization of the transmembrane domain of Integrin alphaIIb subunit in cell membranes." *J Biol Chem* 279(25): 26666-73.
- Lotery, A. J., F. L. Munier, et al. (2000). "Allelic variation in the VMD2 gene in best disease and age-related macular degeneration." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 41(6): 1291-6.
- Maloney, W. F., D. M. Robertson, et al. (1977). "Hereditary vitelliform macular degeneration: variable fundus findings within a single pedigree." *Arch Ophthalmol* 95(6): 979-83.
- Marchant, D., K. Gogat, et al. (2001). "Identification of novel VMD2 gene mutations in patients with best vitelliform macular dystrophy." *Hum Mutat* 17(3): 235.
- Marmorstein, A. D., H. E. Cross, et al. (2009). "Functional roles of bestrophins in ocular epithelia." *Prog Retin Eye Res* 28(3): 206-26.
- Marmorstein, A. D., L. Y. Marmorstein, et al. (2000). "Bestrophin, the product of the Best vitelliform macular dystrophy gene (VMD2), localizes to the basolateral plasma membrane of the retinal pigment epithelium." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12758-63.
- Marmorstein, A. D., J. B. Stanton, et al. (2004). "A model of best vitelliform macular dystrophy in rats." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10): 3733-9.
- Marmorstein, L. Y., J. Wu, et al. (2006). "The light peak of the electroretinogram is dependent on voltage-gated calcium channels and antagonized by bestrophin (best-1)." *J Gen Physiol* 127(5): 577-89.
- Marquardt, A., H. Stohr, et al. (1998). "Mutations in a novel gene, VMD2, encoding a protein of unknown properties cause juvenile-onset vitelliform macular dystrophy (Best's disease)." *Hum Mol Genet* 7(9): 1517-25.
- Mendrola, J. M., M. B. Berger, et al. (2002). "The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes." *J Biol Chem* 277(7): 4704-12.
- Milenkovic, V. M. (2005). Structural and functional analysis of bestrophin. Institut fuer Humangenetik. Wuerzburg, Wuerzburg. PhD.
- Milenkovic, V. M., T. Langmann, et al. (2008). "Molecular evolution and functional divergence of the bestrophin protein family." *BMC Evol Biol* 8(1): 72.

- Milenkovic, V. M., A. Rivera, et al. (2007). "Insertion and topology of normal and mutant bestrophin-1 in the endoplasmic reticulum membrane." *J Biol Chem* 282(2): 1313-21.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Mullis, K., F. Faloona, et al. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Nilsson, I. M. and G. von Heijne (1993). "Determination of the distance between the oligosaccharyltransferase active site and the endoplasmic reticulum membrane." *J Biol Chem* 268(8): 5798-801.
- Oshima, Y., S. Oshima, et al. (2004). "Increased expression of VEGF in retinal pigmented epithelial cells is not sufficient to cause choroidal neovascularization." *J Cell Physiol* 201(3): 393-400.
- Ovcharenko, I., M. A. Nobrega, et al. (2004). "ECR Browser: a tool for visualizing and accessing data from comparisons of multiple vertebrate genomes." *Nucleic Acids Res* 32(Web Server issue): W280-6.
- Petrukhin, K., M. J. Koisti, et al. (1998). "Identification of the gene responsible for Best macular dystrophy." *Nat Genet* 19(3): 241-7.
- Pianta, M. J., T. S. Aleman, et al. (2003). "In vivo micropathology of Best macular dystrophy with optical coherence tomography." *Exp Eye Res* 76(2): 203-11.
- Pollack, K., F. R. Kreuz, et al. (2005). "[Best's disease with normal EOG. Case report of familial macular dystrophy]." *Ophthalmologe* 102(9): 891-4.
- Ponjavic, V., L. Eksandh, et al. (1999). "Clinical expression of Best's vitelliform macular dystrophy in Swedish families with mutations in the bestrophin gene." *Ophthalmic Genet* 20(4): 251-7.
- Prodohl, A., C. Dreher, et al. (2007). "Heterologous expression and in vitro assembly of the transmembrane cytochrome b6." *Protein Expr Purif* 56(2): 279-85.
- Prodohl, A., M. Weber, et al. (2007). "A mutational study of transmembrane helix-helix interactions." *Biochimie* 89(11): 1433-7.
- Qu, Z., L. T. Chien, et al. (2006). "The anion-selective pore of the bestrophins, a family of chloride channels associated with retinal degeneration." *J Neurosci* 26(20): 5411-9.
- Qu, Z., R. Fischmeister, et al. (2004). "Mouse bestrophin-2 is a bona fide Cl(-) channel: identification of a residue important in anion binding and conduction." *J Gen Physiol* 123(4): 327-40.
- Qu, Z. and C. Hartzell (2004). "Determinants of anion permeation in the second transmembrane domain of the mouse bestrophin-2 chloride channel." *J Gen Physiol* 124(4): 371-82.

- Qu, Z., R. W. Wei, et al. (2003). "Two bestrophins cloned from *Xenopus laevis* oocytes express Ca(2+)-activated Cl(-) currents." *J Biol Chem* 278(49): 49563-72.
- Quandt, K., K. Frech, et al. (1995). "MatInd and MatInspector: new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data." *Nucleic Acids Res* 23(23): 4878-84.
- Renner, A. B., H. Tillack, et al. (2004). "Morphology and functional characteristics in adult vitelliform macular dystrophy." *Retina* 24(6): 929-39.
- Rivera, A., S. A. Fisher, et al. (2005). "Hypothetical LOC387715 is a second major susceptibility gene for age-related macular degeneration, contributing independently of complement factor H to disease risk." *Hum Mol Genet* 14(21): 3227-36.
- Sambrook et al., 1989 : Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*" Sambrook, J.; Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (Hrsg.) 2. Auflage Cold Spring Harbor, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)
- Sanger, F., S. Nicklen, et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Sauer, C. G., A. Gehrig, et al. (1997). "Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis." *Nat Genet* 17(2): 164-70.
- Scherf, M., A. Klingenhoff, et al. (2000). "Highly specific localization of promoter regions in large genomic sequences by PromoterInspector: a novel context analysis approach." *J Mol Biol* 297(3): 599-606.
- Schneider, D. and D. M. Engelman (2003). "GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane." *J Biol Chem* 278(5): 3105-11.
- Scholl, H. P., M. Fleckenstein, et al. (2007). "An update on the genetics of age-related macular degeneration." *Mol Vis* 13: 196-205.
- Spalton David, H. R. u. H. P. (1996). *Atlas der Augenkrankheiten* Stuttgart, Thieme.
- Stanton, J. B., A. F. Goldberg, et al. (2006). "Hydrodynamic properties of porcine bestrophin-1 in Triton X-100." *Biochim Biophys Acta* 1758(2): 241-7.
- Stohr, H., A. Marquardt, et al. (2002). "Three novel human VMD2-like genes are members of the evolutionary highly conserved RFP-TM family." *Eur J Hum Genet* 10(4): 281-4.
- Stohr, H., V. Milenkovic, et al. (2005). "[VMD2 and its role in Best's disease and other retinopathies]." *Ophthalmologe* 102(2): 116-21.
- Strauss, O. and R. Rosenthal (2005). "[Function of bestrophin]." *Ophthalmologe* 102(2): 122-6.

- Sulistijo, E. S. and K. R. MacKenzie (2006). "Sequence dependence of BNIP3 transmembrane domain dimerization implicates side-chain hydrogen bonding and a tandem GxxxG motif in specific helix-helix interactions." *J Mol Biol* 364(5): 974-90.
- Sun, H., T. Tsunenari, et al. (2002). "The vitelliform macular dystrophy protein defines a new family of chloride channels." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6): 4008-13.
- Takada, Y., R. N. Fariss, et al. (2006). "Retinoschisin expression and localization in rodent and human pineal and consequences of mouse RS1 gene knockout." *Mol Vis* 12: 1108-16.
- Tsunenari, T., J. Nathans, et al. (2006). "Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> current from human bestrophin-4 in excised membrane patches." *J Gen Physiol* 127(6): 749-54.
- Tsunenari, T., H. Sun, et al. (2003). "Structure-function analysis of the bestrophin family of anion channels." *J Biol Chem* 278(42): 41114-25.
- von Heijne, G. (1992). "Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule." *J Mol Biol* 225(2): 487-94.
- Wabbel, B., M. N. Preising, et al. (2006). "Genotype-phenotype correlation and longitudinal course in ten families with Best vitelliform macular dystrophy." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 244(11): 1453-66.
- Wachtlin, U. K. u. J. (2008). *Retina: Diagnostik und Therapie der Erkrankungen des hinteren Augenabschnitts* Thieme, Stuttgart.
- Weber, B. H., G. Vogt, et al. (1994). "Sorsby's fundus dystrophy is genetically linked to chromosome 22q13-qter." *Nat Genet* 7(2): 158-61.
- Weinreich, F. and T. J. Jentsch (2001). "Pores formed by single subunits in mixed dimers of different CLC chloride channels." *J Biol Chem* 276(4): 2347-53.
- Yang, Z., N. J. Camp, et al. (2006). "A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration." *Science* 314(5801): 992-3.
- Yardley, J., B. P. Leroy, et al. (2004). "Mutations of VMD2 splicing regulators cause nanophthalmos and autosomal dominant vitreoretinochoroidopathy (ADVIRC)." *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45(10): 3683-9.

## 8. Anhang

### 8.1 Oligonukleotide (Primer)

#### 8.1.1 Oligonukleotide für ToxR Assay

Bestrophin-1:

ToxR-best1-TMD1-F	AGCTAGCTACAAGCTGCTATATGGCGAGTT
ToxR-best1-TMD1-R	TGGATCCAATAAAGCGGATGATGTAGTAGCA
ToxR-best1-TMD2-F	AGCTAGCAGCTACATCCAGCTCATCCCC
ToxR-best1-TMD2-R	TGGATCCGGTCACGACCAGCGTCAC
ToxR-best1-TMD3-F	AGCTAGCCGCTACGCCAACCTGGG
ToxR-best1-TMD3-R	TGGATCCCGCGCTTGTAGACTGCGGTG
ToxR-best1-TMD4-F	AGCTAGCATGTTCTGGGTGCCCTGG
ToxR-best1-TMD4-R	TGGATCCCTCGACCTCCAAGGCCACGC
ToxR-best1-TMD5-F	AGCTAGCATCCCCTGGGTATACACAGGTG
ToxR-best1-TMD5-R	TGGATCCCTAGACAAGTCAGGAAGAAGCTGTACAC
ToxR-best1-TMD6-F	AGCTAGCGACCTCGTTGTGCCGTCT
ToxR-best1-TMD6-R	TGGATCCCCACCTTCAGCCAGCCAACATA

Bestrophin-2:

ToxR-best2-TMD1-F	AGCTAGCTACAAACTCCTGTGGCGAGAG
ToxR-best2-TMD1-R	TGGATCCCGGCAGCACTCAGGCCAT
ToxR-best2-TMD2-F	AGCTAGCCAGTATGCCAGCCTCATCCC
ToxR-best2-TMD2-R	TGGATCCGTTCACCAACCAGCGTCACATA
ToxR-best2-TMD3-F	AGCTAGCCGCTACGCAGGGCTCTC
ToxR-best2-TMD3-R	TGGATCCCGCGCTTGAACACCGCG
ToxR-best2-TMD4-F	AGCTAGCAAGTACTGGGTGCCCTGC
ToxR-best2-TMD4-R	TGGATCCCGGGCCCTCGCGTCG
ToxR-best2-TMD5-F	AGCTAGCGTACCCCTCGTGTACACGCA
ToxR-best2-TMD5-R	TGGATCCCGAGGCAAGCCAGGAAGTAGC
ToxR-best2-TMD6-F	AGCTAGCGACCTGTGTGCCCATCTT
ToxR-best2-TMD6-R	TGGATCCCTACCTTGAGCCAGCCGG

Bestrophin-3:

ToxR-best3-TMD1-F	AGCTAGCTACAAACTACTGTACAGGAAATTAT
ToxR-best3-TMD1-R	TGGATCCCCACCAAACCTATTGCTGTATAAAGAA
ToxR-best3-TMD2-F	AGCTAGCAGATATGCTGAACAAATTCCAGTAAC
ToxR-best3-TMD2-R	TGGATCCGTTCACTACCAGAGTAACATAAAACCC
ToxR-best3-TMD3-F	AGCTAGCCGCTACGTCAATCTCACCTC
ToxR-best3-TMD3-R	TGGATCCCTCTTTGTACACAGCAGTGCTCA
ToxR-best3-TMD4-F	AGCTAGCAAATATTGGGTTCCATTCTACATCTG
ToxR-best3-TMD4-R	TGGATCCCTACCTTCATTCCGGGCT
ToxR-best3-TMD5-F	AGCTAGCATTCCGCTGGTTACACCC
ToxR-best3-TMD5-R	TGGATCCCCAGGCACGCACAGAAGAAG
ToxR-best3-TMD6-F	AGCTAGCGATCTTACATTCCCATCTTCACC
ToxR-best3-TMD6-R	TGGATCCCTACCTTAAGCCATCCTGCATAG

#### Bestrophin-4:

ToxR-best4-TMD1-F	AGCTAGCTACAAGCTCCTCTACAAGGAATTCTGGATCCCGGTGATGCTAAGCACAGCGT
ToxR-best4-TMD1-R	TGGATCCCGGTGATGCTAAGCACAGCGT
ToxR-best4-TMD2-F	AGCTAGCCGCTCAGCAGACCTCATTCC
ToxR-best4-TMD2-R	TGGATCCCGTTACACCAGAGAGTCACATAGAA
ToxR-best4-TMD3-F	AGCTAGCCGCTACGCGAACCTGGC
ToxR-best4-TMD3-R	TGGATCCCGCGCTTAAGCACGCAGG
ToxR-best4-TMD4-F	AGCTAGCAAGTACTGGGTCCCCTGCG
ToxR-best4-TMD4-R	TGGATCCCTCGCCCGTCCCTCCG
ToxR-best4-TMD5-F	AGCTAGCATCCCCCTCGTCTACACCC
ToxR-best4-TMD5-R	TGGATCCCCAGGGAGAGGGCAAAGAAAG
ToxR-best4-TMD6-F	AGCTAGCGACATGTACGTGCCTCTCACC
ToxR-best4-TMD6-R	TGGATCCCCACCTTGAGCCAGCCAGC

#### 8.1.2 Oligonukleotide für Detergenzien-Dimerisierungs-Assay

SDS_TMD1_hVMD2-F	GAAGGATTTCATACAAGCTGCTATATGGCGAGT
SDS_TMD1_hVMD2-R	AAGCTTTAAATAAAGCGGATGATGTAGTAGCA
SDS_TMD2_hVMD2-F	GAAGGATTTCAAGCTACATCCAGCTCATCC
SDS_TMD2_hVMD2-R	AAGCTTTAGGTACGACCAGCGTCAC
SDS_TMD3_hVMD2-F	GAAGGATTTACGCTACGCCAACCTGGG
SDS_TMD3_hVMD2-R	AAGCTTTAGCGCTTGTAGACTGCGGTG
SDS_TMD4_hVMD2-F	GAAGGATTTCAATGTTCTGGGTGCCCTGG
SDS_TMD4_hVMD2-R	AAGCTTTATCGACCTCCAAGCCACG
SDS_TMD5_hVMD2-F	GAAGGATTTCAATCCACTGGTGTATACACAGGTG
SDS_TMD5_hVMD2-R	AAGCTTTATAGACAAGTCAGGAAGAAGCTGTACA
SDS_TMD6_hVMD2-F	GAAGGATTTCAGACCTCGTTGTGCCCGTCT
SDS_TMD6_hVMD2-R	AAGCTTTACACCTTCAGCCAGCCAAC
SDS_Tyr29His-F	GAAGGATTTCACACAAGCTGCTATATGGCGAGTT
SDS_Lys30Arg-F	GAAGGATTTCATACAGGCTGCTATATGGCGAGTT
SDS_Arg47His-R	AAGCTTTAAATAAAGTGGATGATGTAGTAGCA
SDS_Val235Leu-F	GAAGGATTTCAATCCACTGCTGTATACACAGGTG
SDS_Val235Met-F	GAAGGATTTCAATCCACTGATGTATACACAGGTG
SDS_Thr237Arg-F	GAAGGATTTCAATCCACTGGTGTATAGACAGGTG
SDS_Thr241Asn-F	GAAGGATTTCAATCCACTGGTGTATACACAGGTGGTGAAT
SDS_AlA242ins-F	GAAGGATTTCAATCCACTGGTGTATACACAGGTGGTACTGCT
SDS_AlA243del-R	AAGCTTTATAGACAAGTCAGGAAGAAGCTGTACACCACAGT

#### 8.1.3 Oligonukleotide für Luziferase-Assay pGL4.10-Konstrukte

VMD2-RE1-F	GGTACCGCAAAATGAGCAGCTGGACT
VMD2-RE1-R	AAGCTTCCCAAAGTGCCTAGGATTGC
VMD2-RE2-F	GGTACCTAGGCCTTGCCATTCTGTGT
VMD2-RE2-R	AAGCTTCTCCCAAAGTGGTGGGATTA
VMD2-RE3-F	GGTACCGTAGGCATCGTTGTCCCATT
VMD2-RE3-R	AAGCTTGCCTTGCCTGCATTAGGTAT
VMD2-RE4-F	GGTACCCCTAAGGCCACAGACTCAG
VMD2-RE4-R	AAGCTTCTGTGGCTATGGAAAGAA
VMD2-RE5-R	AAGCTTCTGATGCACACCAAGCTCAT
VMD2-585-F	GGTACCAATTCTGTCATTTACTAGGGTGATGA

VMD2+38-R	AAGCTTGGTCTGGCGACTAGGCTGGT
VMD2-RE1-R2	AAGCTTCCTGGGTTCAAGTGATTCC
VMD2-RE4turn-F	AAGCTTCCCTAAGGCCACAGACTCAG
VMD2-RE4turn-R	GGTACCCCTGTGGCTATGGAAAGAA
VMD2-RE4-154bp-F	GGTACCAGACACCCACCCTCCAAC
VMD2-RE4-310bp-F	GGTACCAACTCCAGGGCTGTTCTGTC
VMD2-RE4-384bp-F	GGTACCTCTCTGAAGCAACTTACTGATGG
VMD2-RE4-48bp-R	AAGCTTGTTCCTGGTCCCAGCCTTGC
VMD2-RE4-134bp-R	AAGCTTAAGGATGGTGTGCTTGGGA
VMD2-RE4-209bp-R	AAGCTTATTGGCTGCTGGTGACATCA

#### 8.1.4 Oligonukleotide für EMSA

VMD2_21_rs3758976_C-F	GACTCACCCCCCTCCACCAGC
VMD2_21_rs3758976_C-R	GCTGGTGGAGGGGGGTGAGTC
VMD2_21_rs3758976_G-F	GACTCACCCCGCTCCACCAGC
VMD2_21_rs3758976_G-R	GCTGGTGGAGCGGGGTGAGTC
VMD2_21_rs972355_G-F	ACCTACCCGGGTCACACAC
VMD2_21_rs972355_G-R	GTGTGGTGACCCGGGTAGGT
VMD2_21_rs972355_C-F	ACCTACCCGGCGTCACACAC
VMD2_21_rs972355_C-R	GTGTGGTGACGCCGGTAGGT

#### 8.1.5 Oligonukleotide für Mutagenese Exontrapping-Assay

Exon6-F	GAATTCGACCATAGGTACCAAGGCCCTG
Exon6-R	GGATCCTAGGTGAGCCCTTCCCACC
710C>G Thr237Arg-F	TCCCACTGGTGTATAGACAGGTGAGGACTAG
710C>G Thr237Arg-R	CTAGTCCTCACCTGTCTATACACCAGTGGGA
707A>G Tyr236Cys-F	GTATCCACTGGTGTGTACACAGGTGAGGAC
707A>G Tyr236Cys-R	GTCCTCACCTGTGTACACACCAGTGGATAC
704T>G Val235Gly-F	TTAGTATCCCACTGGGTATACACAGGTGAG
704T>G Val235Gly-R	CTCACCTGTGTATACCCAGTGGATACTAA
703G>C Val235Leu-F	ATTAGTATCCCACTGCTGTATACACAGGTGA
703G>C Val235Leu-R	TCACCTGTGTATACAGCAGTGGATACTAAT
703G>A Val235Met-F	ATTAGTATCCCACTGATGTATACACAGGTGA
703G>A Val235Met-R	TCACCTGTGTATACATCAGTGGATACTAAT
698C>A Pro233Gln-F	ACTGGATTAGTATCCAACCTGGTGTATACACA
698C>A Pro233Gln-R	TGTGTATACACCAGTTGGATACTAATCCAGT

#### 8.1.6 Oligonukleotide für RT-PCR

SA2	ATCTCAGTGGTATTTGTGAGC
SD6	CTGAGTCACCTGGACAACC
SA4	CACCTGAGGAGTGAATTGGTCG
SD2	GAGTGAAC TGCACTGTGACAAGC

## **8.1.7 Oligonukleotide für Sequenzierung & Kolonie-PCR**

### **pGEM:**

M13-F	GTAAAACGACGGCCAG
M13-R	CAGGAAACAGCTATGAC

### **pGL4.10:**

pGL4.10-F	GGACAGGCCGCAATAAAATA
pGL4.10-R	CCGTCTCGAGTGGTAGAA

### **pRSET:**

pRSET-F	TAATACGACTCACTATAGGGAGACCAC
pRSET-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGGC

### **pMalc2x:**

pMal-c2x-F	AAGGTGAAATCATGCCAAC
pMal-c2x-R	CGCTTCTGCGTTCTGATTAA

### **pSPL3:**

SD2	GAGTGAACTGCACGTGACAAGC
pSPL3-R	GTTGGGGTCTGTGGGTACAC

### **pToxRIV:**

ToxR-F	ATGACATCTCTCAGCCAGAATCT
ToxR-R	CTTACCGACTTCAGCGAGACC

### **hVMD2 PromotorSNPs:**

VMD2-RE4 SNP-F	GGGGATCTGGGCATTTATTC
VMD2-RE4 SNP-R	CCTGTGGCTATGGAAAGAA

**Alles, was gegen die Natur ist, hat auf die Dauer keinen Bestand.**

**Charles Darwin**