

**Untersuchungen zu den molekularen Ursachen von Erkrankungen
der Netzhaut - Die X-gebundene juvenile Retinoschisis und die
altersabhängige Makuladegeneration**

**DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**vorgelegt von
Thomas Andreas Loenhardt**

**aus
Mönchengladbach**

im Jahr 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	4
2.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Netzhaut	4
2.2 Erbliche Dystrophien der zentralen Netzhaut.....	6
2.2.1 X-gebundene juvenile Retinoschisis	7
2.2.2 Altersabhängige Makuladegeneration	11
2.3 Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	17
3.1 Materialien	17
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	18
3.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Zellen	18
3.2.2 Eingesetzte <i>E. coli</i> Bakterienstämme	19
3.2.3 Eingesetzte Vektoren.....	19
3.2.4 Transformation der Plasmid DNA in chemisch kompetente Bakterien	19
3.2.5 Herstellen von kryokonservierungsfähigen <i>E. coli</i> Zellen	20
3.2.6 Extraktion von Plasmid-DNA	20
3.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	21
3.2.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren	21
3.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
3.2.10 Reinigung von PCR-Produkten	24
3.2.11 Verdau von DNA mit DNA-Endonukleasen	24
3.2.12 Plasmid-Vektor Dephosphorylierung	24
3.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren.....	25
3.2.14 Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen mit Plasmid-DNA	26
3.2.15 Klonierung von PCR Produkten mit dem pGEM-T Vektorsystem.....	27
3.2.16 Gerichtete Mutagenese mittels PCR im DNA-Plasmid.....	27
3.2.17 Sequenzierung von DNA nach Sanger	29
3.2.18 Herstellen chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> Zellen.....	31
3.2.19 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	31
3.2.20 Transfektion von HEK-293 EBNA Zellen	31
3.2.21 Herstellung RS1 stabil exprimierender HEK-293 EBNA Zellen	32

3.2.22 RNA-Isolierung aus humanem Gewebe	33
3.2.23 cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase	33
3.2.24 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe.....	34
3.2.25 Genotypisierung der RS1- <i>knock-out</i> -Maus	35
3.3 Biochemische Methoden.....	38
3.3.1 Verwendete rekombinante Proteine.....	38
3.3.2 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford (1976)	40
3.3.3 Gelelektrophorese, Transfer und Immobilisierung von Proteinen	41
3.3.4 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen.....	41
3.3.5 Chemolumineszenz-Lösung zur Proteindetektion im Western Blot	43
3.3.6 Immunocytochemie bei eukaryotischen Zellen.....	44
3.3.7 Bindung des rRS1 an Gewebe der RS1- <i>knock-out</i> Maus	44
3.3.8 ELISA: Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an unilaminare Phospholipide	47
3.3.9 Herstellen von Vesikeln nach Szoka und Papahadjopoulos (1978)	48
3.3.10 Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an artifizielle Phospholipidvesikel.....	50
3.3.11 ELISA: Bindung des rRS1, rTTR und der extrazellulären Domäne des DDR2 an die Kollagene I-V	50
3.3.12 Solubilisieren von Mausnetzhäuten und HEK-293 EBNA Zellen	51
3.3.13 Reinigen des rARMS2-His mittels Affinitäts-Chromatographie	52
3.3.14 Proteinrückfaltung des rARMS2-His nach der Methode von Vohra et al. (2007)	54
3.3.15 Dialyse des rARMS2-His	55
3.3.16 Proteinrückfaltung des rARMS2-His nach der Methode von Swope Willis et al. (2005)..	56
3.3.17 Isolation von Einschlusskörperchen zur Immunisierung von Kaninchen	57
3.3.18 Herstellung und Reinigung des α ARMS2 Antikörpers.....	58
3.3.19 Epitopkartierung des α ARMS2 Antikörpers.....	59
3.3.20 Immunpräzipitation mit Protein-G-Sepharose.....	61
3.3.21 Nachweis des ARMS2 Proteins in humanem Gewebe.....	62
4. Ergebnisse	64
4.1 Die Charakterisierung der Struktur-Funktions-Beziehung des Retinoschisins und die Identifikation seiner Bindungspartner	64
4.1.1 Bindung des rRS1 an unterschiedliche Gewebe der RS1-KO-Maus.....	65
4.1.2 Bindung von rRS1 und RS1-Cystein-Mutanten an RS1-KO-Netzhäute	66
4.1.3 Blockieren der Bindung des rRS1 an RS1-KO-Netzhaut mit Peptiden	68
4.1.4 Überprüfung der Phospholipide als Bindungspartner des Retinoschisins	69
4.1.5 Überprüfung der Kollagene I bis V als Bindungspartner des Retinoschisins.....	72

4.1.6 Untersuchung der Bindung des Retinoschisins und der RS1-Cystein-Mutanten zu RS1-KO-Maus Netzhaut in Gegenwart von Monosacchariden.....	73
4.1.7 Immunpräzipitation des Retinoschisins aus solubilisierter Mausnetzhäute	75
4.1.8 Überprüfung der Interaktion des rRS1 und der RS1-Cystein-Mutanten mit der extrazellulären Domäne der $\beta 2$ Untereinheit der Na/K ATPase	77
4.1.9 Überprüfung der Bindung des Retinoschisins an die heterolog exprimierten Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten	79
4.2 Herstellung des α ARMS2 Antikörpers und der Nachweis des ARMS2 Proteins in humanem Gewebe	83
4.2.2 Expression des ARMS2 als Fusionsprotein in <i>E. coli</i> Zellen.....	83
4.2.3 Reinigung des rARMS2-His Fusionsproteins	85
4.2.4 Überprüfung der Proteinsequenz des rARMS-His mittels MALDI-TOF	87
4.2.5 Renaturierung des rARMS2-His Proteins nach Vohra et al. (2007)	88
4.2.6 Renaturierung des rARMS2-His nach Swope-Willis et al. (2005).....	88
4.2.7 Isolierung der Einschlusskörperchen des rARMS2-His aus <i>E. coli</i> nach Nagai und Thogersen (1987)	90
4.2.8 Überprüfung des α ARMS2 Antikörper mittels Western Blot.....	91
4.2.9 Epitop Identifizierung des α ARMS2 Antikörpers.....	93
4.2.10 Überprüfung der Expression des ARMS2 Proteins in humanen Geweben	94
4.2.11 Vergleich der Proteinexpression des ARMS2 und der ARMS2_indel Variante in humanen Plazenten.....	96
5. Diskussion	98
5.1 Die Rolle des Retinoschisins bei der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis	98
5.1.1 Die RS1-KO-Maus Netzhaut als Mittel zur Charakterisierung des RS1.....	99
5.1.2 Potentielle Bindungspartner des Retinoschisin	102
5.1.2.1 Phospholipide als Bindungspartner des Retinoschisins.....	102
5.1.2.2 Kollagene als Bindungspartner des Retinoschisins	103
5.1.2.3 Saccharide als Bindungspartner des Retinoschisins	104
5.1.3 Potentielle Funktionen des Retinoschisins für die Na/K ATPase	107
5.2 Die Assoziation des ARMS2 mit der AMD.....	110
5.2.1 Expression und Reinigung von rekombinantem ARMS2	111
5.2.2 Nachweis des endogenen ARMS2 mit dem α ARMS2 Antikörper.....	112
5.2.3 Steigt ohne funktionsfähigen ARMS2 Protein das Risiko an AMD zu erkranken?.....	113
I. Abkürzungsverzeichnis, Maßeinheiten und SI-Einheiten	115
I.I Abkürzungsverzeichnis.....	115

I.II Maße und Einheiten	118
I.III SI-Vorsätze von dezimalen Vielfachen und Teilen	119
II. Liste der eingesetzten Primer	120
III. Literaturverzeichnis	122
IV. Danksagung	132

1. Zusammenfassung

Hereditäre Netzhautdystrophien umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die aufgrund von Mutationen in spezifischen Genen zu Störungen der Netzhautentwicklung oder dessen Funktion führen. In dieser Arbeit wurden Fragen zur molekularen Pathogenese bei zwei Netzhautdystrophien untersucht, bei der hereditären X-gebundenen juvenilen Retinoschisis (XRS) sowie der genetisch komplexen altersabhängigen Makuladegeneration (AMD).

Die XRS ist eine Netzhauterkrankung die hauptsächlich Männer betrifft (George et al. 1995). Charakteristisch für das Krankheitsbild ist eine radspeichenförmige Makulopathie und eine reduzierte b-Welle bei relativ gut erhaltener a-Welle im Elektroretinogramm (ERG) (George et al. 1996; Khan et al. 2001). Genetische Ursache der XRS sind Mutationen im Retinoschisin (*RS1*) Gen, welches für ein 24 kDa Protein kodiert (Sauer et al. 1997). Das Protein des Retinoschisins (*RS1*) wird als homo-oktamerischer Komplex sezerniert und ist extrazellulär an folgenden Zellen bzw. Zellschichten der Netzhaut lokalisiert: 1. den Innensegmenten der Photorezeptoren, 2. den Bipolarzellen, 3. den Synapsen zwischen Photorezeptoren, Bipolarzellen und Horizontalzellen und 4. den Synapsen zwischen Bipolar-, Amacrin- und Ganglionzellen.

Ein wesentlicher Teil des *RS1* Proteins wird von der konservierten Discoidin Domäne gebildet, welche verantwortlich für eine Bindung an Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) ist (Alexander et al. 1992). Die konkreten Bindungspartner des *RS1* sind noch nicht vollständig geklärt, ebenso wie die eigentliche zelluläre bzw. extrazelluläre Funktion des Proteins. Aufgrund bekannter Funktionen des Discoidin Moduls bei anderen Proteinen wird für das *RS1* eine Funktion als Gerüstprotein diskutiert (Molday et al. 2001; Wu et al. 2005). Es existiert eine Retinoschisin-defiziente Mauslinie (*RS1-knock-out*-Maus, *RS1-KO*-Maus), die einen zum Menschen vergleichbaren Phänotyp aufweist und sich hervorragend für Untersuchungen der XRS Pathomechanismen eignet (Weber et al. 2002).

Speziell die Bindung des *RS1* Proteins an Zellmembranen wurde durch eine eigens im Laufe dieser Arbeit entwickelte Methode näher untersucht. Hierbei wird rekombinantes *RS1* Protein mit homogenisiertem Mausgewebe inkubiert, anschließend wird der lösliche Überstand abgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Die Methode wurde des Weiteren modifiziert durch den Einsatz von mutanten *RS1* Proteinen und der Zugabe von Peptiden und Monosacchariden. Die Bindung zu potenziellen Bindungspartnern wie Phospholipiden und

Kollagenen wurde mittels ELISA untersucht. Die Bindung des RS1 wurde auch zu den $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K-ATPase mittels Immunopräzipitation untersucht, sowie deren strukturelle Voraussetzungen für diese Bindung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass RS1 unabhängig von seiner oligomeren Form nur an die Membranen der Netzhaut, die aus der RS1-KO-Maus isoliert wurden, bindet. Membranöse Strukturen aus anderen Gewebetypen vermögen dagegen das Retinoschisin nicht zu binden. Die Oktamerstruktur des RS1 Proteins scheint nicht für die Bindung an die Netzhaut notwendig zu sein und erfüllt wahrscheinlich eine andere, bisher nicht bekannte, Funktion. Drei früher charakterisierte Polypeptidschlaufen (*Spike 1* bis *Spike 3*) der Discoidin Domäne sind vermutlich an der Bindung des RS1 Proteins an die Retinoschisin-defiziente Netzhaut beteiligt, da Blockierungsexperimente mit synthetischen Peptiden die Bindung behindern. Die Bindung wird allerdings nicht ausschließlich über die Spikes vermittelt, da Galactose die Bindung ebenfalls blockiert, obwohl es bekanntermaßen nicht direkt an die Spikes der Discoidin Domäne bindet. Eindeutig als Bindungspartner ausgeschlossen wurden die Phospholipide und die Kollagene I - V. Co-Präzipitationsexperimente des RS1 Proteins mit den Untereinheiten der Na/K-ATPase, insbesondere mit der extrazellulären Domäne der $\beta 2$ -Untereinheit, bestätigen die Ergebnisse einer kanadischen Arbeitsgruppe (Molday et al. 2007) und zeigen dass tatsächlich eine direkte Interaktion zwischen Retinoschisin und der Na/K-ATPase existiert (Molday et al. 2007). Das Bindungsverhältnis zwischen RS1 und der Na/K-ATPase kann aufgrund der vorhandenen Daten auf etwa 1:8 geschätzt werden. In diesem Zusammenhang ist eine Funktion des RS1 als Gerüstprotein mit möglichen Aufgaben in der Positionierung und Interaktion mit der Na/K-ATPasen zu diskutieren.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit lag auf der AMD. Die AMD ist in den westlichen Industrienationen eine der häufigsten Ursachen von Erblindungen im Alter. Ihre Entwicklung wird von Umwelt- aber auch genetischen Faktoren beeinflusst und gilt daher als eine komplexe Erkrankung. Vor kurzem wurde durch Kopplungsstudien ein Genort auf Chromosom 10q26 näher charakterisiert, der signifikant mit der AMD assoziiert ist (Fisher et al. 2005; Rivera et al. 2005). Dieser Genort enthält zwei Gene, das *ARMS2* (*age-related maculopathy susceptibility 2*) und das *HTRA1*. (*HtrA serine peptidase 1*). Welches der beiden Gene das eigentliche AMD Suszeptibilitätsgen ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Besonders auffällig war jedoch eine *ARMS2* Variante, die eine mRNA destabilisierende

Insertion/Deletion enthielt, was einem funktionellen Polymorphismus entsprechen könnte (Fritzsche et al. 2008).

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein polyklonaler α ARMS2 Antikörper hergestellt und dessen Epitop feinkartiert. Die endogene Expression des ARMS2 Proteins wurde mittels dieses Antikörpers in humanen Geweben ermittelt. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass ARMS2 ein proteinkodierendes Gen ist. Des Weiteren wurde die Expression der vermuteten funktionellen ARMS2 Varianten in humanem Plazentagewebe bestimmt. Dabei wurde festgestellt, dass diese mit einem höheren AMD Risiko assoziierte Variante im Gegensatz zu der normalen nicht-Risiko Varianten unterhalb der Nachweisgrenze der angewandten Analysenmethode liegt. Dies scheint eine Rolle der risikoassoziierten Varianten im Krankheitsprozess der AMD zu unterstützen, wobei eine Beteiligung von HTRA1 formell aufgrund dieser Daten nicht auszuschließen ist.

2. Einleitung

2.1 Aufbau und Funktion der menschlichen Netzhaut

Die Netzhaut ist ein hochspezialisiertes Gewebe, das Lichtreize in elektrische Signale umwandelt (Phototransduktion) und an das Gehirn weiterleitet. Sie setzt sich aus 5 Hauptzelltypen zusammen, die in 3 Schichten angeordnet sind. Die äußere Schicht bilden die Photorezeptoren, welche das elektromagnetische Licht detektieren und als chemische Signale an die mittlere Schicht aus Bipolar-, Amakrin- und Horizontalzellen weiterleiten. In der mittleren Schicht werden diese Signale gefiltert und an die innere Schicht aus Ganglionzellen weitergeleitet, welche die eintreffenden Reize über den Sehnerv in das Gehirn leiten (Abb.1).

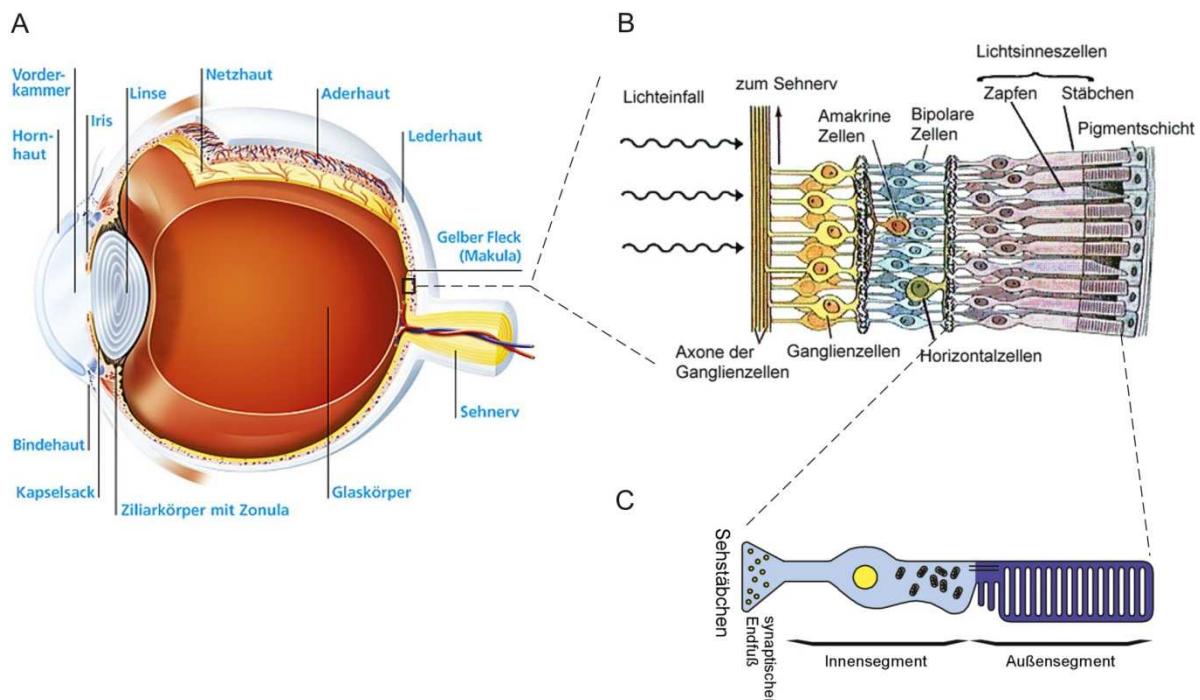


Abb.1: Schematischer Aufbau des Auges, der Netzhaut und des Sehstäbchens. **A)** Querschnitt durch das menschliche Auge. **B)** Querschnitt durch die Netzhaut. **C)** Schematische Darstellung eines Sehstäbchens und dessen Aufteilung in Außensegment, Innensegment und synaptischen Endfuß. Erklärung siehe Text. (Abbildungen modifiziert nach www.refraktiv.com/_img/ill/aufbau_auge.jpg, web.physik.rwth-aachen.de/~hebbeker/lectures/ph3_0203/retina8.gif und der Dissertation von Karin Arbarca-Heidemann 2002).

In der Netzhaut von Wirbeltieren gibt es zwei unterschiedliche Typen von Photorezeptoren, die Stäbchen und die Zapfen (Abb.1 C). Die Stäbchen ermöglichen das Sehen bei niedrigen, die Zapfen bei höheren Lichtintensitäten sowie das Farbensehen. Morphologisch und

funktionell lassen sich beide Photorezeptortypen in ein Außensegment, Innensegment und den synaptischen Endfuß unterteilen. Das Innensegment enthält den Zellkern, die Mitochondrien, das endoplasmatische Retikulum und weitere Zellorganellen. Dem Innensegment schließt sich der synaptische Endfuß an, der die Verbindung zu den nachgeschalteten Nervenzellen herstellt. Die molekularen Komponenten der Phototransduktionskaskade befinden sich im Außensegment.

Die Außensegmente der Photorezeptoren tauchen in das retinale Pigmentepithel (RPE) ein, welches die Photorezeptoren mit Nährstoffen versorgt und Stoffwechselabbauprodukte von der Netzhaut zu den Blutgefäßen transportiert. Der synaptische Endfuß ist mit den Bipolarzellen verbunden, die zusammen mit den Amakrin- und Horizontalzellen ein neuronales Netzwerk bilden und bereits eine visuelle Signalverarbeitung auf retinaler Ebene durchführen. Die Axone der nachgeschalteten Ganglionzellen bilden den Sehnerv und leiten die Signale ins Gehirn.

Im Zentrum der Netzhaut befindet sich die Makula („gelber Fleck“, Abb.1 A). Dort ist die höchste Zapfendichte. Die hohe Zapfendichte und die eins zu eins Verschaltung mit den nachfolgenden Neuronen ermöglichen die höchste Auflösung in der Netzhaut und bilden somit die Stelle des schärfsten Sehens.

Die Funktion der Netzhaut kann durch verschiedene Untersuchungsmethoden überprüft werden. So spielt die Sehschärfe (Visus) eine wesentliche Rolle bei der Beurteilung des Sehvermögens. Mit Hilfe eines Augenspiegels wird der Augenhintergrund (Fundus) betrachtet. Die Perimetrie ermöglicht Aussagen über Gesichtsfeldausfälle. Zusätzlich wird die Blendempfindlichkeit und das Farbsehen überprüft. Durch die Ableitung eines Elektroretinogramms (ERG) kann eine Aussage über den physiologischen Zustand der Netzhaut gemacht werden. Beim ERG werden in der Netzhaut als Folge eines Lichtreizes Summenantworten einzelner Zellschichten abgeleitet. Durch eine Variation der Reizbedingungen (z.B. Helligkeit des Reizes und die Dunkel- oder Helladaption der Netzhaut) kann die Reizbarkeit der Photorezeptoren (a-Welle) sowie der Erregbarkeit der mittleren Zellschicht (b-Welle) beschrieben werden. Die Messung der Autofluoreszenz des retinalen Pigmentepithels und die Fluoreszenzangiographie der Netzhaut ergänzen die morphologischen Untersuchungsmethoden.

2.2 Erbliche Dystrophien der zentralen Netzhaut

Die erblichen Dystrophien der zentralen Netzhaut (Makula) umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die aufgrund von Mutationen in einem definierten Gen zu Störungen in der Netzhautentwicklung oder dessen Funktion führen. Das Hauptmerkmal dieser Erkrankungen ist ein progressiver Verlust der Visusfunktion. Die klinische Symptomatik einer hereditären Makuladystrophie kann bereits bei der Geburt ausgeprägt sein oder sich erst im Laufe des Alters entwickeln. Insgesamt wird geschätzt, dass etwa 10 % aller Erblindungen in den Industrieländern aufgrund hereditärer Netzhautdystrophien verursacht werden.

Grundsätzlich lassen sich generalisierte Netzhautdystrophien mit peripherem oder zentralem Beginn von regional begrenzten Makuladystrophien unterscheiden. Generalisierte Netzhautdystrophien mit peripherem Beginn wie z.B. Retinitis pigmentosa (RP) sind durch anfängliche Nachtblindheit und peripher beginnende Gesichtsfeldausfälle gekennzeichnet. In den späteren Stadien kommt es zur Entstehung eines Tunnelblicks und zu Farbsinnstörungen. Das ERG zeigt fehlende oder stark reduzierte Potentiale der Stäbchen und weniger ausgeprägte Veränderungen in den Zapfen.

Die Netzhautdystrophien mit zentralem Beginn, wie z.B. die Sorsby Fundusdystrophie, führen früh zu Visusminderungen und zum Verlust der Lesefähigkeit. Farbsinnstörungen, Blendempfindlichkeit und zentrale Gesichtsausfälle sind charakteristisch, während das periphere Gesichtsfeld und das Nachtsehen erst später beeinträchtigt werden. Hier zeigt das ERG stark reduzierte Potentiale der Zapfen und nur geringe Veränderungen in den Potentialen der Stäbchen. Die regional begrenzten Makuladystrophien, wie z.B. Morbus Best oder Morbus Stargardt, zeigen anfangs eine ähnliche Symptomatik wie die generalisierte Netzhautdystrophie mit zentralem Beginn. Hier treten ebenfalls Farbsinnstörungen und Verlust der Lesefähigkeit auf. Das periphere Gesichtsfeld bleibt jedoch erhalten und auch die Blendempfindlichkeit ist weniger stark ausgeprägt.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 192 Genorte bekannt und 144 Gene identifiziert, die mit einer hereditären Netzhautdystrophie assoziiert werden konnten (Retnet, www.sph.uth.tmc.edu/retnet/sum-dis.htm#A-genes). Eine eindeutige Korrelation zwischen Mutation und Krankheitsbild ist jedoch nur in wenigen Krankheitsbildern ausgeprägt. So kann

oft selbst zwischen Familienmitgliedern mit gleicher Mutation ein unterschiedlicher Grad der Krankheitsausprägung vorliegen.

2.2.1 X-gebundene juvenile Retinoschisis

Die X-chromosomale juvenile Retinoschisis (XRS, OMIM #312700) ist die häufigste Ursache für eine Makuladegeneration bei Männern im frühen Kindesalter. Weibliche Überträgerinnen dieser Krankheit sind klinisch in der Regel nicht betroffen (George et al. 1995). Der Name Retinoschisis leitet sich von einer inneren Aufspaltung (Schisis) der Netzhaut ab. Die Prävalenz dieser Erkrankung liegt bei ca. 1:5.000 bis 1:20.000 (George et al. 1996). Ein gemeinsames Merkmal aller Betroffenen ist eine bilaterale radspeichenartige Schisis der Makula (Abb.2) (George et al. 1996). Die Ursache dieser Schisis sind gelbliche Zysten im inneren Bereich der Netzhaut, die sich hauptsächlich zwischen der Nervenfasersicht und der restlichen Netzhaut bilden. Dies führt zu einer zystischen Degeneration der makulären Region (Condon et al. 1986; Kirsch et al. 1996). Die ersten Krankheitssymptome treten gewöhnlich in den ersten beiden Ledensdekaden auf (Kawano et al. 1981), wobei die phänotypische Ausprägung selbst innerhalb einer Familie variabel ist. Sie reicht von leichter Visusverminderung um das 40.-50. Lebensjahr, bis zur Erblindung im frühen Kindesalter. Dies ist unter anderem davon abhängig, wie stark die Makula betroffen ist. In seltenen Fällen früher Erblindung ist oft die ganze Netzhaut und Aderhaut desorganisiert (Tantri et al. 2004). Eine diagnostische Charakteristik der XRS ist eine reduzierte b-Welle im ERG bei gleichbleibender Signalintensität der a-Welle, das sogenannte „negative“ ERG (Abb.2 B). Die Ursache dieser Abnormalität liegt in einer Veränderung der Erregbarkeit der Bipolarzellen (Khan et al. 2001).

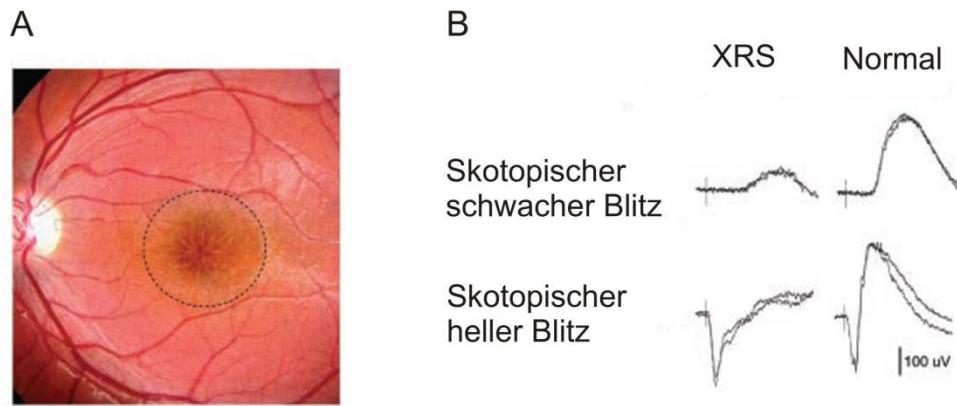


Abb.2: Fundus und ERG eines XRS Patienten. A) Aufnahme des Fundus. Der gepunktete Kreis markiert Radspeichenartige Schisis der Makula. B) ERG-Aufnahmen dunkeladaptierter XRS Patienten und gesunder Menschen bei schwachen und hellen Lichtblitzen. Abbildung modifiziert nach (Zeng et al. 2004).

Die Region des *RS1* Gens wurde bereits 1983 auf den kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22) lokalisiert (Wieacker et al. 1983). Die Identifizierung des Krankheitsgens selbst wurde schließlich 1997 über einen positionellen Klonierungsansatz erreicht (Sauer et al. 1997). Das *RS1* Gen enthält 6 Exone und kodiert für das Retinoschisin (*RS1*), ein 224 Aminosäuren (AS) langes Netzhaut-spezifisches Protein von 24 kDa (Abb.3).

Die ersten 23 AS des N-Terminus bilden ein Signalpeptid für eine extrazelluläre Sekretion des Proteins. Dieses wird beim Transportvorgang abgespalten (Wu & Molday 2003). Der Großteil des *RS1* Proteins wird von einer konservierten Discoidin Domäne (AS 63-219) eingenommen. Die Sequenzen der flankierenden Aminosäuren (AS 24-62 und AS 220-224) zeigen keine Homologien zu anderen Proteinen.

Lokalisiert ist das Retinoschisin Protein extrazellulär auf den Innensegmenten der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren, der Bipolarzellen, den Synapsen zwischen Photorezeptoren, Bipolarzellen und Horizontalzellen und den Synapsen zwischen Bipolar-, Amacrin- und Ganglionzellen.

Das *RS1* Protein an sich besteht zu einem grossen Teil aus einer Discoidin Domäne, diese Domäne wurde erstmals im Discoidin I Protein des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Poole et al. 1981). Das Discoidin I ist ein Lektin, das notwendig für die Erhaltung der Morphologie, der Organisation des Zytoskeletts und der Zelladhäsion während der Zellaggregation ist (Alexander et al. 1992). Die Discoidin Domäne wurde später auch in eukaryotischen Proteinen entdeckt wie z.B. Neurexin IV, Neuroligin-1, Blutgerinnungsfaktor V und VIII, Milchfettprotein-E8, Discoidin Domäne Rezeptor 1 und 2 sowie Del-1 (Kiedzierska et al. 2007). Die Discoidin Domäne kommt hauptsächlich in Transmembran- und

extrazellulären Proteinen vor, die an Komponenten der Plasmamembran oder der extrazellulären Matrix (EZM) binden wie z.B. Kollagene, Phosphatidylserin, Integrinen und anderen Proteinen (Kiedzierska et al. 2007).

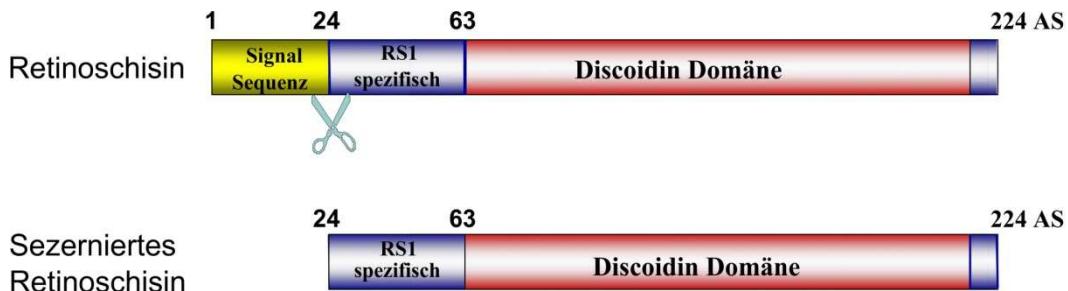


Abb.3: Schematische Struktur des Retinoschisins. Das RS1 ist 224 Aminosäuren (AS) lang. Die ersten 23 AS stellen ein Signalpeptid dar, welches beim Transport aus der Zelle abgespalten wird. Der Großteil der Proteinsequenz entspricht der Discoidin Domäne (AS 63-219), die von RS1 spezifischen Sequenzen (AS 24-62 und AS 220-224) flankiert wird. Abbildung wurde modifiziert nach (Wu & Molday 2003).

Die Retinoschisin-spezifischen Sequenzen enthalten Cysteine, die über drei intermolekulare Disulfidbrücken-Bindungen einen homo-oktamerischen Komplex bilden (Abb.4) (Wu et al. 2005). Die Discoidin Domäne selbst enthält ebenfalls Cysteine, die zwei intramolekulare Disulfidbrücken zur strukturellen Festigung des Proteins ausbilden. Die Struktur des RS1 ist bisher nicht entgänglich aufgeklärt, ein Modell des RS1 konnte von den bekannten Strukturen der Discoidin Domänen der Blutgerinnungsfaktoren V und VIII abgeleitet werden (Macedo-Ribeiro et al. 1999; Pratt et al. 1999). Diese modulierte Struktur des RS1 wurde als Grundlage für ein *in silico* Modell verwendet, das eine spezifische Bindung zum Phospholipid Phosphatidylserin vorhersagt (Frernali et al. 2003).

Die Funktionen wie auch die Bindungspartner des RS1 sind bis heute nur ansatzweise geklärt. Bisher wurden anionische Phospholipide, Monosacharide, spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanale, die Na/K-ATPase, sowie Laminin und Crystalin als Bindungspartner diskutiert (Steiner-Champliaud et al. 2006; Molday et al. 2007; Vijayasarathy et al. 2007; Dyka et al. 2008; Shi et al. 2009). Keiner dieser Bindungspartner konnte bislang unabhängig bestätigt werden. Die Funktion des RS1 ist bisher unklar. Es wird jedoch vermutet, dass es extrazellulär als Gerüstprotein dient, da es neben der Discoidin Domäne keine weiteren bekannten Domänen oder enzymatische Aktivität besitzt. Begründet wird dies zum einen, durch die Analogie zu anderen Proteinen, die die Discoidin Domäne enthalten, die an Komponenten der EZM wie z.B. Kollagene, Phospholipide, Integrinen und Proteoglycane binden (Kiedzierska et al. 2007), zum anderen durch die kritische Funktion des RS1 für den Erhalt der zellulären

Organisation der Netzhaut, wie es am Phänotyp der XRS zu sehen ist (George et al. 1995; Kirsch et al. 1996).

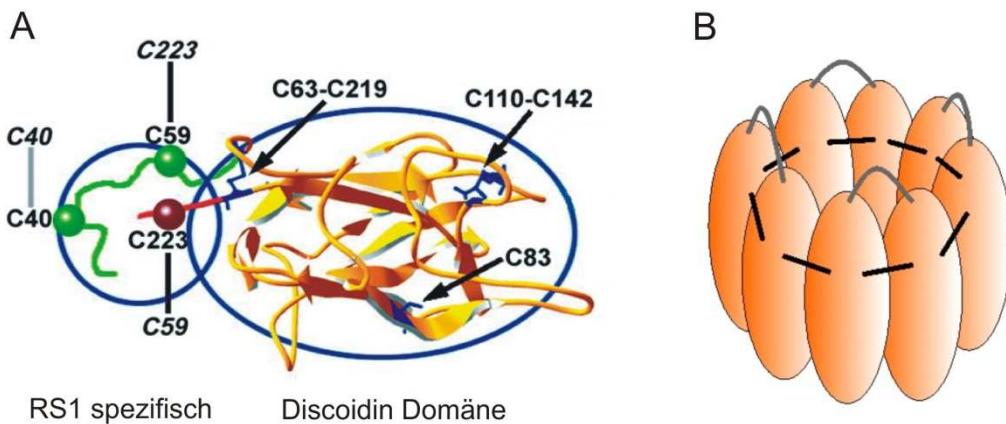


Abb.4: Modell des RS1 Monomers und Bildung eines homo-oktameren Komplexes durch Ausbildung von Disulfidbrücken. A) Retinoschisin Monomer unterteilt in RS1 spezifischer Domäne und Discoidin Domäne. Markiert sind jeweils die Cysteine die intermolekulare und intramolekulare Disulfidbrücken ausbilden. B) Bildung des oktameren Komplexes durch die Verknüpfung der C40-C40 (grau) und C59-C223 (schwarz) Disulfidbrücken. Abbildung wurde modifiziert nach (Wu & Molday 2003).

Bis heute sind insgesamt 376 Mutationen im *RS1*-Gen beschrieben worden (www.dmd.nl/rs/). Sie setzen sich zusammen aus 284 (75,5 %) Missense- und 21 (5,6 %) Nonsense-Mutationen, sowie 21 (5,6 %) Basenaustauschen, die Spleißstellen verändern, 38 (10,1 %) Deletionen, 8 (2,1 %) Duplikationen und 3 (0,8 %) Insertionen. Das Mutationsspektrum ist nicht zufällig über das Gen bzw. Protein verteilt, sondern konzentriert sich stark auf die Discoidin Domäne. Der Großteil der Missense-Mutationen führt dazu, dass das RS1-Protein nicht mehr von den Zellen sezerniert wird (Wang et al. 2006). So wird vermutet, dass ein Fehlen von RS1 die molekulare Hauptursache für den Pathomechanismus der XRS darstellt. Der variable Phänotyp bei XRS Patienten deutet jedoch an, dass auch andere individuelle Faktoren das Krankheitsbild beeinflussen können (Iannaccone et al. 2006).

Um die biologischen Funktionen des RS1 besser untersuchen zu können, wurde am humangenetischen Institut Regensburg eine Mauslinie generiert, in der das murine Homolog des menschlichen RS1-Gens unterbrochen wurde (*RS1-knock out*-Maus) (Weber et al. 2002). Dazu wurde eine LacZ Kassette in das Exon 3 des genomischen RS1 Genortes eingefügt. Somit sollte die Translation schon vor der Discoidin Domäne des RS1-Proteins unterbrochen sein. Die *RS1-knock out*-Maus (RS1-KO-Maus) unterscheidet sich äußerlich nicht von Wildtyp-Mäusen desselben Wurfs. Der Fundus der RS1-KO-Maus zeigt kleine zystenähnliche

Strukturen in der inneren Netzhaut, die teilweise bis zur Nervenfaserschicht reichen. Im Gegensatz zum Menschen sind diese nicht auf die Makula beschränkt, sondern sind über die gesamte Netzhaut verteilt. Größere Zysten befinden sich ähnlich wie beim Menschen in der Peripherie der Netzhaut. Bei 3 Monate alten RS1-KO-Mäusen wird bei dunkeladaptierten Messungen das für XRS charakteristische negative ERG gefunden (Weber et al. 2002). Die RS1-KO-Maus weist viele Parallelen zum menschlichen Krankheitsbild der XRS auf. Zu beachten ist hierbei, dass diese Übereinstimmung trotz des Fehlens einer Makula zu beobachten ist. Dies macht die RS1-KO-Maus zu einem geeigneten Modelsystem, um die molekulare Pathogenese der XRS Erkrankung zu untersuchen.

2.2.2 Altersabhängige Makuladegeneration

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) wird durch Veränderungen im RPE verursacht und ist durch eine Anreicherung eines gelblichen Materials bestehend aus Proteinen und Lipiden, die so genannte Drusen bilden, gekennzeichnet (Jager et al. 2008). Bei fortschreitender Erkrankung wird aufgrund des Absterbens von Netzhautzellen der Visus im zentralen Gesichtsfeld beeinträchtigt. Die weitaus häufigste Form der Makuladegeneration ist die AMD, die definitionsgemäß erst nach dem 50. Lebensjahr auftritt. Sie ist in den westlichen Industrienationen die am häufigsten zur Erblindung führende Erkrankung und wird durch den demographischen Wandel der Altersstrukturen in den kommenden Jahrzehnten noch weiter zunehmen (Congdon et al. 2004; Pascolini et al. 2004). Aufgrund des zu erwartenden sozioökonomischen Ausmaßes dieser Erkrankung ist weltweit das Interesse an der Aufklärung der Pathogenesen der Makuladystrophien deutlich in den Fokus der internationalen Forschung gerückt.

Eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der AMD spielen vorgezogene Alterungsprozesse mit Ablagerungen und Umbauvorgängen in den RPE-Zellen, der Aderhaut und der dazwischen liegenden Bruchschen Membran. Die post-mitotischen RPE-Zellen phagozytieren die Abfallstoffe der Photorezeptoren und verarbeiten sie lysosomal weiter. Wesentliche Anteile der Abbauprodukte werden an der basalen Seite der RPE-Zellen ausgeschieden und via Bruchsche Membran an die Aderhaut zum Abtransport weitergeleitet. Ein Teil der Abbauprodukte wird als nicht weiter abbaubares Lipofuszin in den RPE-Zellen gespeichert. Somit steigt Gehalt an Lipofuszin mit zunehmendem Lebensalter an. Die Akkumulation

ausgeschiedener Abbauprodukte kann im basalen Bereich der RPE-Zellen zu einer Diffusionsbarriere führen.

Die AMD wird in zwei Spätformen unterteilt, die „trockene“ und die „feuchte“ Form wobei sich während des Krankheitsverlaufes durchaus aus einer „trockenen“ eine „feuchte“ Form der AMD entwickeln kann. Die „trockene“ Form macht ca. 80 % der Fälle aus, aber nur 5-10 % der Erblindungen die von AMD verursacht werden (Jager et al. 2008). Sie beginnt durch die Ablagerung von Drusen und kann im fortgeschrittenen Stadium in einen flächigen apoptotischen Zelltod (Geographische Atrophie, GA) des RPEs übergehen (Abb.5). Ihr Voranschreiten ist meist langsam und schleichend. Beim Übergang zur „feuchten“ Form bilden sich unter der Netzhaut flächige Gefäßmembranen (Choroidale Neovaskularisation, CNV) aus, die zu Leckagen und Blutungen neigen.

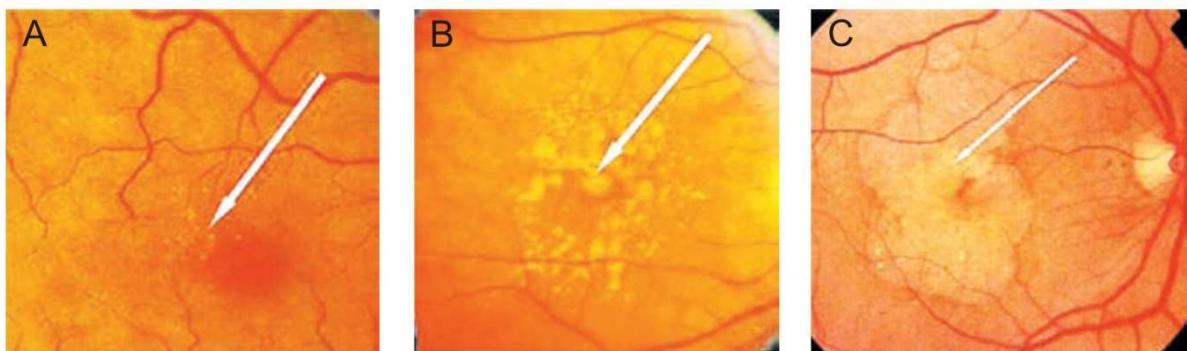


Abb.5: Fundus Aufnahmen von AMD Patienten. A) Frühe Form der AMD mit kleinen Drusen. B) AMD mit großen Drusen. C) AMD mit geographischer Atrophie. Die weißen Pfeile deuten jeweils auf die Drusen oder die Atrophie. (Abbildung modifiziert nach Jager et al. N Engl J Med (2008))

Für das Risiko eine AMD zu entwickeln sind eine Reihe verschiedener Faktoren identifiziert worden, so z.B. fortschreitendes Alter, Rauchen, Übergewicht und genetische Faktoren (Klein et al. 2004). Somit ist die AMD eine typische multifaktorielle Krankheit ähnlich wie Diabetes mellitus, Morbus Alzheimer oder die kardiovaskulären Erkrankungen. Als ein wichtiger genetischer Faktor wurde jüngst der Komplementfaktor H (KFH) identifiziert, (Klein et al. 2005). Damit wurde die Pathogenese mit einer Beeinträchtigung des angeborenen Immunsystems in Verbindung gebracht. Dieses System besteht aus mehr als 30 Proteinen und reguliert unter anderem pro-inflammatorische Prozesse, die zur Zelllyse führen können (Rodriguez de Cordoba et al. 2004). Ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im KFH Gen führt zu einem Tyrosin zu Histidin Austausch an Position 402, wodurch ein Großteil der AMD Fälle erklärt werden kann (Edwards et al. 2005; Klein et al. 2005). Das KFH ist ein

negativer Regulator des Komplementsystems, das durch die Variation am Codon 402 (Tyr402His) vermutlich seine Affinität zu definierten Bindungspartnern einschränkt, was somit eine Entzündungsreaktion leichter aktiviert könnte (Ding et al. 2009).

Neben dem KFH wurde durch familienbasierten AMD-Kopplungsanalysen und der nachfolgenden SNP-Feinkartierung eine Region im Genom eingegrenzt, die ebenfalls mit der AMD gekoppelt ist, diese Region enthält die drei Gene *PLEKHA1* (*pleckstrin homology domain containing, family A member 1*), *ARMS2* (*age-related maculopathy susceptibility 2*) und *HTRA1* (*high temperature requirement protein A1*) (Fisher et al. 2005; Jakobsdottir et al. 2005).

Eine weitere Analyse, die den Bereich der Gene *PLEKHA1* und *ARMS2* umfasste, nicht aber das *HTRA1*, detektierte die Variante ARMS2:rs10490924:G>T [A69S] im *ARMS2* Gen die das beobachtete Assoziationssignal alleine erklärte (Rivera et al. 2005). Nachfolgende Studien bestätigten die Assoziation der *ARMS2* [A69S] Variante, identifizierten jedoch auch ein vergleichbar starkes Assoziationssignal im Promotorbereich des *HTRA1* (Conley et al. 2006; Dewan et al. 2006; Yang et al. 2006; Francis et al. 2007; Kondo et al. 2007; Chen et al. 2008). Welches der beiden Gene oder ob beide Gene mit der AMD assoziiert sind, ist bisher unklar. Eine weitere Analyse der Region vom *ARMS2* und *HTRA1* identifizierte insgesamt 15 Hoch-Risikovarianten, wobei eine Variante des *ARMS2* funktionell besonders interessant erschien (Fritzsche et al. 2008). Diese Variante des *ARMS2* ist eine Insertions-Deletions-(Indel)-Variante (NM_001099667.1:c.*372_815del443ins54) (Abb.6), bei der 443 bp des 3'-nicht-translatierten Bereichs einschließlich des Polyadenylierungssignals des *ARMS2* Gen fehlen. Stattdessen ist dort eine 54 bp-Insertion mit Sequenzmotiven, die als destabilisierende RNA-Elemente bekannt sind (Khabar 2005; Garneau et al. 2007; Fritzsche et al. 2008). Aufgrund des fehlenden Polyadenylierungssignals und der destabilisierende RNA-Elemente wird die mRNA der *ARMS2* Variante (NM_001099667.1:c.*372_815del443ins54) vermutlich nicht translatiert. Durch eine reduzierte Menge oder dem Fehlen an *ARMS2* Protein könnte das Risiko an AMD zu erkranken beeinflusst werden.

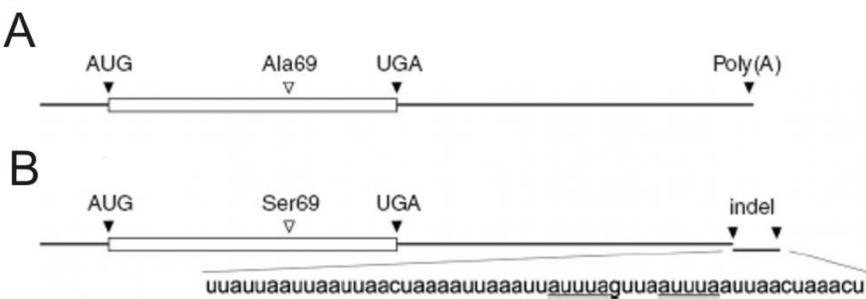


Abb.6: Struktur der mRNA der ARMS2 Isoformen. **A)** Isoform 1 des ARMS2. **B)** Isoform 2 mit Alanin zu Serin Austausch an Position 69 und Insertion/Deletion im 3'UTR. Die Insertion von 54 Basen enthält zwei auuua Sequenzen (unterstrichen), welche den RNA-Abbau beschleunigen. Die translatierte Sequenz beginnt mit dem AUG Start-Codon und endet mit dem UGA Stop-Codon. (Abbildung modifiziert nach Fritzsche et al. 2008)

Erste Untersuchungen des ARMS2 Proteins, in denen das ARMS2 rekombinant in COS-1 Zellen exprimiert wurde, lokalsierten das rekombinante ARMS2 an oder in der äußeren Membranen der Mitochondrien (Kanda et al. 2007). Die Mitochondrien sind die Hauptquelle für Superoxid Anionen, welche hoch reaktive Radikale bilden und die DNA, Lipide oder Proteine beschädigen können (Ding et al. 2009). Auf diese Weise altern Zellen schneller, während eine häufige Beschädigung der DNA aufgrund von Mutationen zum Zelltod führen kann. Die Rolle von oxidativem Stress bei retinalen Degenerationen ist bekannt und wird insbesondere auch im Zusammenhang mit der AMD Pathogenese diskutiert (Cingolani et al. 2006; Ding et al. 2009). Die Assoziation von ARMS2 mit den Mitochondrien könnte somit auf eine mögliche Funktion der Mitochondrien in der AMD Ätiologie hindeuten.

2.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, einerseits potentielle Bindungspartner des RS1 auf ihre Bindung hin zu überprüfen und zu charakterisieren. Andererseits sollte das Protein des ARMS2 Gens nachgewiesen und seine Expression in humanem Gewebe analysiert werden. Die Analyse der Bindungspartner und der Wechselwirkung des RS1 mit seinen Bindungspartner sollte Rückschlüsse auf die Funktion des RS1 ermöglichen. Ebenso sollte die Analyse der Expression des ARMS2 und einer ARMS2 Variante Rückschlüsse auf eine mögliche Funktion zulassen und somit helfen, die Verknüpfung mit der AMD zu verstehen.

Für diese Arbeit stand die RS1-KO-Maus zu Verfügung. Mit Hilfe des Gewebes der RS1-KO-Maus und rekombinant exprimiertem RS1 sollte eine Methode entwickelt werden, welche die spezifische Bindung des RS1 zu seinen Bindungspartnern zeigt und eine Möglichkeit bietet, die Bindung durch die Zugabe von z.B. Peptiden oder Kohlenhydraten zu beeinflussen. Des Weiteren sollte die Methode den Einsatz von RS1-Mutanten ermöglichen, die keine Oktamer Struktur mehr ausrichten können, um auf diese Weise den Einfluss der oligomeren Struktur des RS1 auf die Bindung zu untersuchen.

Das RS1 enthält eine Discoidin Domäne, von der bekannt ist, dass andere Proteine, die eine Discoidin Domäne enthalten, an Kollagene, Phospholipide und Kohlenhydrate binden. Die Bindung des RS1 zu ausgewählten Kollagenen sollte mit kollagenbeschichteten Multi-well Platten im ELISA untersucht werden. Die Bindung von RS1 zu Phospholipiden sollte, vergleichbar mit den Kollagenen, mit lipidbeschichteten Multi-well Platten im ELISA untersucht werden. Das humane Milchfettprotein E8 (HMFG8) enthält ebenfalls eine Discoidin Domäne, von der bekannt ist, dass sie eine höhere Affinität zu gekrümmten Lipidoberflächen besitzt. Aus diesem Grund sollte die Bindung des RS1 zu Phospholipiden zusätzlich mittels artifizeller Liposomen untersucht werden.

Die Kohlenhydrate und die Na/K-ATPase wurden als Bindungspartner des RS1 beschrieben. Die Bindung von RS1 und RS1-Mutanten zu RS1-KO-Maus Netzhäuten sollte durch ausgewählte Kohlenhydrate blockiert werden, um die Wechselwirkung zwischen den Kohlenhydraten, den Bindungspartnern in der Netzhaut und der oligomeren Struktur des RS1 zu analysieren.

Die Na/K-ATPase ist ein heterodimeres Transmembranprotein aus einer α - und einer β -Untereinheit. Durch die Immunpräzipitation der Na/K-ATPase aus Netzhautgewebe mittels rekombinantern RS1 sollte die Bindung überprüft werden. Durch den Einsatz von RS1-

Mutanten bei der Immunpräzipitation sollte geklärt werden, welche Funktion die oligomere Struktur des RS1 für die Bindung besitzt. Die Frage, an welche der beiden Untereinheiten der Na/K-ATPase das RS1 bindet, sollte durch die Bindung von rekombinantem RS1 an Zellen, die rekombinant die Untereinheiten der Na/K-ATPase exprimieren, untersucht werden.

Zu Beginn dieser Arbeit war nicht bekannt, das ARMS2 ein proteinkodierendes Gen ist. Durch die Herstellung eines polyklonalen Antikörpers gegen das ARMS2 Protein sollte es erstmalig ermöglicht werden, das ARMS2 mittels immunologischer Methoden, wie z.B. der Immunfluoreszenzmikroskopie, Immunpräzipitation und Western Blots, Informationen über die Lokalisation des ARMS2 in der Netzhaut, den Bindungspartnern und der Expression zu erhalten.

Der polyklonale Antikörper sollte aus einem Kaninchen gewonnen werden, um eine größere Menge an Antikörper zeitnah zu erhalten. Für die Immunisierung des Kaninchens sollte lösliches rekombinantes ARMS2 eingesetzt werden, damit das Risiko artifizieller Epitope, und damit unspezifische Bindungen des Antikörpers, reduziert werden. Der Antikörper sollte durch chromatographische Methoden gereinigt und die Epitope bestimmt werden.

Die Expression der ARMS2 Variante NM_001099667.1:c.*372_815del443ins54 (*ARMS2-indel*) sollte in humanen Gewebe untersucht werden, da sie als eine Hoch-Risiko Variante von AMD identifiziert wurde. Dieser ARMS2-indel Variante fehlen 443 bp des 3'-nicht-translatierten Bereichs einschließlich des Polyadenylierungssignal. Sie enthält stattdessen eine Insertion von 54 bp mit Sequenzmotiven, die als destabilisierende RNA-Elemente bekannt sind. Die Expression der ARMS2_indel Variante sollte untersucht werden, weil durch das fehlende Polyadenylierungssignal und die destabilisierenden RNA-Elemente es höchst wahrscheinlich nicht, oder nur im reduzierten Maße translatiert wird. Dementsprechend sollte überprüft werden, ob das erhöhte Risiko an AMD zu erkranken auf eine erniedrigte Konzentration bzw. einem Fehlen des ARMS2 zurückzuführen sein könnte.

3. Material und Methoden

3.1 Materialien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen:

Firma	Standort der Firma
AppliChem	Darmstadt
Calbiochem	Darmstadt
Merck	Darmstadt
Molecular Probes	Leiden, Niederlande
Invitrogen	Karlsruhe
Carl Roth	Karlsruhe
Sigma-Aldrich	Deisenhofen

Restriktionsendonukleasen und die dazugehörigen Puffer wurden von New England Biolabs (Frankfurt a.M.) geliefert. Für die Erhaltung und Vermehrung der Bakterienkulturen wurden Reagenzien der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) verwendet. Chemikalien und Fertiglösungen für die Zellkultur waren von PAA (Pasching, Österreich). Sekundäre Antikörper für immunologische Nachweise wurden von Calbiochem bezogen. Proteine wurden auf PVDF-Membranen (Immobilon P) der Firma Millipore (Eschborn) transferiert. Die Reagenzien für die selbst hergestellten ECL-Lösungen wurden von Sigma-Aldrich bezogen, alternativ dazu wurde das SuperSignal® West Femto von Thermo Scientific (Rockford, USA) eingesetzt. Für die Autoradiographie wurden Röntgenfilme CURIX Ultra UV-G der Firma AGFA (Mortsel, Belgien) verwendet. Die Peptide wurden von PANATEecs GmbH (Tübingen) hergestellt. Sämtliche Lösungen wurden mit zweifach destilliertem Wasser hergestellt. Lösungen wurden gegebenenfalls durch Autoklavieren sterilisiert (20 min; 121 °C) und filtriert (0,22 µm, Millipore). Bei Experimenten, die die HPLC-Methode

verwendeten, wurde das Äkta-System UPC-10 Basic von GE Healthcare (München) mit verschiedenen Säulenmatrices eingesetzt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

Alle in dieser Arbeit benutzten Methoden wurden, soweit nicht anders vermerkt, aus Sambrook et al. (Sambrook 1989) entnommen oder in Anlehnung daran modifiziert. Die verwendeten Reagenzenkits wurden soweit nicht anders beschrieben, nach den Herstellerangaben eingesetzt.

3.2.1 Kultivierung von *E. coli* Zellen

E. coli Zellen wurden in Luria-Bertani-Medium nach folgender Rezeptur kultiviert:

LB (Luria-Bertani)-Medium	ad 1000 ml Wasser
1 % Bactotrypton	10 g
0,5 % Hefeextrakt	5 g
1 % NaCl	10 g

Das Medium wurde autoklaviert (20 min, 121°C) und bei RT gelagert. Für die Herstellung von LB-Agar-Platten wurden dem LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt, die Lösung wurde autoklaviert und auf sterile Petrischalen verteilt (25-30 ml/Platte). Dem LB-Agar-Medium wurde kurz vor dem Gießen der Platten Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml) hinzugegeben. Die LB-Agar-Platten wurden bei 4°C gelagert.

3.2.2 Eingesetzte *E. coli* Bakterienstämme

Folgende Bakterienstämme wurden von Novagen bezogen:

BL21(DE3) (<i>E. coli</i>)	Genotyp: F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3)
Rosetta TM (<i>E. coli</i>)	Genotyp: F ⁻ ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm pRARE (Cam ^R)
DH5a (<i>E. coli</i>)	Genotyp: F ⁻ φ80lacZΔM15 Δ(□lacZYA-argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ ⁻

3.2.3 Eingesetzte Vektoren

p-Gem-T	Klonierungsvektor (Promega)
pET21a	Prokaryotischer Expressionsvektor mit C-terminalen Hexa-His-tag (Novagen)
pCEP1T4	Eukaryotischer Expressionsvektor (Invitrogen)
pCEP1T4-Rho1D4	Modifizierter eukaryotischer Expressionsvektor mit einer C-terminalen Rhodopsin-1D4 Sequenz
pGEX-4T1	Prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalen GST-tag (GE Healthcare)
pMAL	Prokaryotischer Expressionsvektor mit N-terminalen MBP-tag (New England Biolabs)
pcDNA4HisMaxA	Eukaryotischer Expressionsvektor mit C-terminalen Hexa-His-tag (Invitrogen)

3.2.4 Transformation der Plasmid DNA in chemisch kompetente Bakterien

Zur Vervielfältigung von Plasmid DNA und für die rekombinante Proteinexpression wurden rekombinante Plasmide mittels Transformation in *E. coli* Zellen eingebracht. Die chemisch kompetenten *E. coli* Zellen (Kap. 3.2.18) wurden durch das Hitzeschockverfahren transformiert.

Ein Ligations Ansatz wurde in einem 110 µl Volumen durchgeführt:

100 µl kompetente Bakterienlösung (auf Eis aufgetaut)

10 µl Ligationsansatz oder 50 ng Plasmid DNA

30 min auf Eis inkubieren

60 sek bei 42°C (Hitzeschock)

2 min auf Eis inkubieren

+500 µl SOC-Medium

1 h bei 37°C schütteln

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

3.2.5 Herstellen von kryokonservierungsfähigen *E. coli* Zellen

Transformierte oder nicht-transformierte *E. coli* Zellen wurden zur Kryokonservierung in 15 % (v/v) Glycerol bei -80°C gelagert. Hierzu wurde jeweils eine 2 ml ÜN Kultur hergestellt, 100 µl dieser Kultur wurden in 730 µl LB-Medium für 3-5 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kultur mit 170 µl 85 % Glycerol gemischt und bei -80°C eingefroren.

3.2.6 Extraktion von Plasmid-DNA

Bakterielle Plasmid DNA wurde aus Bakterienkulturen isoliert, die über Nacht bei 37°C in LB-Medium kultiviert wurden. Zur Extraktion der Plasmid-DNA wurde ein kommerzielles Reagenzienkit verwendet, die auf der bei Sambrock et al. 1989 beschriebenen Methode der alkalischen Lyse beruht. Dabei werden Zentrifugationssäulen mit einer hohen DNA-Bindungsaffinität verwendet. Abhängig vom Volumen der Übernachtkulturen wurden unterschiedliche Kitgrößen eingesetzt. Die Plasmide der Bakterienkulturen von 1-5 ml

Volumen wurden mit Hilfe des Nucleospin Plasmid Kit's (Macherey-Nagel, Düren) isoliert und Kulturen mit einem Volumen von 100 ml wurden mit Hilfe des QIAfilterTMPlasmid Midi/Maxi Kit's (Qiagen, Hilden) isoliert.

3.2.7 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können Nukleinsäuren für analytische und präparative Zwecke der Größe nach in den horizontalen Gelapparaturen BlueMarine-200 (Serva, Heidelberg) getrennt werden. Es wurden Gele mit 0,7 – 2 % (w/v) Agarose eingesetzt. Die Agarose wurde in TAE Puffer aufgekocht bis sie vollständig gelöst war. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde die Lösung mit 0,00005 % (v/v) Ethidiumbromid versetzt und das Gel gegossen. Nach dem Erkalten der Agarose wurden die Proben aufgetragen, die zuvor mit 1/10 Volumen des entsprechenden Farbmarkers versetzt worden waren. Die DNA wurden abhängig von der Laufstrecke der erwarteten Bande mit Bromphenolblau-Puffer oder Xylencyanol-Puffer versetzt. Das Bromphenolblau migriert in einem Agarosegel auf der Höhe der kleinen DNA-Fragmenten und wurde bei großen PCR-Produkten eingesetzt. Das Xylencyanol dagegen wandert in der Elektrophorese auf der Höhe großer DNA-Fragmente und wurde daher bei kleinen PCR-Produkten eingesetzt. Die Elektrophorese wurde mit TAE als Laufpuffer bei 110 – 200 mA durchgeführt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und wurde durch die Bestrahlung mit UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht. Die Agarosegele wurden mit Hilfe der Dark Hood DH 30/32 (Biostep, Jahnsdorf) und der dazugehörigen Software Argus X1 dokumentiert.

Puffer Lösungen wurde wie folgt angesetzt:

TBE	89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na ₂ EDTA
Bromphenolblau-Puffer	0,05 g Bromphenolblau, 20 ml 87 % Glycerol, H ₂ O ad 50 ml
Xylencyanol-Puffer	0,05 g Xylencyanol, 20 ml 87 % Glycerol, H ₂ O ad 50 ml

3.2.8 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde entweder photometrisch oder visuell mit Hilfe von Agarosegelen (Kap. 3.2.7) bestimmt. Durch das NanoDrop® ND-1000 Photometer

(NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) wurde die Absorption (OD) von Nukleinsäurelösungen bei 230 nm, 260 nm und 280 nm berechnet. Aus dem Coeffizient der Absorbtion von 260 nm zu 280 nm wurde der Grad an Verunreinigung durch Proteine bestimmt. Die DNA gilt als rein wenn der Koeffizient über 1,8 liegt. Als weiterer Indikator für eine reine DNA Lösung wurde der Koeffizient der Absorbtion von 260 nm zu 230 nm gemessen, der Verunreinigungen durch Kohlenwasserstoffe oder Phenol anzeigt. Dieser Wert sollte zwischen 1,8 und 2,2 liegen. Die Konzentration der DNA wurde durch ihre Absorbtion bei 260 nm bestimmt. Für eine Messung wurden jeweils 2 µl verdünnter DNA-Lösung eingesetzt.

Alternativ wurde die DNA-Menge in einem Agarosegel mit Ethidiumbromid abgeschätzt. Nach der Elektrophorese wurde unter UV-Licht (312 nm) die Fluoreszenz-Intensität der Probe mit dem gleichzeitig aufgetragenen Größen- und Mengenstandard der 1 kb Plus DNA-Leiter (Invitrogen) verglichen und die Konzentration der Probe visuell bestimmt.

3.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 25 µl in PCR-Puffer mit 10-100 ng DNA; 0,4 µM vorwärts und rückwärts Primern (Metabion, Martinsried, Sigma-Aldrich); 1 U Taq Polymerase und 2,5 mM dNTPs (Peqlab, Erlangen) durchgeführt. Die Proben wurden für 30 Zyklen der PCR Technik amplifiziert, wobei jeder Zyklus aus einem Denaturierungsschritt für 30 sec bei 94°C, einem Anlagerungsschritt bei einer vorher ermittelten Anlagerungstemperatur für 30 sec und einem Verlängerungsschritt bei 72°C bestand. Eine Beschreibung aller Vorwärts- und Rückwärts-Primer findet sich im Anhang. Die Oligonukleotid-spezifische Anlagerungstemperatur wurde nach folgender Formel kalkuliert: Anlagerungstemperatur = [(2 x (A + T) + 4 x (C + G)) – 2°C]. Modifizierungen dieses Protokolls umfassen Änderungen in der Mg²⁺ Konzentration (1,0 mM oder 1,5 mM) oder Zugabe von 4 % Formamid.

PCR-Puffer	50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,0 mM MgCl ₂ ; 0,01 % Gelatine
------------	---

Die Taq-Polymerase synthetisiert DNA mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 kb/min. Dieser Wert wurde als Grundlage für die Kalkulation der Dauer des Verlängerungsschrittes verwendet. Für das Klonieren von PCR Produkten wurde eine DNA-Polymerase mit Lesekorrektur (proof-reading) Funktion und 3'-5' Exonuklease-Aktivität (PlatinumTM Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen) eingesetzt.

PCR Reaktion in 25µl Reaktionsvolumen:

2,5 µl 10x PCR-Puffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, 1,5mM MgCl₂, pH 8,3)

10-100 ng Template-DNA

0,4 µM je Primer

2,5 mM dNTPs

1 Unit DNA-Polymerase

Ad 25 µl dH₂O

PCR Programm:

96°C 2 min DNA-Denaturierung initiativ

96°C 30 sek DNA-Denaturierung

58°C 30 sek Primeranlagerung

72°C 1 min DNA-Replikation (1 min/1 kb)

} 25-32 Zyklen

72°C 5 min DNA-Replikation final

5°C Ende

3.2.10 Reinigung von PCR-Produkten

PCR Produkte (Kap. 3.2.9) wurden nach einer DNA-Gelelektrophorese aus dem Agarosegel (Kap. 3.2.8) gereinigt. Das PCR-Produkt wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) Kit's laut Herstellerangaben isoliert. Die Aufreinigung basiert auf der Affinitätschromatographie über Zentrifugationssäulen mit Silikat-Membran.

3.2.11 Verdau von DNA mit DNA-Endonukleasen

Für die Klonierung von PCR-Produkten in Expressionsvektoren wurden die 5' und 3' Enden des PCR-Produktes mit Schnittstellen von definierten Restriktionsendonukleasen (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) versehen. Die zur PCR eingesetzten Primer wurden um die entsprechenden Endonuklease-Schnittstellen erweitert. Je nach Endonuklease wurden überhängende DNA-Enden (*sticky ends*) mit 5' oder 3' Überhängen oder glatte DNA-Enden (*blunt ends*) ohne Überhänge generiert. Die Inkubationstemperatur, Puffer und Zeit wurden entsprechend den Herstellerangaben anwendet.

Restriktionsverdau in 50 µl Volumen:

1 µg DNA	}	10min – 3h bei 37°C
5 µl 10x Puffer		
0,5 µl BSA 100x (optional)		
1 µl Endonuklease		
Ad 50 µl dH ₂ O		

3.2.12 Plasmid-Vektor Dephosphorylierung

Die Klonierung von DNA-Produkten mit glatten Enden oder mit nur einer definierten Endonuklease-Schnittstelle erfordert, das Plasmid nach dem Restriktionsverdau zu

dephosphorylieren, um eine Re-Ligation des Vektors ohne eine Aufnahme der einzufügenden DNA (Insert) zu verhindern. Hierzu wurde das geschnittene Plasmid mit dem Enzym Phosphatase an den 5' Enden für 30 min bei 37°C dephosphoryliert. Es folgte bei 65°C die Hitzeinaktivierung der Endonuklease. Nach einer Aufreinigung (Kap. 3.2.10) wurden die dephosphorylierten Plasmide für die anschließende Ligation (Kap. 3.2.13) verwendet.

Plasmid Dephosphorylierung in 60 µl Volumen:

50 µl Restriktionsverdau (mit 1 µg geschnittener Plasmid DNA)	30 min bei 37°C 5 min bei 65°C
6 µl 10x Reaction Puffer Antarctic Phosphatase	
1 µl Antarctic Phosphatase (10 units/µl)	

Ad 60 µl dH₂O

3.2.13 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren

Für die Verknüpfung von Plasmidvektor und einzufügenden DNA-Inserts über eine Phosphatdiesterverknüpfung zwischen der 5'-Phosphat und 3' Hydroxylgruppe unter ATP Verbrauch, wurde die T4 DNA Ligase (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) verwendet.

Ligationsansatz in 10 µl Volumen:

50 ng linearisierter Vektor (ggf. dephosphoryliert)

150 ng geschnittenes PCR Fragment

1 µl 10x T4 Ligase Puffer

1 µl T4 DNA Ligase (400 units/µl)

Der Ansatz wurde 1-12 Stunden bei 14°C inkubiert.

3.2.14 Transformation chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen mit Plasmid-DNA

Die chemisch-kompetenten *E. coli* Bakterien (Kap. 3.2.18) wurden mit einem Plasmid transformiert, um entweder das Plasmid zu vervielfältigen und anschließend zu isolieren oder mit Hilfe des Plasmids ein Protein zu exprimieren. Je nach Aufgabe wurde ein dafür optimierter Bakterienstamm eingesetzt. Der Stamm DH5 α wurde regelmäßig für die Plasmid Vervielfältigung verwendet, während die Stämme BL21(DE3) und RosettaTM für die Expression von Proteinen benutzt wurden. Die Transformation wurde wie folgt durchgeführt:

- 100 μ l kompetente Zellen + 10 μ l Plasmid (1-10 ng DNA)
- 30 min auf Eis inkubieren
- Hitzeschock: 60 sek. 42°C
- 2 min auf Eis inkubieren
- + 500 μ l SOC-Medium
- 30–45 min bei 37°C inkubieren
- 100–500 μ l auf LB-Platte ausplattieren
- ÜN bei 37°C inkubieren

SOC-Medium	20 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 0,25 M KCl, 5 ml 2 M MgCl ₂ , 20 ml 1 M Glucose, ad 1 l mit H ₂ O, pH-Wert auf 7,0 einstellen
------------	--

Der Erfolg einer Transformation wurde mit Hilfe einer PCR (Kap. 3.2.9) einer einzelnen Bakterienkolonie überprüft. Hierzu wurden die einzelnen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und in 8 μ l LB-Medium resuspendiert. Jeweils 4 μ l wurden davon für eine PCR-Reaktion eingesetzt, die restlichen 4 μ l wurden bei 4°C aufbewahrt, um gegebenenfalls eine Kultur damit anzuimpfen.

3.2.15 Klonierung von PCR Produkten mit dem pGEM-T Vektorsystem

PCR-Produkte wurden erst in den pGEM-T Vektor kloniert, da dieser Vektor eine Blau/Weiss Selektion und eine ungerichtete Klonierung mit Hilfe eines Adenin-Überhangs ermöglicht. Der Vektor ist auf die Klonierung von Taq-Polymerase synthetisierter DNA-Produkte optimiert. Die Taq-Polymerase erzeugt einen Adenin-Überhang, der an den komplementären Tymin Überhang des pGEM-T Vektor binden kann.

T/A pGEM-T Vektor-Klonierung in 10 µl Volumen:

5 µl	2x Puffer	1 h bei RT
1 µl	pGEM-T Vektor	
3 µl	PCR Produkt	
1 µl	T4 DNA Ligase	

3.2.16 Gerichtete Mutagenese mittels PCR im DNA-Plasmid

Ein Austausch einzelner Nukleotide in einem rekombinanten Plasmid wurde mit Hilfe einer Amplifikation des Plasmids mittels PCR durchgeführt, indem die eingesetzten Primer die Mutation enthielten. Die eingesetzte PfuUltra™ High-Fidelity DNA-Polymerase (Stratagene) arbeitet nur bis zu einer Länge von 10 kBp effizient. Um daher die Größe des Plasmids mit dem zu mutierenden DNA-Fragment möglichst klein zu halten wurde es in den pGEM-T Vektor kloniert. Die Primer mit der Mutation wurden so entworfen, dass der Nukleotidaustausch jeweils von 15 bp flankiert wurde. Das DNA-Fragment im pGem-T Vektor wurde dann mit den Mutagenese-Primern in einer PCR Reaktion eingesetzt.

Die PfuUltra™ High-Fidelity DNA-Polymerase polymerisiert die DNA ohne sie zu methylieren. Das für die PCR eingesetzte Plasmid ist jedoch methyliert, da es zuvor aus *E. coli* Zellen isoliert wurde. Nach der PCR wurde die Endonuklease Dpn1 (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) zum PCR-Ansatz hinzugegeben. Das Dpn1 verdaute das methylierte Originalplasmid, nicht jedoch das Plasmid mit der Mutation. Der PCR-Ansatz wurde nach

dem Dpn1 Verdau auf ein Agarosegel aufgetragen und das Plasmid wurde aus dem Agarosegel isoliert. Anschließend wurde das Plasmid mit der Mutation in DH5a *E. coli* Zellen transformiert, 5 ml Kulturen der einzelnen Kolonien angesetzt und das daraus gewonnene Plasmid sequenziert.

PCR Mutagenese in einem 25 µl Ansatz:

2,5 µl	10x Puffer PfuUltra
2 µl	dNTP's
0,3 µM	je Primer
20 ng	Template-DNA
0,5 µl	PfuUltra™ High-Fidelity DNA-Polymerase
Ad 25 µl H ₂ O	

PCR Programm:

95°C	30 sek	DNA-Denaturierung initiativ
95°C	30 sek	DNA-Denaturierung
55°C	1 min	Primeranlagerung
68°C	4,5 min	DNA-Replikation (1 min/1 kb)

} 20-24 Zyklen

10°C Ende

Zugabe von 2,8 µl Puffer 4 und 1 µl Dpn1. Inkubation für 60 min bei 37°C.

3.2.17 Sequenzierung von DNA nach Sanger

PCR-Produkte oder Plasmid-DNA wurden basierend auf der Kettenabbruch-Synthese mittels fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide (ddNTPs) sequenziert (Sanger et al. 1977). In einer PCR-Reaktion mit nur einem eingesetzten Primer wird die DNA amplifiziert. Die Synthese der DNA-Kette wird durch den Einbau eines fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleotids abgebrochen (*cycle sequencing* Reaktion). Der Einbau der ddNTPs erfolgt zufällig, so wird eine heterogene Mischung an PCR-Fragmente unterschiedlicher Länge mit entsprechender ddNTP Fluoreszenzmarkierung am 3'-Ende des DNA-Strangs gebildet. Die PCR-Produkte wurden mit 3 M Natrium Acetat präzipitiert, mit Ethanol gewaschen und in 10 µl Formamid aufgenommen. Die PCR-Produkte wurden ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch in Glaskapilliaren des Sequenzierautomaten 3130x1 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt und die Identität der 3'-Endnukleotide parallel zur Migrationsgeschwindigkeit mit einem Laser und Detektor mittels Fluoreszenz erfasst. Die vier verwendeten ddNTPs sind mit verschiedenen Fluorochromen markiert, wodurch sich die Basensequenz des DNA-Fragments ableiten lässt. Die Daten der Sequenzierung wurden mit dem Programm Chromas Version 2.23 (Technelysium) dargestellt.

Cyclesequencing-Reaktion in 10 µl Volumen:

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

Cyclesequencing-Programm:

96°C 5 min DNA-Denaturierung initiativ

96°C 30 sek DNA-Denaturierung

58°C 30 sek Primeranlagerung

60°C 4 min DNA-Replikation

5°C Ende

} 29 Zyklen

Cyclesequencing-Produkt-Preipitation:

10 µl Cyclesequencing-Produkt

10 µl 3M NaAc pH 4,7

80 µl H₂O

Zentrifugation 16.000 x g für 20 min

Überstand verwerfen

250 µl 100 % EtOH

Zentrifugation 16.000 x g für 10 min

Überstand verwerfen

300 µl 75 % EtOH

Zentrifugation 16.000 x g für 10 min

Überstand verwerfen

Pellet in 10 µl Formamid lösen

3.2.18 Herstellen chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

Kompetente Zellen wurden nach einer modifizierten Form der CaCl₂-Methode (Mandel & Higa 1970; Mandel & Higa 1992) hergestellt. Eine 300 ml *E. coli*-Bakterienkultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ von ~0,4 inkubiert, schnell auf Eis abgekühlt und anschließend zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, 4°C). Bei den nachfolgenden Arbeitsschritten wurden ausschließlich vorgekühlte Gefäße und Lösungen verwendet. Das Bakterien-Pellet wurde in 15 ml Puffer 1 aufgenommen und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zentrifugiert (10 min, 5.000 x g, 4°C) und in 15 ml Puffer 2 resuspendiert. Die Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1 30 mM K Acetat, 50 mM MnCl₂, 100 mM CaCl₂, 15 % (w/v) Glycerin

Puffer 2 10 mM Na-MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % (w/v) Glycerin

3.2.19 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

Eukaryotische Zellen wurden bei 37°C mit gesättigter Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ Atmosphäre kultiviert. Das Medium der Zellen enthielt 100 units/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Alle Zelllinien wurden vor Erreichen von 100 % Konfluenz mittels tryptischen Verdaus (0,05 % Trypsin, 0,5 mM EDTA in PBS) passagiert.

3.2.20 Transfektion von HEK-293 EBNA Zellen

Die HEK-293 EBNA Zellen sind eine immortalisierte, menschliche embryonale Nierenzelllinie, die sich hervorragend für die Überexpression von Proteinen eignet. Die Proteinexpression dieser Zelllinie wurde durch Expressionsvektoren auf Basis des „EBV-nuclear antigens“ (EBNA) optimiert. Der verwendete pCEP4 Vektor ist ein hierfür optimierter Expressionsvektor. Die Transformation erfolgte nach der Ca₂PO₄-Methode. In einem Volumen von 370 µl wurden 4 – 10 µg Plasmid in Wasser gelöst, 123 µl 1 M CaCl₂ hinzu pipetiert und anschließend unter schwachem Vortexen tropfenweise mit 2x BBS-Puffer versetzt. Das Gemisch wurde dann 20–30 min bei RT inkubiert und tropfenweise zu den

Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale pipetiert. Nach 6 bis 14 Stunden wurde das Medium der Zellen durch Medium mit 1 - 10 % FCS ausgetauscht. Die Zellen bzw. ihr Medium wurde nach 2–3 Tagen für die Experimente eingesetzt.

2x BBS	50 mM BES (Sigma-Aldrich, B4554), 280 mM NaCl, 1,4 mM Na ₂ PO ₄ , den pH-Wert exakt auf 6,95 eingestellt
--------	---

3.2.21 Herstellung RS1 stabil exprimierender HEK-293 EBNA Zellen

Die Charakterisierung des Retinoschisins erforderte eine biologische Quelle für ein korrekt gefaltetes und funktionsfähiges Protein. Zur Reinigung des nativen RS1 aus Schweine- oder Rinder-Netzhäuten mangelte es an der verfügbaren Anzahl von Augen. Deshalb wurden mit dem pCEP4 Vektor transfizierte HEK-293 EBNA Zellen als Quelle für das Retinoschisin verwendet. Um eine maximale und konstante Expression des rRS1 zu erhalten, wurden die transfizierten Zellen selektioniert und auf die dauerhafte Expression des rRS1 überprüft. Der pCEP4 Vektor enthält ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Hygromycin B, mit dem die transfizierten HEK-293 EBNA Zellen selektioniert wurden. Zuerst wurde die Effektivität des Hygromycin B ermittelt, dafür wurden nicht-transfizierte Zellen bei unterschiedlichen Konzentrationen von Hygromycin B kultiviert. Es wurde eine Konzentrationsreihe von 0 bis 1000 µg/ml Hygromycin B in 100 µg/ml Schritten durchgeführt. Die Zellen überlebten bei einer Konzentration von 300 µg/ml Hygromycin B drei Tage, dem entsprechend müssen transfizierte Zellen länger als drei Tage überleben. Daraufhin wurden HEK-293 EBNA Zellen mit dem pCEP4 Vektor nach der Ca₂PO₄-Methode transfiziert (Kap. 3.2.20). Am folgenden Tag wurde das Medium gegen ein Medium mit 300 µg/ml Hygromycin B ausgetauscht und für sechs Tage inkubiert. Jeden zweiten Tag wurde das Medium mit den toten Zellen gegen ein frisches Medium ausgetauscht. Nach den sechs Tagen wurden die Anzahl der Zellen mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer (Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen) bestimmt und mit Hygromycin B freien Medium in 96-well Platten vereinzelt. Nach 5 Tagen wurden die Zellen wieder für 8 Tage in Hygromycin B-haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die überlebenden Zellen in 6-well Platten kultiviert und die Expression des rRS1 durch eine immunocytochemische Fluoreszenz-Färbung (Kap. 3.3.6) überprüft (Abb.7).

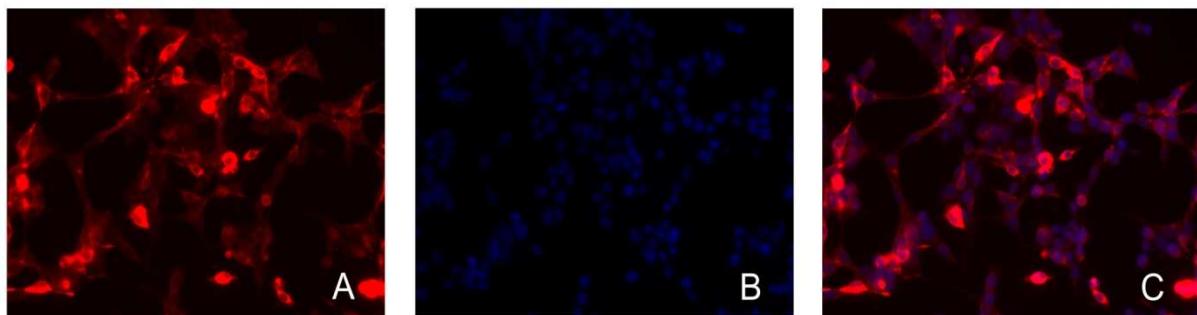


Abb.7: Immunochemische Fluorezenz-Färbung der rRS1 stabil exprimierenden HEK-293 EBNA Zellen.
A) Detektion des rRS1 in den HEK-293 EBNA Zellen mit dem α RS1p und dem anti-Kaninchen Antikörper Alexa-594 (rot). **B)** Färbung der Zellkerne durch DAPI. **C)** Überlagerung der Bilder A und B.

Die selektionierten HEK-293 EBNA Zellen zeigen bei der immunocytochemischen Färbung eine Lokalisation des rRS1 im Cytosol. Dem entsprechend exprimieren alle Zellen das rRS1.

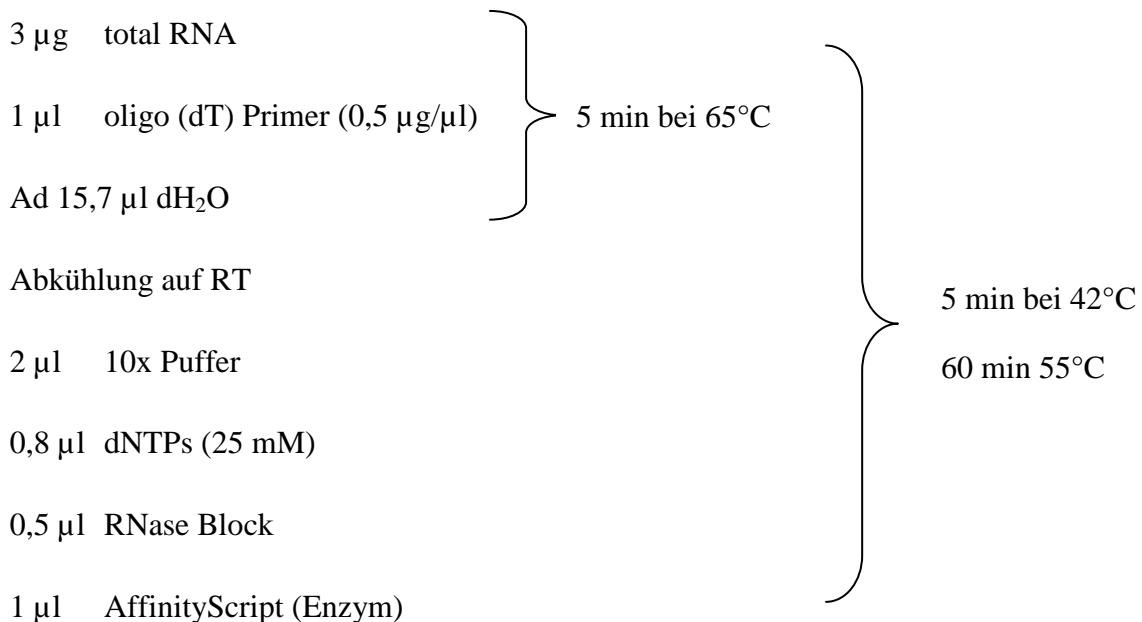
3.2.22 RNA-Isolierung aus humanem Gewebe

RNA aus humanem Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Für die Zerkleinerung des Gewebes wurde das QIAshredder Kit (Qiagen) eingesetzt.

3.2.23 cDNA-Synthese mit reverser Transkriptase

Zur Synthese der cDNA wurde das AffinityScript™ Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene) und oligo (dT) Primer verwendet, die komplementär an den poly-(Adenin) Schwanz der mRNA binden können und als Synthese-Startpunkt für die Polymerase fungieren.

cDNA Synthese Ansatz in 20 µl Volumen:



Sequenz des oligo(dT)12-18 Primers

5'GGCCACCGCGTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTT'3

3.2.24 Extraktion genomischer DNA aus Gewebe

Die genomische DNA wurde aus frisch entnommenem Gewebe isoliert. Das verwendete Gewebe wurde in 250 µl Laird's Lysis Puffer mit 10 µl 20 % SDS und 10 µl 10 mg/ml Proteinase K aufgenommen und bei 65°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die unverdauten Zellreste abzentrifugiert (13.000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 250 µl Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde solange invertiert bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Anschließend wurde die enthaltene DNA durch Zentrifugation (13.000 x g, 10 min, RT) pelletiert. Das Isopropanol wurde dekantiert und 300 µl 75 % Ethanol hinzupipettiert. Daraufhin wurde die Probe zentrifugiert (13.000 x g, 10 min, RT). Das Waschen mit 300 µl 75 % Ethanol wurde wiederholt, zuletzt wurde das Ethanol verworfen und die getrocknete DNA in 100–200 µl H₂O aufgenommen.

Laird's Lysis Puffer 0,2 M NaCl; 0,1 M Tris-HCl, pH 8,3; 5 mM Na₂EDTA

3.2.25 Genotypisierung der RS1-knock-out-Maus

Die RS1h-defiziente ($RS1h^{-Y}$) Maus wurde am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg generiert und befinden sich in einer Barrierefaltung (Weber et al. 2002). Zur Generierung der $RS1h^{-Y}$ Maus wurde durch homologe Rekombination eine lacZ-neo Kassette in das Exon 3 eingefügt (Abb.8). Die lacZ-neo Kassette beinhaltet das beta-Galaktosidase Reporter Gen (*lacZ*) und das Neomycin Resistenz-Gen unter der Kontrolle des Maus Phosphoglycerat Kinase (*Pgk*) Promotors. Die hemizygoten $RS1h^{-Y}$ Mäuse weisen mehrere phänotypische Gemeinsamkeiten mit der menschlichen XRS auf, u.a. ein negatives ERG, zystenähnliche Strukturen, eine Schisis der inneren retinalen Strukturen, und Störungen der synaptischen Verbindungen zwischen Photorezeptoren und Bipolarzellen. Die apoptotisch bedingte Degeneration der Photorezeptorzellen lässt sich postnatal ab Tag P14 nachweisen und zeigt eine Verkürzung der inneren und äußeren Segmente der Photorezeptorzellen. In Folge der Degeneration sind nach einem Jahr mehr als die Hälfte der Photorezeptoren abgebaut.

Aus der Schwanzspitze von 10–12 Tage alten $RS1h^{-Y}$ Mäusen wurde die genomische DNA isoliert (Kap. 3.2.24) und mit Hilfe der PCR wurden der Genotyp und das Geschlecht der Mäuse bestimmt. Das Geschlecht junger Mäuse ist mit bloßem Auge schwierig zu bestimmen, deshalb wurde das „*sex determining region Y*“-Gen (*SRY*) mit Hilfe der PCR nachgewiesen. Das *SRY*-Gen ist auf dem Y-Chromosom lokalisiert und kodiert für einen Transkriptionsfaktor der zur Entwicklung der Hoden benötigt wird. Nur männliche Mäuse besitzen das *SRY*-Gen. Die $RS1h^{-Y}$ -Maus wird von der Wildtyp-Maus durch das eingefügte *LacZ*-Gen unterschieden. Das Primerpaar rsc3F/rsmint3R amplifiziert ein Wildtyp spezifisches Exon 3/Intron überspannendes DNA-Fragment von 190 bp, das Primerpaar rsc3F/LacZR2 amplifiziert ein $RS1h^{-Y}$ -spezifisches Exon 3/*LacZ*-Gen überspannendes DNA-Fragment von 300 bp (Abb.9).

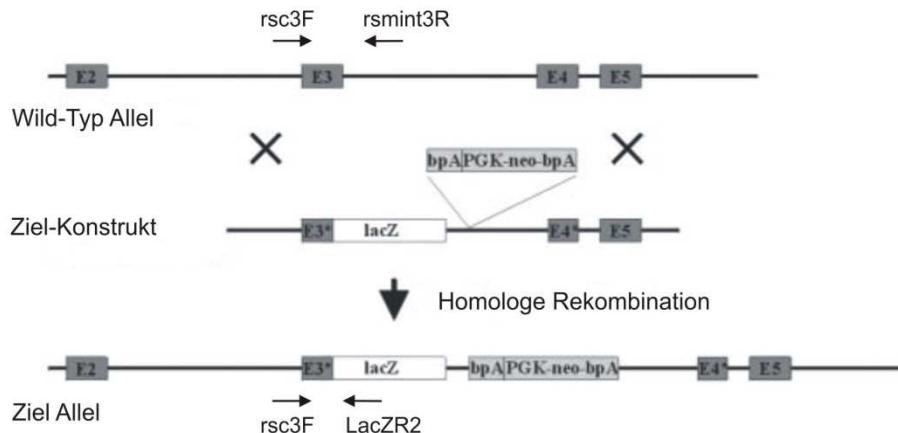


Abb.8: Herstellung der RS1-KO Maus. Das Wildtyp Allel des *RS1* Gens wurde unterbrochen durch das Einfügen des *LacZ*-Gens mit einer neo-Kassette. Die Exone 2 bis 5 des *RS1*-Gens sind als E2-E5 bezeichnet. Die Primer die zur Genotypisierung der Mäuse eingesetzt wurden und deren Position im Genom, sind durch Pfeile markiert. Der rsc3F Primer bindet im Exon 3 des *RS1*-Gens, während der Primer rsmint3R im Intron des *RS1*-Gens und der Primer LacZR2 im *LacZ*-Gen bindet. Die Abbildung wurde modifiziert aus Weber et al. 2002.

Da das *RS1*-Gen auf dem geschlechtsspezifischen Anteil des X-Chromosoms lokalisiert ist, besitzen männliche Mäuse nur ein Allel und zeigen deshalb entweder ein PCR-Produkt mit den Wildtyp-spezifischen Primeren rsc3F/rsmint3R oder der RS1^{h/Y}-spezifischen Primern rsc3F/LacZR2. Weibliche Mäuse besitzen zwei X-Chromosomen und somit zwei Allele. Sie amplifizieren nur ein PCR-Produkt für das Wildtyp-Allel mit den rsc3F/rsmint3R Primern, heterozygote Tiere zeigen je ein Produkt bei beiden Primerpaaren und homozygote Tiere zeigen nur ein PCR-Produkt bei den rsc3F/LacZR2-Primern.

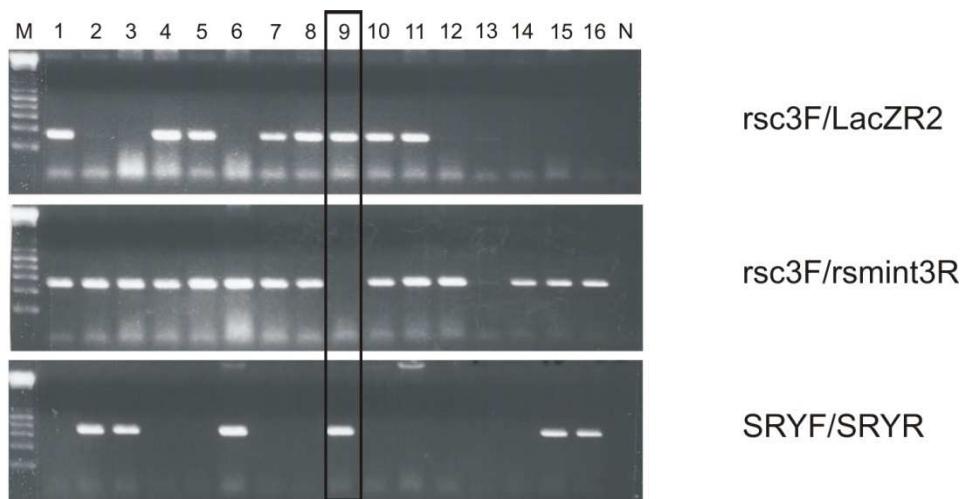


Abb.9: Agarosegele einer PCR zur Genotypisierung von 16 Mäusen (1-16). Der obere Abschnitt zeigt das beta-Galaktosidase Reportergen PCR-Produkt des rsc3F/LacZR2 Primerpaars. Im mittlern Abschnitt sind die PCR-Produkte des Wildtypspezifischen rsc3F/rsmint3R Primerpaars dargestellt und im unteren Abschnitt sind die PCR-Produkte der geschlechtsspezifischen SRYF/SRYR Primerpaars abgebildet. Die Maus Nr.9 ist eine männliche hemizygote RS1h^{-Y} Maus, da sie ein PCR-Produkt beim *LacZ*- und *SRY*-Gen zeigt jedoch keins beim wildtypspezifischen Primerpaar. Die 1-Kb-Plus DNA-Leiter ist mit einem M und die Leer-Kontrolle mit einem N beschriftet.

PCR Reaktion in 25 µl Reaktionsvolumen:

2,5 µl	10x Puffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl ₂ , pH 8,3)
100 ng	Template-DNA
0,4 µM	je Primer
2,5 mM	dNTPs
1 Unit	DNA-Polymerase
Ad 25 µl	dH ₂ O

PCR Programm:

96°C 5 min DNA-Denaturierung initiativ

96°C 30 sek DNA-Denaturierung

58°C 30 sek Primeranlagerung

72°C 45 sek DNA-Replikation (1 min/1 kb)

72°C 5 min DNA-Replikation final

5°C Ende

29 Zyklen

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Verwendete rekombinante Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine wurde in prokaryotischen *E. coli* und in eukaryotischen HEK 293 EBNA Zellen durchgeführt. Die rekombinant exprimierten Proteine wurden fast ausschließlich mit einer spezifischen Aminosäuresequenz (*tag*) fusioniert (Kap. 3.2.3), um die Proteine mit Hilfe eines *tag*-spezifischen Antikörpers nachzuweisen. Eine Ausnahme war das Retinoschisin, gegen das spezifische polyklonale Antikörper vorhanden waren. Alle eingesetzten Proteine entsprechen jeweils der humanen Form.

Rekombinant exprimierte Proteine in *E. coli*:

rARMS2-His *Age-related maculopathy susceptibility 2* (ARMS2) mit einem C-terminalen hexa-Histidin-*tag* (His)

rARMS2-GST *Age-related maculopathy susceptibility 2* (ARMS2) mit einem N-terminalen Glutathion-S-Transferase-*tag* (GST) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Barbara Bathke, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).

rARMS2-MBP	Altersabhängige Makuladegeneration suszeptibilitäres Protein 2 (ARMS2) mit einem N-terminalen Maltose-Binde-Protein- <i>tag</i> (MBP) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Barbara Bathke, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).
rTIMP2-His	Gewebeinhibitor des Metalloproteasen-2-Proteins (TIMP2) mit einem C-terminalen hexa-Histidin- <i>tag</i> (His) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Marton Furgarasie, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).
<p>Rekombinant exprimierte Proteine in HEK-293 EBNA Zellen mit einem C-terminalen Rho-1D4-<i>tag</i>:</p>	
rTTR	Transthyretin (TTR) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andrea Gehrig, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).
rHMFG8	Milchfett globulärer-EGF Faktor 8 (HMFG8) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Andrea Gehrig, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).
rDDR2_AS1-400	Aminosäuren (AS) 1 bis 400 des Discoidin Domäne Rezeptors 2 (DDR2_AS1-400) [Kloniert von Marton Furgarasi]
rATP1A3	$\alpha 3$ -Untereinheit der Na/K-ATPase (ATP1A3)
rATP1B2	$\beta 2$ -Untereinheit der Na/K-ATPase (ATP1B2)
r $\beta 2$ _AS1-239	Aminosäuren (AS) 1 bis 239 der Na/K-ATPase $\beta 2$ -Untereinheit ($\beta 2$ _AS1-239)

Rekombinant expreimierte Proteine in HEK-293 EBNA Zellen:

rRS1	Retinoschisin (RS1); oktameres Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Robert Molday, Universität British Columbia, Vancouver, Kanada).
rRS1_C59S/C223S	Retinoschisin Cystein-Mutante; dimeres Protein (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Robert Molday, Universität British Columbia, Vancouver, Kanada).
rRS1_C40S/C59S/C223S	Retinoschisin Cystein-Mutante; monomers Protein (Alle im pCEP1T4)
rARMS2-His_e	ARMS2 mit einem C-terminalen Hexa-His-tag (Vektor: pcDNA4HisMaxA) (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ulrike Friedrich, Institut für Humangenetik, Universität Regensburg).

3.3.2 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford (1976)

Die Protein-Konzentration wurde nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt. Dazu wurden je 800 µl Proteinlösung (1-10 µg Protein) mit 200 µl Rotiquant Färbereagenz (Carl Roth) versetzt. Als Referenz wurden 800 µl H₂O mit der Färbereagenz eingesetzt. Die Extinktion der Lösung wurde nach 10 min bei 595 nm bestimmt. Die Protein-Konzentration wurde anhand einer Kalibriermessung mit Rinderserum-Albumin (Sigma-Aldrich) ermittelt. Im linearen Bereich der Kalibrierungskurve (1-5 mg/ml) entspricht eine OD₅₉₅ von 0,3654 ca. 1 mg/ml Protein.

3.3.3 Gelelektrophorese, Transfer und Immobilisierung von Proteinen

Die Proteine wurden elektrophoretisch in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt (SDS-PAGE, (Laemmli 1970)). Die SDS-PAGE wurde in einer Gelkammer SE 600 (GE Healthcare) durchgeführt. Die Proben wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und bei 60 mA elektrophoretisch im Laufpuffer aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde bis zum Auslaufen des Bromphenolblaus durchgeführt. Die Proteine in analytischen Gelen wurden entweder mit Coomassie-Blau gefärbt, oder nach Towbin (Towbin et al. 1979) auf PVDF-Membranen (Millipore) transferiert. Der Transfer der Proteine (Western Blot) wurde nach Herstellerangaben mit einem Transblot SD Semidry Transfer Cell Elektroblotter-System (BioRad, München) und Towbin Puffer (Towbin et al. 1979) im Halbtrockenverfahren durchgeführt. Die Transferzeit betrug 50 min bei 1,5 mA/cm² Gelfläche.

SDS-Probenpuffer	Endkonzentration: 1,6 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 15 % Glycerin; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau
Laufpuffer	192 mM Glycin; 25 mM Tris; 0,1 % (w/v) SDS
Coomassie-Blau	30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blue R
Towbin Puffer	250 mM Tris-HCl pH 8,6, 190 mM Glycin,

Als Größenstandard bei der SDS-PAGE diente der PageRuler™ Prestaind (Fermentas, St. Leon-Rot).

3.3.4 Immunologischer Nachweis von immobilisierten Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurden die PVDF-Membranen mit 0,5 % Magermilchpulver (Carl Roth) in PBS, 60 min bei RT oder über Nacht bei 4°C, abgesättigt. Anschließend wurde die Membran 1 h mit dem primären Antikörper in PBS mit

0,05 % (v/v) Tween-20 (PBS-T) inkubiert. Der Antigen-Antikörperkomplex wurde nach dem Waschen mit PBS-T für 60 min mit einem sekundären Antikörper (Verdünnung 1:10.000–1:30.000 in PBS-T, Calbiochem) inkubiert, an den das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt war. Nach 30 minütigem Waschen mit PBS-T wurden die Proteine erst mit der Chemolumineszenz-Lösung (www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick81.html) (Kap. 3.3.5) auf Röntgenfilmen nachgewiesen. Beim keinen oder zu schwachen Signalen wurde das SuperSignal® West Femto (Thermo Scientific) eingesetzt. Die immobilisierten Proteine wurden nachträglich mit Coomassie-Blau gefärbt.

PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Coomassie-Blau	30 % (v/v) Ethanol; 10 % (v/v) Essigsäure; 0,2 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blue R

In dieser Arbeit wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- αRho1D4: polyklonaler Antikörper aus Maus gegen das Rhodopsin. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Robert Molday (Universität British Columbia, Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt.
- αRS1p: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das Retinoschisin. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Robert Molday (Universität British Columbia, Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt, dort bezeichnet als pAB-apRS1 (Weber et al. 2002).
- αRS1m: monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen das Retinoschisin. Der Antikörper wurde freundlicherweise von Prof. Robert Molday (Universität British Columbia, Vancouver, Kanada) zur Verfügung gestellt, dort bezeichnet als RS1 3R10 (Weber et al. 2002).
- αATP1A3: monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die α3-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase (Cat.No.: ab2826, Biozol, Eching)
- αATP1B2: monoklonaler Antikörper aus Maus gegen die β2-Untereinheit der Na⁺/K⁺-ATPase (Cat.No.: 610915, BD Biosciences Europe Erembodegem, Belgien)

- α Penta-His: monoklonaler Antikörper aus Maus gegen ein Motiv aus fünf Histidin Aminosäuren (Quiagen, Hilden).
- α ARMS2: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen das ARMS2 Protein, in Zusammenarbeit mit Matthias Reinhardt (ImmunoGlobe Antikörpertchnik GmbH, Himmelstadt) hergestellt.
- α ERK1/2: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen ERK1 (pThr²⁰²/pTyr²⁰⁴) und ERK2 (pThr¹⁸⁵/pTyr¹⁸⁷) (Sigma-Aldrich, E7028)
- α GST: polyklonaler Antikörper aus Kaninchen gegen die Glutathion-S-Transferase (Sigma-Aldrich)
- α MBP: monoklonaler Antikörper aus Maus gegen das Maltose-Binde-Protein (New England Biolabs, E8032S)

3.3.5 Chemolumineszenz-Lösung zur Proteindetektion im Western Blot

Chemolumineszenz ist eine chemische Reaktion bei der Licht emittiert wird. Dieses Licht wird bei einem immunologischen Nachweis zur Detektion von Proteinen benutzt. Die bekannteste Methode ist die Chemilumineszenzreaktion des Luminols mit Hilfe der Meerrettichperoxidase (HRP) in Gegenwart von H₂O₂. Die Herstellung der Chemolumineszenz-Lösung wurde aus dem Laborjournal online (www.laborjournal.de/rubric/tricks/tricks/trick81.html) entnommen:

Puffer 1 2 ml

Puffer 2 200 µl

35 % H₂O₂ 0,6 µl

Die Lösung wurde zur Blot-Membran gegeben, 30–60 sek. inkubiert und anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert.

Puffer 1 50 mg Luminol (Sigma-Aldrich, A4685) gelöst in
0,1 M Tris-HCl pH 8,6

Puffer 2 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure
(Sigma-Aldrich, C9008) gelöst in 10 ml DMSO

3.3.6 Immunocytochemie bei eukaryotischen Zellen

Die Proteinexpression transfizierter Zelle wurde zusätzlich zum Western Blotting durch Immunocytochemie überprüft. Vor dem Passagieren der Zellen in eine frische Kulturschale wurden Deckgläschen (15 mm Durchmesser, Carl Roth) hinzugelegt. Wenn die Zellen zu 50–80 % konfluent waren, wurden sie transfiziert (Kap. 3.2.20) und zwei Tage später für die Immuncytochemie eingesetzt. Die Deckgläschen mit den adherierten Zellen wurden in eine 24-well Platte überführt und mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch die Inkubation für 10 min in 4 % (w/v) Paraformaldehyd auf dem Deckgläschen fixiert. Danach wurden die Zellen erst zweimal mit PBS gewaschen, dann 30 min in der Blockierlösung inkubiert und daraufhin 1 h in der 1. Antikörperlösung (1:100–1:300) inkubiert. Nach dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS wurden sie in der 2. Antikörperlösung (Alexa-488 grün, Alexa-594 rot, Antikörperverdünnung 1:800, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) 30 min inkubiert. Durch die anschließende Inkubation von 10 min mit 0,1 µg/ml DAPI Lösung (4',6-Diamidino-2-phenylindol, DAPI, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) wurden die Zellkerne angefärbt, wodurch die Transfektionseffizienz und die Lokalisierung von Proteinen besser bestimmt werden kann. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg) eingebettet und mit dem Axioskop2-Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen) analysiert.

PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Blockierlösung	10 % (v/v) Ziegenserum, 0,3 % (v/v) Triton X-100 in PBS
1. Antikörperlösung	2,5 % (v/v) Ziegenserum, 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
2. Antikörperlösung	2,5 % (v/v) Ziegenserum, 0,1 % (v/v) Triton X-100 in PBS

3.3.7 Bindung des rRS1 an Gewebe der RS1-*knock-out* Maus

Eine 14 Tage alte RS1-*knock out* Maus (RS1-KO-Maus) wurde mit CO₂ betäubt, durch Genickbruch getötet und Gehirn, Herz, Niere, Leber, Lunge und Netzhaut entnommen. Die Gewebe wurden umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -80°C gelagert. Für ein Experiment wurde das rekombinante RS1 Protein (rRS1) aus dem Medium der stabil exprimierenden RS1 bzw. transfizierter HEK-293 EBNA Zellen verwendet (Kap. 3.2.20). Das Medium der RS1 HEK-293 EBNA Zellen wurde bei 70-80 prozentiger Konfluenz gegen ein FCS freies Medium ausgetauscht. Nach drei Tagen wurde das Medium abgenommen und durch Zentrifugieren bei 1.000 x g für 10 min von den Zellen separiert, anschließend wurde die rRS1-Proteinmenge mit Hilfe eines Western Blots abgeschätzt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C und jede Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min durchgeführt. Für ein Experiment wurden fünf RS1-KO-Maus Netzhäute oder 15 mg Gewebe in 300 µl PBS homogenisiert und bei jedem Arbeitsschritt wurde ein 30 µl Aliquot abgenommen (Abb.10 Schritt 1, M1). Das Homogenisat wurde zentrifugiert und der Überstand abgenommen (Abb.10 Schritt 2, S1), anschließend wurde das Pellet wieder in 300 µl Medium mit rRS1 resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert (Abb.10 Schritt 3, M2). Nach der Inkubation wurde das Homogenisat wieder zentrifugiert (Abb.10 Schritt 4, S2) der Überstand dekantiert und das Pellet in 300 µl PBS resuspendiert (Abb.10 Schritt 5, M3). Gegebenenfalls wurde das Pellet nochmals zentrifugiert, der Überstand abgetrennt (entspräche S3) und das Pellet erneut in PBS resuspendiert (entspräche M4). Die einzelnen Aliquots wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für einen Western Blot eingesetzt.

SDS-Probenpuffer

Endkonzentration: 1,6 % (w/v) SDS; 1 % (v/v)

β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 15 % Glycerin;
0,003 % (w/v) Bromphenolblau

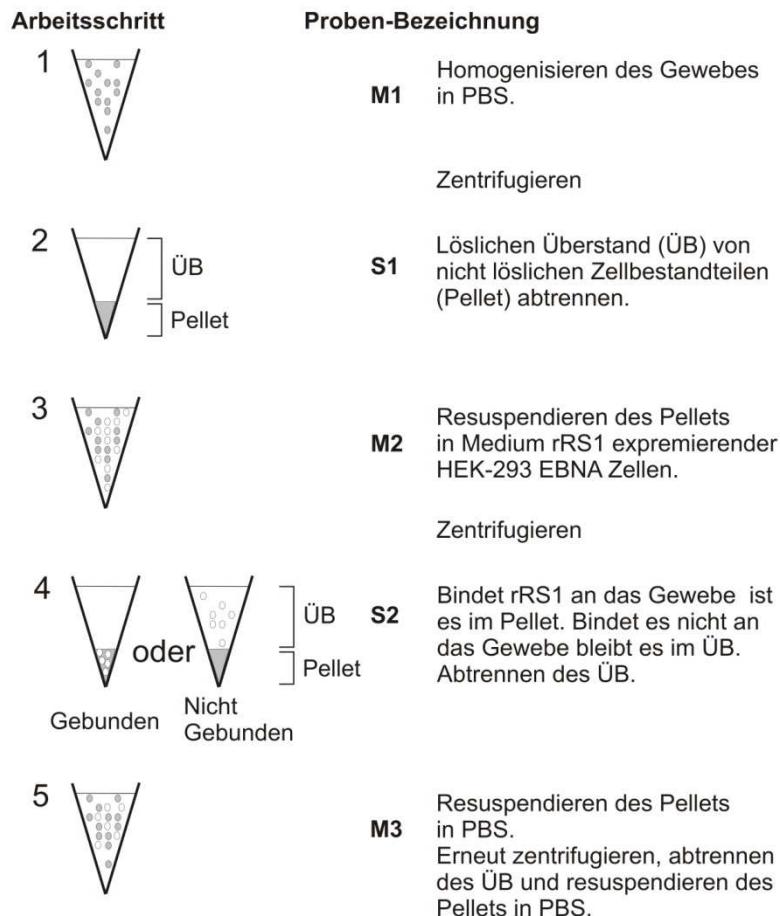


Abb.10: Darstellung der einzelnen Arbeitsschritte zur Überprüfung der Bindung von rRS1 an Gewebe der RS1-KO-Maus.

Das Experiment wurde modifiziert indem RS1-Cystein-Mutanten anstelle des Wildtyp RS1 Proteins eingesetzt und/oder Peptide bzw. Monosaccharide zugesetzt wurden. Die Peptide und Monosaccharide wurden eingewogen und in dem Medium RS1 exprimierender HEK-293 EBNA Zellen gelöst. Die verwendeten Peptide wurden von der Firma PANATecs GmbH (Tübingen) mit > 80% Reinheit synthetisiert. Die Aminosäuresequenz der Peptide entspricht denen der RS1 *Spikes* 1–3. Das Peptid mit einer zufälligen Aminosäuresequenz des *Spike* 3 wird als *Random*-Peptid bezeichnet.

Peptide 1 (AS 87-96): EQYVGWYSSW

Peptide 2 (AS 107–117): GFGCAWLSKFQ

Peptide 3 (AS 141-148): RCDIDEWM

Random: DEMCRIWD

3.3.8 ELISA: Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an unilaminare Phospholipide

Die Bindung von rRS1, rTTR und rHMFG8 an Phospholipide wurde nach der modifizierten Methode von Andersen und Mitarbeiter (2000) durchgeführt. Bei dieser Methode werden 96-well Platten mit Phospholipiden beschichtet. Die noch „freie“ Oberfläche der wells wird durch das BSA (*bovine serum albumin*) Protein abgesättigt und anschließend werden die Phospholipide mit den zu untersuchenden Proteinen inkubiert. Das nicht an die Phospholipide gebundene Protein wird durch PBS weggeschüttet und das gebundene Protein wird durch Zugabe eines spezifischen primären Antikörpers (1. Antikörper) und einen 1. Antikörper spezifischen sekundären Antikörpers (2. Antikörper) detektiert. Der 2. Antikörper ist mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt, dieses Enzym setzt ein Substrat in einer Farbreaktion um. Die Menge an umgesetztem Substrat kann anschließend mit Hilfe eines Photometers quantifiziert werden.

Getestet wurde die Bindung der oben genannten Proteine an Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylserin (PS), Phosphatidylethanolamin (PE) und einem Gemisch aus Lipiden (Lipid Mix), das aus Hühnereigelb isoliert wurde. Der Lipid Mix enthält ca 60 % PC, ca 35 % PE und 5 % PS. Die Phospholipide wurden in einem Gemisch aus 70 % Methanol und 30 % Chloroform in einer Gesamtkonzentration von 10 µg/ml gelöst. Jeweils 100 µl eines Phospholipid-Gemisches wurden in ein well einer 96-well MaxiSorp Platte (Nunc) pepitisiert. Das Lösungsmittel verdampfte bei RT und das well wurde anschließend mit 200 µl Blockierlösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Dann wurden die wells dreimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Medium von rRS1, rTTR bzw. rHMFG8 exprimierender HEK-293 EBNA Zellen gefüllt. Die 96-well MaxiSorp Platte wurde dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Die wells wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und mit 100 µl der entsprechenden 1. Antikörperlösung für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Vor der Zugabe der 2. Antikörperlösung wurden die wells dreimal mit PBS gewaschen. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) (Sigma-Aldrich) gestartet und nach 15 min durch die Zugabe von 10 µl 37% HCl gestoppt. Die umgesetzte Menge an TMB wurde dann bei 450 nm bestimmt. Alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt.

PC	L- α -Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, P3556)
PE	3-sn-Phosphatidylethanolamin (Sigma-Aldrich, P7693)
PS	1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phospho-L-serin (Sigma-Aldrich, P7769)
Lipid Mix	L- α -Phosphatidylcholin (Sigma-Aldrich, 61755)

Blockierlösung	2 mg/ml BSA in PBS gelöst
PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
1. Antikörper	α RS1 polyklonaler Antikörper (1:5000) oder α Rho-1D4 monoklonaler Antikörper (1:5000) in PBS
2. Antikörper	α Kaninchen Antikörper (gegen RS1) oder α Maus Antikörper (gegen Rho-1D4) gekoppelt mit der Meerrettichperoxidase (Calbiochem) gelöst in PBS

3.3.9 Herstellen von Vesikeln nach Szoka und Papahadjopoulos (1978)

Szoka und Papahadjopoulos (Szoka & Papahadjopoulos 1978) entwickelten eine Methode zur Herstellung großer uni- und oligolamellarer Vesikel. Bei dieser Methode werden Phospholipide in einem organischen Lösungsmittelgemisch gelöst, anschließend wird ein wässriges Lösungsmittel hinzugegeben (Abb.11 Bild 1). Durch Sonifizieren dieses Zweiphasengemisches (Abb.11 Bild 2) entsteht eine Emulsion, bei der die wässrige Phase als winzige Tröpfchen im organischen Lösungsmittel gelöst sind. Die Phospholipide orientieren sich an der Grenze zwischen organischer und wässriger Phase (Abb.11 Bild 3). Der Emulsion wird langsam das organische Lösemittel entzogen, auf diese Weise organisieren sich die Lipide als unilamellare Vesikel. Durch den weiteren Entzug des organischen Lösungsmittels lagern sich die Vesikel noch enger zusammen (Abb.11 Bild 4), bis sie miteinander verschmelzen (Abb.11 Bild 5) und sich als Vesikel mit einer Bilayermembran abkapseln (Abb.11 Bild 6).

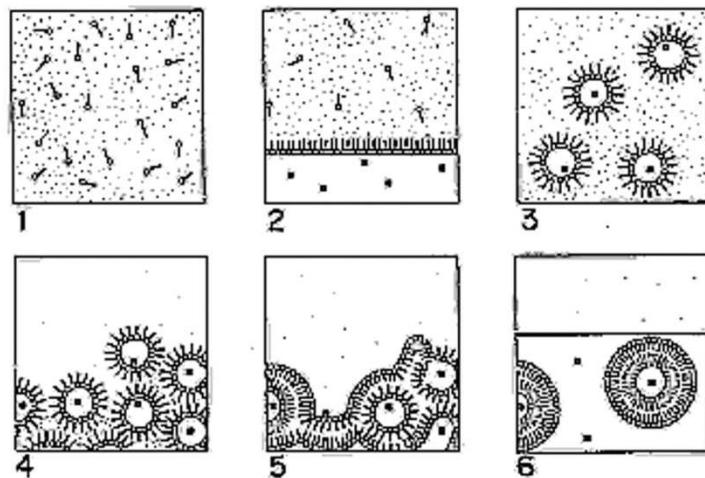


Abb.11: Herstellung von Phospholipidvesikeln nach Szoka und Papahadjopoulos (1978). Die Phospholipide sind als Kugel/Strich Modell dargestellt. Die hydrophoben Ketten der Phospholipide sind als Strich und die polaren Gruppen als Kugel dargestellt. Die Abbildung wurde übernommen aus der Veröffentlichung von (Szoka & Papahadjopoulos 1978).

Zur Herstellung artifizieller Vesikel wurden ca. 50 mg Lipid in einem Rundkolben mit Diethylether gelöst. Der Diethylether wurde jeweils mit Hilfe eines Rotationsverdampfers Rotavapor R-3000 (Büchi Labortechnik GmbH, Essen) verdampft. Das Lipid wurde anschließend wieder in 3 ml Diethylether gelöst und 1 ml PBS hinzugegeben. Das zugegebene PBS wurde später von den Vesikeln eingeschlossen. Das Lösemittel-Wasser-Gemisch wurden solange sonifiziert (VibraCell VCX 400, Sonics and Materials Inc., Newtown, USA), bis eine homogene Dispersion entstanden war. Die Temperatur des Lösemittel-Wasser-Gemisches sollte beim Sonifizieren 10°C nicht übersteigen. Nachdem ein Großteil des Diethylethers bei RT verdampft war, bildeten die Lipide ein klebriges viskoses Gel. Nach weiterem Verdampfen des Lösemittels wurde ein Punkt erreicht, bei dem das viskose Gel in eine wässrige Suspension überging. An diesem Punkt wurde gegebenenfalls PBS hinzugefügt. Die letzten Spuren des Diethylethers wurden durch eine 15 min Inkubation im Rotationsverdampfer entfernt. Die Vesikel wurden über Nacht gegen PBS dialysiert (Größenausschluß 3500 Da), mit Argon überschichtet und bei 4°C gelagert.

PBS

137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄;

1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4

3.3.10 Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an artifizielle Phospholipidvesikel

Der Bindungsassay wurde mit artifiziellen Phospholipid-Vesikel (Kap. 3.3.9) durchgeführt. Das Prinzip dieses Experimentes entspricht dem der Bindung des rRS1 an RS1-KO Mausgewebe (Kap. 3.3.7), wobei an Stelle des RS1-KO Mausgewebes Phospholipidvesikel eingesetzt werden. Die Vesikel werden mit PBS gewaschen, in Lösungen mit rRS1, rTTR und rHMFG8 inkubiert, und anschließend wieder mit PBS gewaschen. Dabei werden die löslichen von den nicht löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation getrennt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C und jede Zentrifugation bei 16.000 x g für 15 min durchgeführt. Für ein Experiment wurden 50 mg Phospholipid Vesikel in 300 µl PBS resuspendiert und bei jedem Arbeitsschritt wurde ein 30 µl Aliquot abgenommen. Die Emulsion wurde zentrifugiert und der Überstand dekantiert, anschließend wurden die Vesikel wieder in 300 µl Medium mit rRS1 resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Emulsion wieder zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Vesikel in 300 µl PBS resuspendiert. Gegebenenfalls wurden die Vesikel nochmals zentrifugiert, der Überstand abgetrennt und die Vesikel erneut in PBS resuspendiert. Die einzelnen Aliquots wurden mit 10 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für einen Western Blot eingesetzt.

PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
-----	--

3.3.11 ELISA: Bindung des rRS1, rTTR und der extrazellulären Domäne des DDR2 an die Kollagene I-V

Die Bindung des rRS1, rTTR und der extrazellulären Domäne des DDR2 (DDR2_AS1-400) an Kollagene I bis V wurde auf ähnliche Weise untersucht, wie die Bindung des rRS1 an Phospholipide (Kap. 3.3.10). Verwendet wurde eine modifizierte Methode nach Abdulhussein und Mitarbeitern (2004). Dabei werden 96-well Platten mit dem jeweiligen Kollagen beschichtet, die übrige Oberfläche der wells mit BSA abgesättigt, das jeweilige Kollagen mit dem zu untersuchenden Protein inkubiert und anschließend wird das gebundene Protein mit Hilfe von Antikörpern detektiert.

Getestet wurde die Bindung der oben genannten Proteine an die Kollagene I-V. Für die Kollagene wurde die Nomenklatur nach Bornstein und Traub (1979) verwendet. Die Kollagene wurden in 10 % Essigsäure mit einer Konzentration von 50 µg/ml gelöst, jeweils 100 µl wurden in ein *well* pipetiert und 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde die Lösung entfernt und die *wells* einmal mit PBS gewaschen und mit 200 µl Blockierlösung eine Stunde bei RT inkubiert. Die Kollagene wurden anschließend mit 100 µl Medium rRS1, rTTR oder DDR2_AS1-400 exprimierender HEK-293 EBNA Zellen (s.o.) über Nacht bei 4°C inkubiert. Das rTTR und das DDR2_AS1-400 wurden jeweils mit einem C-terminalen Rho-1D4-Tag exprimiert. Dann wurden die *wells* dreimal mit PBS gewaschen und jeweils für eine Stunde mit dem entsprechenden 1. Antikörper bei RT inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend eine Stunde lang mit einem 2. Antikörper inkubiert. Nach dem dreimaligen Waschen mit PBS wurde zu den *wells* 100 µl TMB pipetiert und die Farbreaktion nach 15 min durch die Zugabe von 10 µl 37 % HCl gestoppt. Die umgesetzte Menge an TMB wurde anschließend bei 450 nm quantifiziert. Jedes Experiment wurde in Triplikaten durchgeführt.

Blockierlösung	2 mg/ml BSA in PBS gelöst
PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
1. Antikörper	αRS1 polyklonaler Antikörper (1:5000) oder αRho-1D4 monoklonaler Antikörper (1:5000) in PBS
2. Antikörper	αKaninchen Antikörper (gegen RS1) oder αMaus Antikörper (gegen Rho-1D4) gekoppelt mit der Meerrettichperoxidase (Calbiochem) gelöst in PBS

3.3.12 Solubilisieren von Mausnetzhäuten und HEK-293 EBNA Zellen

Die Transmembranproteine und membranassoziierten Proteine wurden aus Netzhäuten von Mäusen sowie HEK-293 EBNA Zellen mit einem detergenzhaltigen Puffer solubilisiert. Das Solubilisat wurde anschließend durch Zentrifugation von den unlöslichen Bestandteilen

getrennt und für eine Immunpräzipitation (Kap.3.3.20) eingesetzt. Der Detergenzpuffer wurde nach Molday et al. (2007) zusammengesetzt. Die Mausnetzhäute wurden in 30 µl Detergenzpuffer pro Netzhaut und die HEK-293 EBNA Zellen wurden pro konfluenter 10 cm Schale in 500 µl Dergenzpuffer solubilisiert. Die Netzhäute bzw. Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit einem Pistill homogenisiert und für 1 bis 12 Stunden bei 4°C invertiert. Anschließend wurde das Solubilisat für 20 min, bei 100.000 x g und 4°C zentrifugiert (OPTIMA Ultracentrifuge TLX, Rotor: TLA-100.3, Beckman Coulter). Der Überstand wurde dann für die Immunopräzipitation eingesetzt.

Detergenzpuffer	20 mM HEPES, pH 7,4, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 1 mM CaCl ₂ , 10 mM CHAPS, 5 % (w/v) Glycerin
-----------------	--

3.3.13 Reinigen des rARMS2-His mittels Affinitäts-Chromatographie

Das rARMS2-His wurde in *E. coli* BL21(DE3) Zellen exprimiert. Anschließend wurden die Zellen in einen Harnstoff-haltigen Puffer überführt. Der Harnstoff lysiert die Zellen. Die Lyse der Zellen wurde vervollständigt, indem das Lysat mit Hilfe eines Hochdruck-Homogenisators (French Press) durch eine Kanüle gepresst und danach sonifiziert wurde. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von unlöslichen Bestandteilen getrennt und mit Hilfe einer Ni²⁺-Chelat-Sepharose Säule (HisTrap FF 5 ml, GE Healthcare) gereinigt. Die Reinigung des rARMS2-His beruht auf der Affinität des Histidins zu Nickel-Ionen, die an eine feste Phase gebunden sind. Das rARMS2-His bindet an die Ni²⁺-Sepharosematrix, während die unspezifischen Proteine weggewaschen werden. Eluiert wurde des rARMS2-His durch Mischen des Bindungspuffers mit dem Elutionspuffer, der 500 mM Imidazol (Sigma-Aldrich) enthielt. Das Imidazol bindet kompetitiv zum rARMS2-His an die Ni²⁺-Ionen. Der Anteil des Elutionspuffers wurde in drei Stufen erhöht. Bei der ersten Stufe enthielt der Puffer eine geringe Imidazolkonzentration, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Darauf folgend wurde die Imidazolkonzentration im Puffer erhöht, sodass das rARMS2-His quantitativ eluiert werden konnte. In der letzten Stufe wurde mit der höchsten Imidazolkonzentration die Ni²⁺-Sepharosematrix von Verunreinigungen gereinigt. Die Eluatfraktionen wurden dann mit Hilfe eines Coomassie-Blau gefärbten 15 % SDS-PAGE Gels und mittels Western Blot analysiert (Kap. 4.2.3).

Die Expression des rARMS2-His wurde in BL21(DE3) *E. coli* Zellen erreicht. Die *E. coli* Zellen wurden mit dem pET21a-ARMS2 Konstrukt nach dem Hitzeschockverfahren transformiert (Kap 3.2.4) und auf LB-Agar-Platten ausplattiert. Eine einzelne Bakterienkolonie wurde über Nacht in 30 ml LB-Medium kultiviert, um anschließend eine 2 l Kultur anzuimpfen. Die Expression des rARMS2-His wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 mit 20 g Lactose induziert und die Kultur für 12 Stunden bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die *E. coli* Zellen durch eine Zentrifugation mit 4.000 x g, für 20 min, bei RT pelletiert. Das Zellpellet wurde in 50 ml Bindungspuffer resuspendiert und 2 Stunden bei RT invertiert. Die Zellsuspension wurde dreimal jeweils mit 69 Bar in der French Press (French Pressure Cell Press, Thermo Spectronic) lysiert und darauf folgend dreimal jeweils mit 60 % Intensität sonifiziert (VibraCell VCX 400, Sonics). Der Überstand des Lysats wurde nach der Ultrazentrifugation (OPTIMA Ultracentrifuge TLX, Rotor: TLA-100.3, Beckman Coulter) bei 100.000 x g, für 20 min bei RT abgetrennt und jeweils 20 ml des Überstandes wurden auf die HisTrap FF 5 ml Säule (GE Healthcare) geladen. Die Affinitätschromatographie wurde mit Hilfe der ÄKTA Basic UPC 10 (GE Healthcare) bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Die Elution wurde jeweils in einem Volumen von 1 ml fraktioniert.

Das Programm für die Reinigung von 20 ml rARMS2-His Lysat:

- 1) Laden der Säule mit 20 ml rARMS2-His Lysat 0 % Elutionspuffer, 5 mM Imidazol
- 2) Waschen der Säule mit 50 ml Bindungspuffer 0 % Elutionspuffer, 5 mM Imidazol
- 3) Eluieren unspezifischer Proteine (50 ml) 5 % Elutionspuffer, 25 mM Imidazol
- 4) Eluieren des rARMS2-His (50 ml) 55 % Elutionspuffer, 300 mM Imidazol
- 5) Säule von Verunreinigungen reinigen (15 ml) 100 % Elutionspuffer, 500 mM Imidazol
- 6) Reequilibrieren der Säule (15 ml) 0 % Elutionspuffer, 5 mM Imidazol

Das rARMS2-His zeigt bei 280 nm nur eine geringe Absorption und ist deshalb im Chromatogramm nur schwer zu detektieren. Das Imidazol absorbiert Licht mit einer Wellenlänge von 280 nm, somit steigt die Absorption mit steigendem Elutionspuffer Anteil. Die rARMS2-His enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und die Proteinkonzentration

nach Bradford (Kap. 3.3.2) bestimmt. Die durchschnittliche Protein Ausbeute bei vier Reinigungsansätzen betrug 14 +/- 2 mg/l Kultur.

LB-Medium	1 % Bactotrypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, eingestellt auf pH 7,8
Bindungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 5 mM Imidazol
Elutionspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 8 M Harnstoff, 500 mM Imidazol

3.3.14 Proteinrückfaltung des rARMS2-His nach der Methode von Vohra et al. (2007)

Die Methode von Vohra und Mitarbeitern (Vohra et al. 2007) umfasst die Rückfaltung rekombinanter Proteine nach einer Reinigung unter denaturierenden Bedingungen. Bei der Expression von Proteinen in Bakterienzellen sammelt sich ein Großteil der rekombinanten Proteine als Einschlusskörperchen. Diese Proteine sind nicht korrekt gefaltet und daher nicht gut löslich. Die Proteinausbeute bei einer Reinigung kann gesteigert werden, indem die Faltung der Proteine korrigiert wird. Dazu werden die Proteine vollständig mit Harnstoff denaturiert und wieder renaturiert, indem schrittweise die Harnstoffkonzentration reduziert wird.

Die *E. coli* Zellen mit rARMS2-His wurden in Denaturierungspuffer resuspendiert, für 20 sek sonifiziert und 2 h bei RT unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Homogenisat 30 min bei 100.000 x g zentrifugiert. Der lösliche Überstand wurde auf eine HisTrap HP 5 ml Säule (GE Healthcare, München) geladen und mit Hilfe der ÄKTA Basic (Kap. 3.3.13) gereinigt. Die Fraktionen mit dem rARMS2-His Protein wurden vereinigt und gegen den Testpuffer über Nacht dialysiert. Nach der Dialyse wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Kap. 3.3.2), auf 1 mg/ml verdünnt und 100 mM DTT zugesetzt. Anschließend folgte eine Dialysereihe (Tab.1), bei der jeder Dialyseschritt mindestens 6 h dauerte.

Tab.1: Dialyse-Reihe zur Renaturierung des rARMS2-His.**Dialyseschritt**

Reagenz	1	2	3	4	5	6
Tris-HCl	50 mM pH 8,5	50 mM pH 8,5	50 mM pH 8,0	50 mM pH 8,0	50 mM pH 8,0	25 mM pH 7,5
Harnstoff	4 M	3 M	2 M	1 M	-	-
L-Arginin	0,4 M	-				
NaCl	0,4 M	50 mM				
Glycerol (v/v)	10%	10%	10%	10%	10%	-
ox. Glutathione	0,5 mM	-				
red. Glutathione	5 mM	-				

Denaturierungspuffer 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 8 M Harnstoff,
 100 mM NaH₂PO₄

Testpuffer 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 4M Harnstoff

3.3.15 Dialyse des rARMS2-His

Der Austausch eines Puffers wurde mit Hilfe der Dialyse durchgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Jeweils 1 – 20 ml des rARMS2-His wurde in einen Dialyseschlauch (Spectra PorDialysis Membrane, MWCO 3500, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, USA) gefüllt und in 1 l des auszutauschenden Puffers dialysiert. Das rARMS2-His wurde dreimal dialysiert, wobei jede Dialyse mindestens 6 Stunden dauerte.

3.3.16 Proteinrückfaltung des rARMS2-His nach der Methode von Swope Willis et al. (2005)

Melissa Swope Willis und Mitarbeiter (Willis et al. 2005) untersuchten die Wirkung von pH-Wert, Detergenzien, Reduktionsmittlen, Salzen, Glucose und Arginin auf die Rückfaltung denaturierter Proteine. Die getesteten Proteine wurden in einem Puffer mit 6 M Guanidinhydrochlorid denaturiert. In 96-well Platten wurden die Puffer mit unterschiedlicher Zusammensetzung vorgelegt und das denaturierte Protein hinzugegeben. Aufgrund der schnellen Änderung der Pufferbedingungen sollte sich das Protein wieder zurückfalten. Sie konnten zeigen, dass bestimmte Reagenzien wie das BMC (Bis-mercaptoacetamidcyclohexan) oder auch Reduktionsmittel wie das TCEP (Tris(2-carboxyethyl)-phosphin) erheblichen Einfluss auf die Rückfaltung eines Proteins haben.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rückfalten des rARMS2-His bei pH-Werten von 5,5 bis 9,5 in Gegenwart der Detergenzien DDM und Tween-80 sowie der Reduktionsmittel DTT, TCEP und Glutathion untersucht. Im ersten Arbeitsschritt wurde das rARMS2-His über Nacht dreimal in einem Elutionspuffer dialysiert, der 0,5 M Harnstoff und kein Imidazol enthielt. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Es wurden jeweils 175 µl Puffer in einem 96-well vorgelegt und 25 µl rARMS2-His mit einer Konzentration von 1 mg/ml hinzugefügt. Die Lösung wurde über Nacht geschüttelt und anschließend auf ein Proteinpräzipitat untersucht.

Elutionspuffer 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 500 mM NaCl, 0,5 M Harnstoff,

Pepitierschemata für ein 96-well

25 µl Puffer: final 50 mM MES pH 5,5 / 6,5, Tris-HCl pH 7,6 / 7,8 / 8,2, Borat pH 9,5

25 µl Salze: final 120 mM NaCl und 10 mM KCl

25 µl Detergenz: final 0,3 mM DDM, 0,5 mM Tween-80 (optional)

25 µl Reduktionsmittel: final 5 mM DTT, 5 mM TCEP, 1 mM GS:GSSG (optional)

Ad 175 µl H₂O

25 µl rARMS2-His

BMC Bis-mercaptoacetamid cyclohexan

TCEP Tris (2-carboxyethylphosphin)

GS:GSSG reduziertes Glutathion : oxidiertes Glutathion

3.3.17 Isolation von Einschluskkörperchen zur Immunisierung von Kaninchen

Einschluskkörperchen (engl. *inclusion bodies*) sind Partikel in einer Zelle aus nicht oder falsch gefalteten Proteinen. Sie bilden sich häufig bei der Überexpression von Proteinen. Die hydrophoben Bereiche dieser Proteine lagern sich zu Protein-Komplexen zusammen, was die Löslichkeit der Proteine herabsetzt. Aus diesem Grund werden die Einschluskkörperchen in Puffern mit Detergenzien oder chaotropen Substanzen wie z.B. 6 M Guanidinhydrochlorid oder 8 M Harnstoff resuspendiert. Die Immunisierung mit Einschluskkörperchen, anstelle löslicher Proteine, hat den Vorteil einer stärkeren Immunantwort (pers. Mitteilung von Herrn Reinhardt, ImmunoGlobe Antikörpertchnik GmbH), wodurch mehr Antikörper gebildet werden. Da die Proteine jedoch nicht nativ vorliegen, ist es unwahrscheinlich Antikörper mit Epitopen gegen bestimmte Struktur-Motive zu erhalten.

Das verwendete Protokoll zum Isolieren der Einschluskkörperchen von Nagai und Thogersen (Nagai & Thogersen 1987) wurde von der Firma ImmunoGlobe Antikörpertchnik GmbH modifiziert. Es wurden BL21(DE3) Zellen mit rARMS2-His transfiziert, auf LB-Agarplatten ausplattiert und mit einer Kolonie eine 15 ml Kultur angeimpft. Am darauf folgenden Tag wurde mit der 15 ml Kultur 1,5 l LB-Medium angeimpft. Die Expression des rARMS2-His Proteins wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,6 durch die Zugabe von 10 g/l Lactose induziert. Die Kultur wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach dem Zentrifugieren bei 3.000 x g für 5 min wurde das Zellpellet in 80 ml eiskaltem Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden 20 ml Lysispuffer mit 200 mg Lysozym hinzugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellen und ihre DNA wurden durch 10-minütiges Sonifizieren bei 50 % Intensität (VibraCell VCX 400, Sonics) aufgebrochen. Nach der Zugabe von 200 ml Detergentspuffer wurde das Lysat 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Der leicht orangefarbene Überstand wurde

dekantiert, das Pellet in 250 ml Waschpuffer resuspendiert und wieder 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Der Schritt des Resuspendierens in 250 ml Waschpuffer und des Zentrifugierens wurde noch dreimal wiederholt, bis das Pellet fest war. Das Pellet wurde in 70 % Ethanol resuspendiert, 10 min bei 5.000 x g zentrifugiert und in 15 ml PBS wieder aufgenommen. Die Suspension wurde durch zehnmaliges Aufziehen und Auslassen mit einer 23G Kanüle homogenisiert. Es wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt und 500 µl mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml für die Immunisierung zu ImmunoGlobe Antikörpertechnik GmbH geschickt.

Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,25 % (w/v) Glucose, 1mM EDTA
Detergenzpuffer	20 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1 % (w/v) Desoxyolsäure, 1 % Nonidet P-40
Waschpuffer	0,5 % Triton X-100, 1 mM EDTA
PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

3.3.18 Herstellung und Reinigung des αARMS2 Antikörpers

Das Immunisieren eines Kaninchens mit den Einschlusskörperchen des rARMS2-His (Antigen) (Kap. 3.3.17) und die anschließende Reinigung des αARMS2 Antikörpers wurden von der Firma ImmunoGlobe Antikörpertechnik GmbH (Himmelstadt) durchgeführt. Das rARMS2-His wurde an *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) gekoppelt und anschließend dem Kaninchen injiziert. Das KLH ist ein Protein der Meeresschnecke *Megathura crenulata* und dient als Adjuvanst. Es induziert eine Entzündungsreaktion im Kaninchen und erhöht die Antikörperproduktion. Das Kaninchen wurde nach der ersten Immunisierung zwei weitere Male immunisiert, jeweils im Abstand von 14 Tagen. Eine Testblutung wurde 14 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt und für die Reinigung des αARMS2 Antikörpers eingesetzt. Die Reinigung des Antikörpers aus dem Blutserum erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde das Serum mit Hilfe einer hexa-Histidin Peptid-gekoppelten Säule von αHistidin Antikörpern gereinigt. Im zweiten Schritt wurde das Serum gegen das

rekombinante rTIMP2-His Protein von *E. coli* Protein spezifischen Antikörpern und den restlichen α Histidin Antikörpern gereinigt. Der dritte Reinigungsschritt umfasste die Reinigung gegen das rARMS2-His Protein. Bei dem Kaninchen wurde nach der Testblutung, jeweils im Abstand von 14 Tagen, eine Blutung, eine Immunisierung und wieder eine Blutung durchgeführt. Die Blutungen wurden vereinigt und zur Reinigung wie oben beschrieben eingesetzt. Der aus der Testblutung gereinigte α ARMS2 Antikörper wurde für alle weiteren Arbeiten eingesetzt.

Das Fusionsprotein rTIMP2-His wurde wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben exprimiert und gereinigt. Die Fraktionen mit gereinigtem rTIMP2-His wurden vereinigt und in NHS-Puffer über Nacht dialysiert. Anschließend wurde das Protein nach Herstellerangaben an eine HiTrapTM NHS-activated HP (GE Healthcare) 1 ml Säule kovalent gebunden und die Säule zu ImmunoGlobe Antikörpertchnik GmbH geschickt.

NHS-Puffer	200 mM Na ₂ CO ₃ pH 8,3, 500 mM NaCl
------------	--

3.3.19 Epitopkartierung des α ARMS2 Antikörpers

Der α ARMS2 Antikörper wurde nach dem Protokoll der Firma JPT Peptide Technologies GmbH für *PepSPOTs* kartiert. Bei dieser Methode werden, basierend auf der Aminosäuresequenz des Antigens, Peptide synthetisiert die dem Antigen entsprechen und an eine Cellulose-Polyethylenglykolmembran kovalent gebunden sind (Abb.12). Die Peptide haben eine Länge von etwa 15 Aminosäuren. Das erste Peptid entspricht den ersten 15 Aminosäuren des Antigens, während die Sequenz des zweiten Peptids um vier Aminosäuren zum C-Terminus des Antigens verschoben ist. Auf diese Weise decken die Peptide die vollständige Sequenz des Antigens ab und überlappen sich zu beiden Seiten mit jeweils 11 Aminosäuren mit den benachbarten Peptiden. Die Membran wird mit dem zu kartierenden Antikörper inkubiert und mit Hilfe eines spezifischen zweiten Antikörpers detektiert. Durch die Bindung des Antikörpers an die Peptide, die dessen Epitop enthalten, kann die Anzahl der Epitope bestimmt und die Sequenz des Epitops zufriedenstellend

eingegrenzt werden. Der zu kartierende Antikörper sollte möglichst rein sein, um unspezifische Signale zu vermeiden.

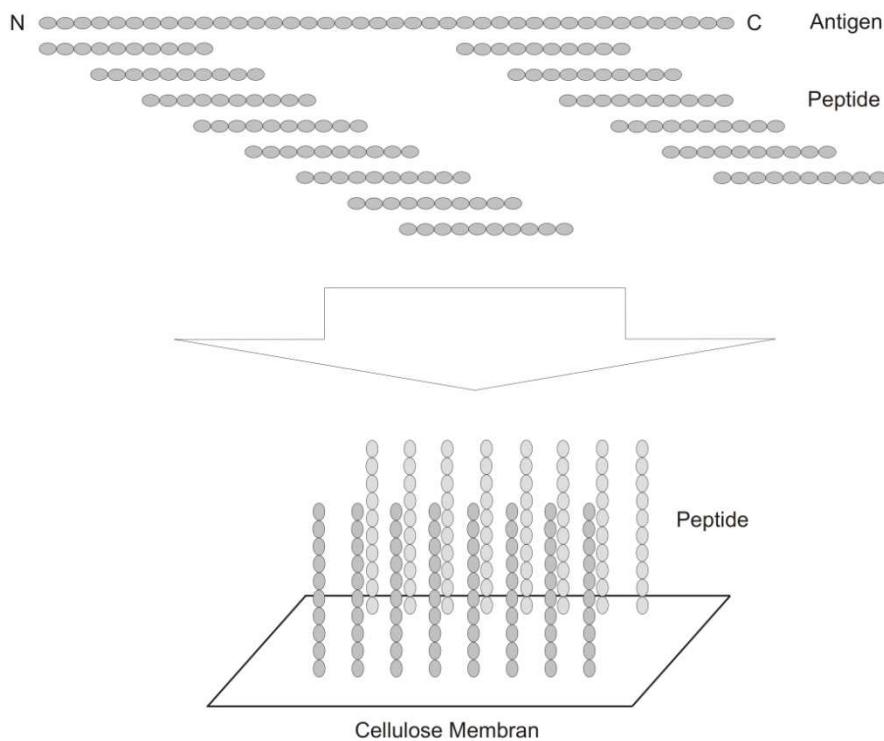


Abb.12: Darstellung des Protein Antigens in linearer Form und die Anordnung der sich überlappenden Peptide, die kovalent mit der Cellulosemembran gekoppelt werden.

Folgende Inkubationsschritte wurden mit der Peptid-gekoppelten Cellulosemembran durchgeführt:

- 5 min in Methanol
- 3 x 10m min in TBS
- 2 h in 5 %iger Magermilch Lösung
- Spülen mit TBS
- 3 h in 1. Antikörper α ARMS2 Antikörper (1 μ g/ml)
- 1 x 10 min in TBS

- 2 h in 2. Antikörper (Verdünnung 1:10.000)

- 3 x 5 min in TBS

Die gebundenen α ARMS2 Antikörper wurden mit Hilfe der Chemolumineszenzlösung (Kap. 3.3.5) detektiert.

1. Antikörper	α ARMS2 polyklonaler Antikörper gelöst in TBS
2. Antikörper	α Kaninchen Antikörper gekoppelt mit der Meerrettichperoxidase (Calbiochem) gelöst in TBS
TBS	50 mM Tris-HCl pH 8,0, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl

3.3.20 Immunpräzipitation mit Protein-G-Sepharose

Unter dem Begriff Immunpräzipitation versteht man eine Antikörper-vermittelte Ausfällung von löslichen Substanzen. Heutzutage verwendet man dazu Antikörper, die an eine feste Phase gekoppelt sind, wie z.B. Protein-A-Sepharose oder Protein-G-Sepharose. Protein-A und Protein-G sind bakterielle Proteine aus *Staphylococcus aureus* bzw. *Streptococcus*, die an den konservierten Teil eines Antikörpers binden. Die beiden Proteine unterscheiden sich in ihren Affinitäten zu den Antikörpern verschiedener Spezies. Bei einer Immunpräzipitation wird zuerst der Antikörper an die Protein-A bzw. Protein-G-Sepharose gekoppelt und dann mit der zu untersuchenden Lösung inkubiert. Die Antikörper binden spezifisch ihre Epitope und werden aufgrund der Bindung an die unlöslichen Sepharose durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wird der lösliche Überstand abgetrennt und die pelletierten Antikörper mit Hilfe von SDS-PAGE und Western blotting analysiert.

In dieser Arbeit wurde jeweils 10 µl Protein-G-Sepharose (Sigma-Aldrich) für eine Immunpräzipitation eingesetzt. Die Protein-G-Sepharose wurde durch die Zentrifugation mit 2000 x g für 2 min bei 4°C pelletiert. Als ersten Schritt wurde die Protein-G-Sepharose dreimal mit PBS gewaschen, dazu wurde sie jeweils pelletiert, der Überstand abgenommen und in einer frischen PBS Lösung resuspendiert. Dann wurde die Protein-G-Sepharose pro 10 µl mit 2-20 µg Antikörper bis zur ihrer Verwendung bei 4°C inkubiert. Vor dem Gebrauch,

der mit Antikörpern gekoppelten Protein-G-Sepharose, wurde der Überstand abgenommen. Anschließend wurde die Protein-G-Sepharose in PBS resuspendiert und entsprechend der Anzahl an Immunpräzipitationen auf Reaktionsgefäße verteilt. Nach einer Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die mit Antikörpern beladene Protein-G-Sepharose in 300-1000 µl der zu untersuchenden Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 bis 12 Stunden bei 4°C wurde die Protein-G-Sepharose pelletiert, der Überstand entfernt und drei bis sechsmal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen. Die Protein-G-Sepharose wurde anschließend mit SDS-Probenpuffer versetzt und der Überstand für einen Western Blot eingesetzt.

PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
SDS-Probenpuffer	Endkonzentration: 1,6 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β-Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 15 % Glycerin; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau

3.3.21 Nachweis des ARMS2 Proteins in humanem Gewebe

Die Expression des ARMS2 Proteins in humanem Gewebe der Niere, Plazenta, Netzhaut und des Herzens wurde mit Hilfe der Immunpräzipitation (Kap. 3.3.20) und anschließender Western Blot Analyse (Kap. 3.3.3) untersucht. Die jeweiligen Gewebe wurden auf Eis aufgetaut und in einem glukosehaltigen Puffer homogenisiert, um anschließend den Überstand mit den löslichen Proteinen und Mitochondrien abzutrennen. Der Überstand wurde dann für die Immunpräzipitation eingesetzt. Die Menge an Proteinen wurde auf die Menge der ERK1/2 Proteine mit Hilfe eines Western Blots normalisiert.

Das humane Gewebe wurde bei -80°C gelagert. Alle hier beschriebenen Arbeitsschritte wurden bei +4°C durchgeführt. Jeweils 150-200 mg der Niere, Plazenta, Lunge, Netzhaut und des Herzens wurde mit Hilfe eines Glas-Teflon Homogenisieres in 1 ml Puffer 1 (Fernandez-Vizarra et al. 2002) homogenisiert, anschließend wurde das Homogenisat für 5 min bei

500 x g zentrifugiert und der Überstand abgetrennt. Der Überstand wurde dann für die Immunpräzipitation mit dem α ARMS2 Antikörper eingesetzt. Die Protein-G-Sepharose (Kap. 3.3.20) wurde mit 20 μ g des α ARMS2 Antikörpers inkubiert, anschließend wurde die Protein-G-Sepharose über Nacht mit 1 ml des Überstandes inkubiert. Die unspezifisch gebundenen Proteine wurden durch sechsmaliges Waschen der Protein-G-Sepharose mit jeweils 600 μ l PBS entfernt. Die Protein-G-Sepharose wurde dann in 65 μ l SDS-Probenpuffer aufgekocht und jeweils 30 μ l für einen Western Blot eingesetzt. Zur Detektion des ARMS2 Proteins wurde das SuperSignal[®] West Femto verwendet und der Röntgenfilm wurde ca. 20 min exponiert.

Puffer 1	10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,32 M Glucose, 1 mM EDTA, 2 μ g/ml Aprotinin, 100 μ g/ml PMSF, 2 μ g/ml Leupeptin
SDS-Probenpuffer	Endkonzentration: 1,6 % (w/v) SDS; 1 % (v/v) β -Mercaptoethanol; 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 15 % Glycerin; 0,003 % (w/v) Bromphenolblau
PBS	137 mM NaCl; 2,6 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4

4. Ergebnisse

Die erblichen Dystrophien der Netzhaut umfasst eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die aufgrund von Mutationen in einem Gen zu Störungen in der Netzhautentwicklung oder dessen Funktion führen. Einen kleinen Ausschnitt vom Erscheinungsbild und Verständnis der erblichen Netzhautdystrophien wird anhand in dieser Arbeit behandelten Erkrankungen der X-gebundene juvenilen Retinoschisis (XRS) und der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) gezeigt. Beide Erkrankungen führen aufgrund einer Degeneration der Netzhaut zu einen reduziertem Visus, was zu Blindheit führen kann. Sie unterscheiden sich aber z.B. in ihrer zeitlichen Manifestation und der Anzahl an krankheitsauslösenden Faktoren. Während XRS offensichtlich eine monogenetische Erkrankung ist, die bei Männern in jungen Jahren auftritt, entwickelt sich die AMD erst im Alter bei Frauen und Männern, desweiteren scheint die AMD von mehreren Faktoren abhängig zu sein.

In dieser Arbeit werden zwei Proteine untersucht, die eine entscheidende Rolle bei dem pathogenen Mechanismus der XRS und der AMD spielen bzw. spielen könnten. Zum einen werden für das mit der XRS assoziierte Retinoschisin (RS1) potentielle Bindungspartner überprüft, um daraus auf eine Funktion des RS1 schließen zu können. Zum anderen wird die Expression des AMRS2 Proteins und dessen Varianten untersucht, um daraus einen funktionellen Zusammenhang zur AMD ableiten zu können.

4.1 Die Charakterisierung der Struktur-Funktions-Beziehung des Retinoschisins und die Identifikation seiner Bindungspartner

Das Retinoschisin (RS1) ist ein Netzhaut spezifisches Protein, das als homo-oktameres Protein an der Plasmamembran der Bipolar- und Photorezeptorzellen lokalisiert ist (Molday et al. 2001). Darüber hinaus ist nur wenig über die Funktion des Retinoschisins bekannt. Nachfolgend wird beschrieben, wie die Bindung des RS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus charakterisiert und die Interaktion zu potentiellen Bindungspartnern mit Hilfe von ELISA und Immupräzipitationen überprüft wurde.

4.1.1 Bindung des rRS1 an unterschiedliche Gewebe der RS1-KO-Maus

Das RS1 wird spezifisch in der Netzhaut und der Gehirnanhangsdrüse exprimiert. Eine gewebespezifische Bindung des RS1 an einen Bindungspartner in der Netzhaut oder im Gehirn ist bisher nicht bekannt. Mit Hilfe eines Western Blots wurde überprüft, ob rekombinantes RS1 (rRS1) an Membranen unterschiedlicher Gewebe der RS1-KO-Maus bindet. Dazu wurde die Bindung des rRS1 an das Gewebe der Netzhaut, des Gehirns, der Niere, der Leber, des Herzens und der Lunge wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben untersucht (Abb. 13). Stellvertretend für die übrigen Gewebe zeigt das Netzhautgewebe die Konstanz der eingesetzten Proteinmenge anhand der β 2-Untereinheit des Transmembranproteins Na/K-ATPase (ATP1B2) und die quantitative Abtrennung der löslichen Proteine anhand des ERK1/2.

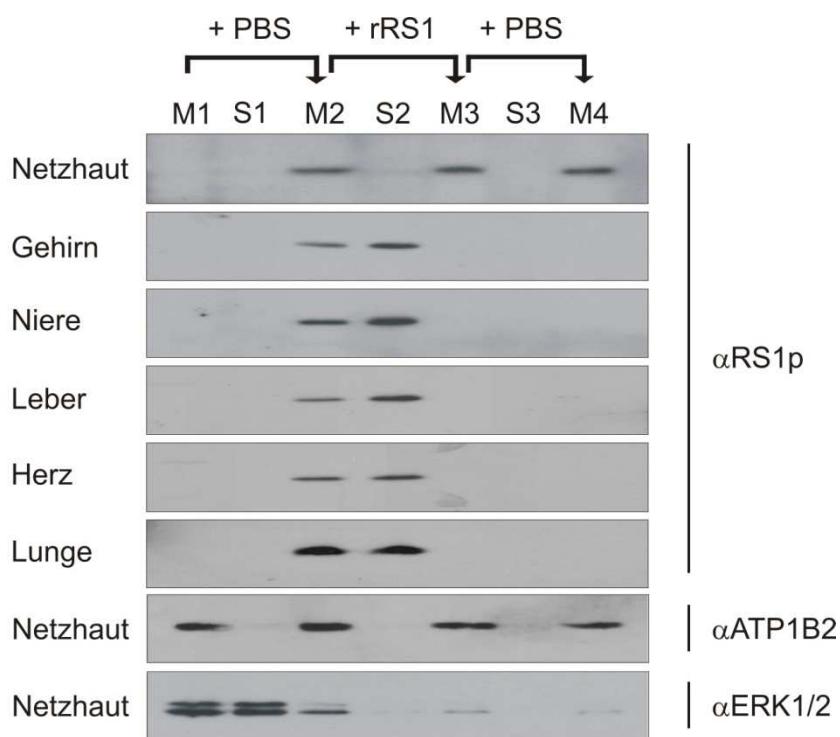


Abb.13: Bindung des rRS1 an Gewebe der RS1-KO-Maus. Das Gewebe wurde homogenisiert und in drei Zentrifugationsschritten (Pfeile) zunächst in PBS, dann in Zellkulturmedium mit rRS1 und zuletzt wieder in PBS resuspendiert. Die Fraktionen mit unlöslichen Zellbestandteilen wurden jeweils abgetrennt und als M1-M4 gekennzeichnet. Die durch Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen wurden als S1-S3 gekennzeichnet. Das rRS1 wurde mit Hilfe des α RS1p Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Stellvertretend für die anderen Gewebe ist anhand der Netzhaut die Konstanz der eingesetzten Proteinmenge durch die β 2-Untereinheit der Na/K-ATPase (ATP1B2) und die quantitative Abtrennung der löslichen Proteine durch die MAP-Kinase ERK1/2 dargestellt.

Das Gewebe der RS1-KO-Maus enthält kein endogenes Retinoschisin, da die erste Membranfraktion (M1) keine RS1 Bande zeigt. Erst nach der Zugabe des rRS1 wird es detektiert (M2). Das rRS1 wird nach dem zweiten Zentrifugationsschritt in den unlöslichen Fraktionen (M3, M4) des Netzhautgewebes nachgewiesen. Bei den anderen Geweben wird das rRS1 jeweils in der löslichen Fraktion (S2) detektiert. Das weist auf eine spezifische Bindung des rRS1 an das Gewebe der Netzhaut hin. Somit sollten die Bindungspartner des Retinoschisins auch spezifisch für die Netzhaut sein. Die löslichen Proteine der Gewebe werden durch den ersten Zentrifugationsschritt quantitativ abgetrennt. Infolgedessen sind die Bindungspartner des Retinoschisins fest in oder mit der Membran verankert. Die spezifische Bindung des rRS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus ermöglicht es, diese Bindung näher zu charakterisieren.

4.1.2 Bindung von rRS1 und RS1-Cystein-Mutanten an RS1-KO-Netzhäute

Das Retinoschisin ist ein homo-oktameres Protein. Die Monomere sind über Disulfidbrücken der Cysteine an den Positionen 40, 59 und 223 (C40, C59, C223) miteinander verknüpft (Wu et al. 2005). Es ist bekannt, dass der Austausch der Cysteine C59 und C223 zu einem Serin (S) zum RS1 Dimer (rRS1_C59S/C223S) führt. Ein weiterer Austausch des Cysteins C40 zu einem Serin führt zum RS1 Monomer (rRS1_C40S/C59S/C223S). Der Einfluss der oligomeren Struktur des RS1 auf die Bindung zur Netzhaut ist unbekannt und wird mit Hilfe der RS1-KO-Maus untersucht. Zuerst wird die oligomere Form des rRS1 sowie der rRS1 Cystein-Mutanten mit einem Western Blot überprüft, indem die Proteine unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert werden (Abb.14 A). Um im Western Blot eine definierte Auf trennung zu erhalten wurden die Proteine zusätzlich mit 10 mM N-Ethylmaleimide (NEM) vorbehandelt. Das NEM bindet an die freien Cysteine und verhinderte so die Bildung von Disulfidbrücken.

Die Proteine rRS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S migrieren im Western Blot unter reduzierenden Bedingungen bei einem Molekulargewicht von ca. 26 kDa anstelle der erwarteten 24 kDa. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen migriert das rRS1_C40S bei ca. 45 kDa anstelle der erwarteten 48 kDa. Diese Abweichungen im Migrationsverhalten lassen sich auf die Modifikation mit dem NEM zurückführen. Das rRS1 und die rRS1-

Cystein-Mutanten zeigen im Western Blot, dass aufgrund ihrer Oligomeren Form zu erwartende Migrationsverhalten. Die jeweils oligomere Form des rRS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S ist intakt und wird zur Untersuchung ihrer Bindung an die Netzhaut wie in Kapitel 3.2.7 beschrieben durchgeführt (Abb.14 B).

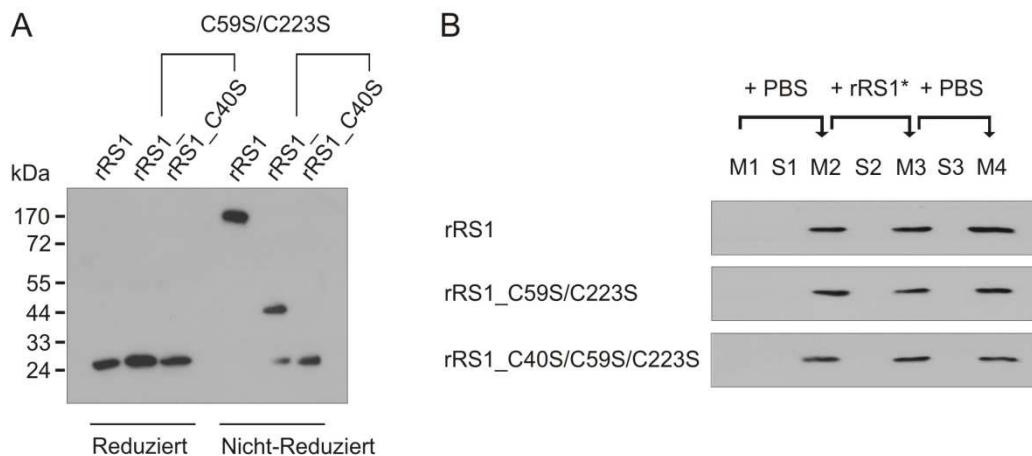


Abb.14: Überprüfung der Bindung des oktameren rRS1, des dimeren rRS1_C59S/C223S und des monomeren rRS1_C40S/C59S/C223S an die Netzhaut der RS1-KO-Maus. **A)** Nachweis des rRS1, des rRS1_C59S/C223S und des rRS1_C40S/C59S/C223S unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen mit Hilfe der Western Blot Analyse. **B)** Die Netzhaut wurde homogenisiert und in drei Zentrifugationsschritten (Pfeile) erst in PBS, dann in Zellkulturmedium mit rRS1 oder den RS1 Cystein-Mutanten (rRS1*) und zuletzt wieder in PBS resuspendiert. Die Fraktionen mit unlöslichen Zellbestandteilen wurden als M1-M4 gekennzeichnet. Die durch die Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen wurden als S1-S3 gekennzeichnet. Das RS1 wurde mit Hilfe des anti-RS1p Antikörpers nachgewiesen.

Das rRS1 und die rRS1 Cystein-Mutanten werden nach der Inkubation mit homogenisierten RS1-KO-Netzhäuten jeweils in den unlöslichen Fraktionen nachgewiesen. Die rRS1 Cystein-Mutanten binden ebenso wie das rRS1 an die RS1-KO-Netzhaut (M3, M4). Demnach scheint die oktamere Struktur des RS1 nicht erforderlich für die Bindung an die Netzhaut zu sein und jedes RS1 Monomer enthält offensichtlich die für eine Bindung notwendige Domäne.

4.1.3 Blockieren der Bindung des rRS1 an RS1-KO-Netzhaut mit Peptiden

Das RS1 Monomer enthält eine Discoidin Domäne, deren Struktur drei Schlaufen ausbildet. Diese Schlaufen werden als *Spikes 1, 2 und 3* bezeichnet und ragen aus der globulären Struktur der Discoidin Domäne heraus (Abb.15 A). Es ist bekannt, dass andere Discoidin Domänen enthaltende Proteine mit den *Spikes* an ihre Bindungspartner binden (Andersen et al. 2000; Leitinger et al. 2004). Die Bindung des rRS1 an die RS1-KO-Maus Netzhaut wird durch die Zugabe synthetischer Peptide untersucht (Abb.15 B). Die Peptide entsprechen der Aminosäuresequenz des jeweiligen *Spikes* (Abb.15 B Peptid 1-3) und sollten daher kompetitiv mit rRS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus binden. Die Aminosäuresequenz spezifische Bindung der Peptide wird mit Hilfe des Peptids Random (Sequenz: DEMCRIWD) überprüft. Es enthält die gleichen Aminosäuren wie das Peptid 3, jedoch in einer zufälligen Reihenfolge. Durchgeführt wird das Experiment wie es in Kapitel 3.3.7 beschrieben ist.

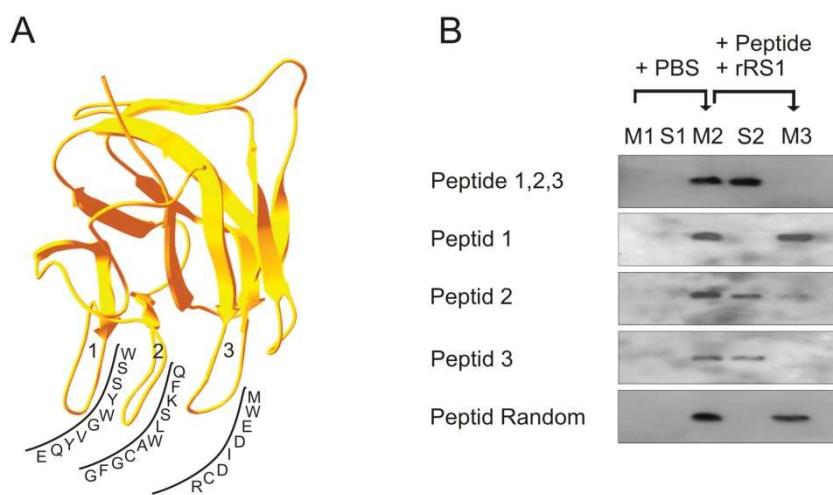


Abb.15: Darstellung der Discoidin Domäne und Blockierung der Bindung des rRS1 zu RS1-KO-Netzhaut mit Peptiden. A) Struktur-Modell der Discoidin Domäne des RS1. Die *Spikes* wurden von 1 bis 3 nummeriert und mit Aminosäuresequenz dargestellt. Die Abbildung wurde nach Molday et al. (2005) modifiziert. **B)** Die Netzhaut wurde homogenisiert und in zwei Zentrifugationsschritten (Pfeile) erst in PBS und danach in Zellkulturmedium mit rRS1 und den Peptiden 1-3 oder jeweils den einzelnen Peptiden 1-3 bzw. der zufälligen Peptidsequenz resuspendiert. Die Fraktionen mit unlöslichen Zellbestandteilen wurden als M1-M3 gekennzeichnet. Die durch die Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen wurden als S1 und S2 gekennzeichnet. Das RS1 wurde mit Hilfe des α RS1p Antikörpers nachgewiesen.

Nach der Zugabe des rRS1 wird es in Gegenwart der Peptide 1, 2 und 3 in der löslichen Fraktion (S2) detektiert. Alle drei Peptide zusammen blockieren die Bindung des rRS1 an die Netzhaut. In Gegenwart des Peptid 1 oder des Peptids Random wird das rRS1 nur in den unlöslichen Fraktionen (M2, M3) nachgewiesen. Diese beiden Peptide haben keinen Einfluss auf die Bindung des rRS1 zur Netzhaut. In Gegenwart des Peptids 2 wird der Großteil des rRS1 in der löslichen und nur eine geringe Menge in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen. Das Peptid 2 verhindert also nicht vollständig die Bindung des rRS1 an die Netzhaut. In Anwesenheit des Peptids 3 wird das rRS1 nach der Zugabe zur Netzhaut in der löslichen Fraktion (S2) detektiert. Das Peptid 3 verhindert die Bindung des rRS1 an die Netzhaut vollständig. Offensichtlich bindet das RS1 mit Hilfe der *Spikes* 2 und 3 an die RS1-KO-Maus Netzhaut. An welchen Bindungspartner die *Spikes* des RS1 binden ist bisher unklar.

4.1.4 Überprüfung der Phospholipide als Bindungspartner des Retinoschisins

Die Bindung des RS1 an die negativ geladenen Phospholipide, insbesondere an das Phosphatidylserin, ist umstritten (Vijayasarathy et al. 2007). Zur Klärung, ob RS1 spezifisch an Phospholipide bindet wird, die Affinität des rRS1 zu Phospholipiden mit Hilfe des ELISA (Abb.16) und artifizieller Liposomen (Abb.17) überprüft.

Die Bindung des RS1 an eine Membran aus Phospholipiden könnte abhängig von deren Zusammensetzung sein, deshalb wird die Affinität des rRS1 zu den Phospholipiden Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) und einem Gemisch aus diesen Lipiden (Lipid Mix) mittels ELISA untersucht (Kap. 3.3.8). Die Bindung des rRS1, Transthyretin (rTTR) und rHMFG8 an unilaminare Phospholipide wird wie in Kapitel 3.3.10 durchgeführt. Das TTR bindet nicht an Phospholipide und wird als Negativkontrolle eingesetzt. Das HMFG8 bindet spezifisch an PS und wurde dementsprechend als Positivkontrolle eingesetzt.

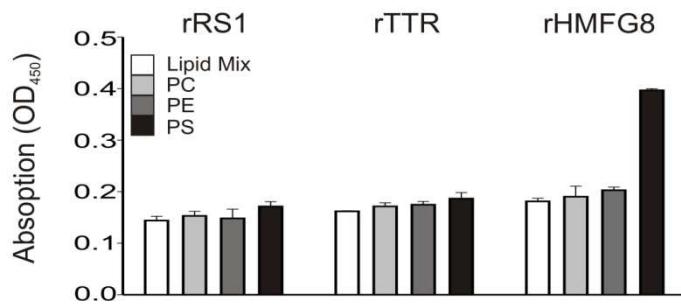


Abb.16: Überprüfung der Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an Phospholipide mittels ELISA. Eine 96-well Platte wurde mit den jeweiligen Phospholipiden beschichtet und mit den rekombinanten Proteinen inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden mit Hilfe einer Farbreaktion bei einer OD₄₅₀ nachgewiesen. Das rTTR wurde als Negativkontrolle und das rHMFG8 wurde als Positivkontrolle für die Bindung an PS eingesetzt. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) rekombinantes Retinoschisin (rRS1), rekombinantes Transthyretin (rTTR), rekombinantes Milchfett globulärer-EGF Faktor 8 Protein (rHMFG8)

Die Absorption des rRS1 und des rTTR beträgt in Gegenwart der Phospholipide zwischen 0,15 und 0,2. Beim rHMFG8 wird in Gegenwart des Lipid Mixes, des PC und des PE ebenfalls eine Absorption von 0,15 bis 0,2 gemessen. In Anwesenheit des PS beträgt die Absorption des rHMFG8 0,42. Das rRS1 verhält sich wie das rTTR und bindet an keines der Phospholipide, während das rHMFG8 spezifisch an das PS bindet.

Der Lipid Mix enthält Phosphatidylserin, dem entsprechend sollte das rHMFG8 auch daran binden (Andersen et al. 2000). Die Absorption des rHMFG8 in Gegenwart des Lipid Mixes ist aber vergleichbar mit der Absorption der Lipide, an die rHMFG8 nicht bindet. Es gibt zwei mögliche Erklärungen, weshalb das rHMFG8 nicht an das PS im Lipid Mix bindet: 1) Die PS-Konzentration ist zu niedrig, damit das rHMFG8 in einer detektierbaren Menge bindet. 2) Die Oberfläche der Lipidmembran ist nicht gekrümmmt. Es ist bekannt, dass die Affinität des HMFG8 zu Membranen mit PS abhängig von der Krümmung ihrer Oberfläche ist (Gilbert & Arena 1995). Dies könnte auch auf das RS1 zutreffen und wird mit Hilfe artifizieller Liposomen untersucht.

Die Liposomen werden zum einen aus reinem PC hergestellt, die als negative Kontrolle eingesetzt wird. Zum anderen werden die Liposomen aus Lipid Mix hergestellt und mit jeweils 20 % (w/w) PE oder PS versetzt, da die Liposomen aus reinem PE oder PS nicht stabil sind. Durch die Zugabe des PE und PS zu dem Lipid Mix wird der Anteil des jeweiligen Lipids auf ca. 55 % bzw. 25 % erhöht. Die Bindung des rRS1 an die Liposomen wird nach dem gleichen Prinzip untersucht wie die Bindung an das Gewebe der RS-KO-Maus (Kap. 3.3.7).

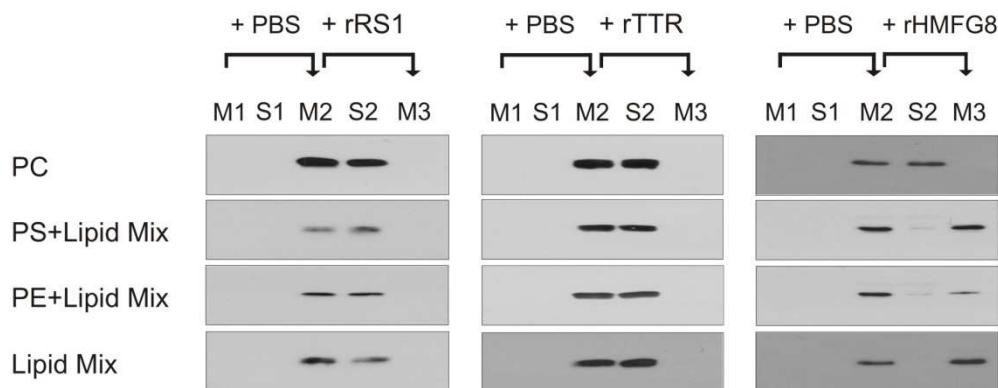


Abb.17: Bindung des rRS1, rTTR und rHMFG8 an Liposomen. Die Liposomen werden in zwei Zentrifugationsschritten (Pfeile) erst in PBS und danach in Zellkulturmedium mit rRS1, rTTR oder rHMFG8 resuspendiert. Die Fraktionen mit den Liposomen sind als M1-M3 gekennzeichnet. Die durch die Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen sind als S1 und S2 gekennzeichnet. Die Liposomen bestehen aus reinem PC oder Lipid Mix, dem 20 % (w/w) PE (PE + Lipid Mix) oder PS (PS + Lipid Mix) zugesetzt ist. Das RS1 wird mit Hilfe des α RS1p Antikörpers und das rTTR und rHMFG8 mit dem α Rho-1D4 Antikörper nachgewiesen. Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylserin (PS) rekombinantes Retinoschisin (rRS1), rekombinantes Transthyretin (rTTR), rekombinantes Milchfett globulärer-EGF Faktor 8 Protein (rHMFG8).

Das rRS1 und das rTTR wird jeweils nach der Zugabe zu den Liposomen in den löslichen Überständen (S2) detektiert. Im Gegensatz dazu wird das rHMFG8 jeweils in den unlöslichen Fraktionen (M3) der Liposomen nachgewiesen, die PS enthalten. In Gegenwart der Liposomen aus reinem PC wird das rHMFG8, wie das rRS1 und rTTR, in der löslichen Fraktion (S2) detektiert. Das rHMFG8 bindet an alle Liposomen die PS enthalten, auch an die Liposomen aus reinen Lipid Mix an die es im ELISA nicht bindet. Während das rRS1 und das rTTR an keines der Liposomen bindet. Somit hat weder die gekrümmte Oberfläche der Liposomen, noch die Erhöhung der PS-Konzentration einen Einfluss auf die Bindung des

rRS1 zum PS. Aus diesem Grund ist eine spezifische Bindung des RS1 zu PS wenig wahrscheinlich.

4.1.5 Überprüfung der Kollagene I bis V als Bindungspartner des Retinoschisins

Die Kollagene sind bekannte Bindungspartner der Discoidin Domäne Rezeptoren-1 und -2 (DDR1, DDR2) (Leitinger 2003). Sie binden mit ihrer Discoidin Domäne die Kollagene I bis III und sind damit auch an der Zell-Zell Adhäsion beteiligt. Das RS1 könnte wie das DDR1 und DDR2 an die Kollagene I bis III binden, da es eventuell ebenfalls an Zell-Zell Adhäsionsprozessen beteiligt ist. Die Affinität des RS1 zu den Kollagenen wird mit Hilfe eines ELISA untersucht (Kap. 3.3.11).

Für den ELISA wird das rRS1, rTTR und die extrazelluläre Domäne des DDR2 (rDDR2_AS1-400) mit den Kollagenen I-V eingesetzt (Abb.18). Das TTR bindet nicht an die Kollagene und wurde als Negativkontrolle eingesetzt. Die ersten 400 Aminosäuren des DDR2 bilden die extrazelluläre Domäne, welche die Discoidin Domäne enthält, mit der es an die Kollagene I, II und III bindet (Leitinger 2003).

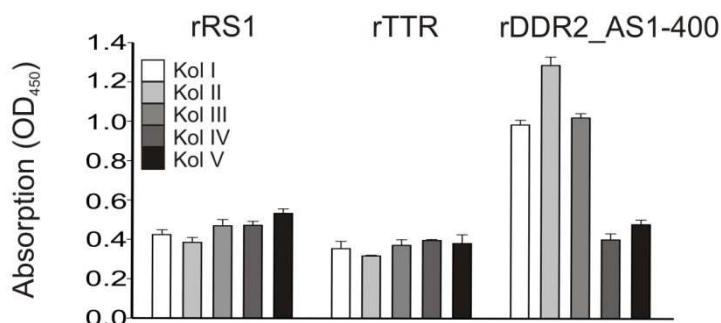


Abb.18: Überprüfung der Bindung des rRS1, rTTR und rDDR2_AS1-400 an die Kollagene I-V mit Hilfe des ELISA. Eine 96-well Platte wird mit den Kollagenen I-V beschichtet und mit den rekombinanten Proteinen inkubiert. Die gebundenen Proteine werden mit Hilfe einer Farbreaktion bei einer OD₄₅₀ nachgewiesen. Das rTTR wird als negative Kontrolle und das rDDR2_AS1-400 wird als positive Kontrolle für die Bindung an die Kollagene I, II und III eingesetzt. Rekombinantes Retinoschisin (rRS1), rekombinantes Transthyretin (rTTR), extrazelluläre Domäne des Discoidin Domäne Rezeptor 2 (rDDR2_AS1-400), Kollagen I bis V (Kol I-V)

Die Absorption des rRS1 beträgt in Gegenwart der Kollagene zwischen 0,39 und 0,53. Das rTTR bindet nicht an die Kollagene und zeigt eine Absorption von 0,32 bis 0,39. In Anwesenheit der bekannten Bindungspartner Kollagene I, II und III zeigt das rDDR2_AS1-400 eine Absorption von 0,99, 1,29 und 1,10. In Gegenwart der Kollagene IV und V, an die das rDDR2_AS1-400 nicht bindet (Leitinger et al. 2004; Ichikawa et al. 2007), wird eine Absorption von 0,39 und 0,48 detektiert. Das rRS1 verhält sich ähnlich wie das rTTR und zeigt keine Affinität zu den Kollagenen. Die Absorption des rRS1 liegt im Durchschnitt 0,10 über der des rTTR, jedoch ist die Absorption vergleichbar mit der des rDDR2_AS1-400 in Gegenwart der Kollagene IV und V. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das rRS1 nicht, wie der Discoidin Domäne Rezeptor 2, spezifisch an die Kollagene I, II oder III bindet (Abb.18).

4.1.6 Untersuchung der Bindung des Retinoschisins und der RS1-Cystein-Mutanten zu RS1-KO-Maus Netzhaut in Gegenwart von Monosacchariden

Die Bindung des RS1 an Galactose wurde gezeigt, indem das RS1 durch immobilisierte Monosaccharide präzipitiert wurde (Dyka et al. 2008). Die Galactose ist als Bestandteil der Proteoglykane und der Glykolisierung eines Proteins eine elementare Komponente der extrazellulären Matrix. Das RS1 könnte an Strukturen der Proteoglycane oder an glykosylierte Proteine binden. Aus diesem Grund wird überprüft, ob die Galactose die Bindung des RS1 zur RS1-KO-Maus Netzhaut beeinflusst und inwiefern die oligomere Struktur des RS1 hierbei eine Rolle spielt (Abb.19). Ein Galactose-abhängiger Einfluss wird durch den Einsatz der diasteriomeren Mannose untersucht.

Die Bindung des RS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S an RS1-KO-Maus Netzhäute in Gegenwart von 1 M Galactose bzw. Mannose wird wie in Kapitel 3.3.7 beschrieben durchgeführt.

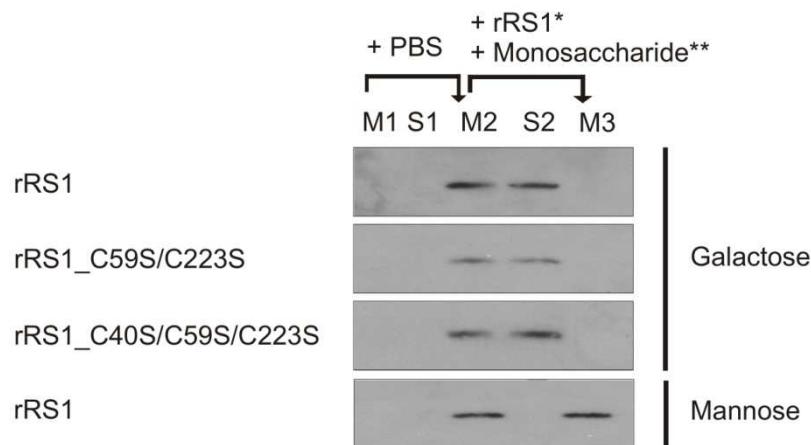


Abb.19: Blockieren der Bindung des rRS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S (rRS1*) an RS1-KO-Netzhaut mit Monosacchariden. Die Netzhäute werden homogenisiert und in zwei Zentrifugationsschritten (Pfeile) erst in PBS und danach in Zellkulturmedium mit rRS1 und 1 M Galactose oder Mannose (Monosaccharide**) resuspendiert. Die Fraktionen mit unlöslichen Zellbestandteilen sind als M1-M3 gekennzeichnet. Die durch die Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen sind als S1 und S2 gekennzeichnet. Das RS1 wird mit Hilfe des α RS1p Antikörpers nachgewiesen.

Das rRS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S wird in Gegenwart von 1 M Galactose jeweils im zweiten löslichen Überstand (S2) detektiert. In Anwesenheit der Mannose wird das rRS1 in der unlöslichen Fraktion (M3) nachgewiesen. Daraus folgend wird die Bindung des RS1 zu RS1-KO-Netzhäuten durch die Galactose inhibiert, durch die Mannose jedoch nicht. Die Galactose inhibiert die Bindung des RS1 unabhängig von dessen oligomerer Form. Es stellt sich die Frage, ob die Galactose unspezifisch die Bindung des RS1 zur RS1-KO-Maus Netzhaut blockiert oder ob sie essentieller Bestandteil der Bindung zum Bindungspartner ist.

4.1.7 Immunpräzipitation des Retinoschisins aus solubilisierter Mausnetzhäute

Molday und Mitarbeiter (2007) suchten mittels Immunpräzipitation von solubilisierten humanen Netzhäuten durch eine α RS1m Antikörper-Sepharosematrix nach Bindungspartnern des RS1. Sie identifizierten mit Hilfe des MALDI-TOF Verfahrens die $\alpha 3$ und $\beta 2$ Untereinheiten der Na/K ATPase als Bindungspartner und zeigten die Kolokalisation der $\alpha 3$ Untereinheit der Na/K ATPase mit dem RS1 in der Netzhaut.

Bei der Immunpräzipitation des RS1 aus Wildtypnetzhäuten, besteht der RS1 / Na/K ATPase-Komplex bereits bevor die Netzhäute solubilisiert werden. Die Bindung des RS1 an die Na/K ATPase wird möglicherweise nur an einer funktionsfähigen Plasmamembran gebildet und benötigt eventuell andere Proteine oder Lipide der Plasmamembran. Deshalb wird die Bindung der Na/K ATPase zum RS1 mittels Immunpräzipitation von rekombinantem RS1 an solubilisierten RS1-KO-Maus Netzhäuten untersucht (Abb.20). Hierbei muss sich der rRS1 / Na/K ATPase-Komplex bilden, nachdem die RS1-KO-Maus Netzhäute solubilisiert und die Plasmamembran aufgelöst wurde. Die Wahrscheinlichkeit, dass andere Proteine oder Lipide der Plasmamembran für die Bindung des rRS1 zur Na/K ATPase nötig sind, wird auf diese Weise reduziert.

Die RS1-KO-Maus Netzhäute werden wie in Kapitel 3.3.12 beschrieben solubilisiert und mit rRS1 inkubiert. Das rRS1 wird mit Hilfe des polyklonalen α RS1 Antikörpers präzipitiert. Anschließend wird das rRS1/Netzhaut-Gemisch (Abb.20, siehe „Auftrag“), die Protein-G Sepharose nach dem fünften Waschschritt (Abb.20, siehe „Eluat“) und der Überstand nach der Inkubation mit der Protein-G Sepharose (Abb.20, siehe „Durchfluss“) für einen Western Blot eingesetzt. Die spezifische Bindung der Na/K ATPase an das rRS1 wird durch die Immunpräzipitation in Abwesenheit des rRS1 überprüft.

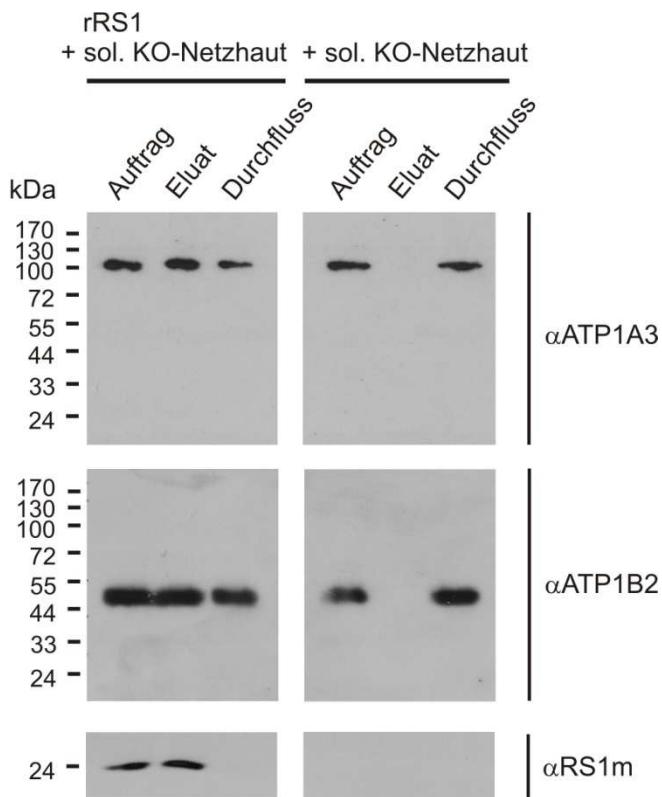


Abb.20: Immunpräzipitation des rRS1 aus solubilisierten RS1-KO-Maus Netzhäute und Überprüfung der Kopräzipitation der α 3/ β 2 Untereinheiten der ATPase. Die RS1-KO-Maus Netzhäute werden in einem Puffer mit 10 mM CHAPS solubilisiert und zentrifugiert. Anschließend wird der lösliche Überstand (sol. KO-Netzhaut) zur Immunpräzipitation eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wird der α RS1p Antikörper verwendet. Als Kontrolle für eine spezifische Bindung wird eine Immunpräzipitation in Abwesenheit von rRS1 durchgeführt. Das rRS1-Netzhaut-Gemisch (Auftrag), die Protein-G Sepharose nach den Waschschriften (Eluat) und die lösliche Fraktion nach der Inkubation mit der Protein-G Sepharose (Durchfluss) werden für einen Western Blot eingesetzt. Das Retinoschisin wurde mit Hilfe des monoklonalen α RS1 Antikörpers nachgewiesen. Die α 3 Untereinheit der Na/K ATPase wurde mittels des α ATP1A3 Antikörpers und die β 2 Untereinheit mit Hilfe des α ATP1B2 Antikörpers im Western Blot detektiert.

Das rRS1 wurde in der Auftragsfraktion und im Eluat detektiert. Dementsprechend wird das eingesetzte rRS1 quantitativ mit dem polyklonalen α RS1 Antikörper präzipitiert. Die α 3/ β 2 Untereinheiten werden unabhängig von der Gegenwart des rRS1 in der Auftrags- und Durchflussfraktion detektiert. In Gegenwart des rRS1 präzipitierten die α 3/ β 2 Untereinheiten im Eluat und deuten so auf eine Bindung mit dem rRS1 hin. Die α 3 Untereinheit migriert im SDS-Gel auf der Höhe eines ca. 115 kDa Proteins, bei einem kalkulierten Molekulargewicht von 111 kDa. Die Diskrepanz zwischen kalkuliertem und apparentem Molekulargewicht ist durch die Glykosylierung der Untereinheit erklärbar. Von den β Untereinheiten der Na/K-ATPase ist bekannt, dass sie in der Plasmamembran hochgradig glykosyliert werden (Chow

& Forte 1995). Die $\beta 2$ Untereinheit hat ein kalkuliertes Molekulargewicht von 33 kDa, durch die Glykolisierung migriert es im SDS-Gel mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Offensichtlich wird nur die in der Plasmamembran lokalisierte β Untereinheit solubilisiert und bindet an das rRS1. Inwiefern die $\alpha 3$ Untereinheit, die Glykosylierung der $\beta 2$ Untereinheit oder die Oberfläche der Plasmamembran für die Bindung bedeutend ist, ist gegenwärtig unklar.

4.1.8 Überprüfung der Interaktion des rRS1 und der RS1-Cystein-Mutanten mit der extrazellulären Domäne der $\beta 2$ Untereinheit der Na/K ATPase

Die Immunpräzipitation des rRS1 aus solubilisierten RS1-KO-Maus Netzhäuten deutet auf eine direkte Bindung mit der Na/K ATPase hin. Die $\beta 2$ Untereinheit ist als Bindungspartner wahrscheinlicher als die $\alpha 3$ Untereinheit, da sie eine erheblich größere extrazelluläre Domäne besitzt mit der das RS1 interagieren könnte. Ein definitiver Beweis der Bindung des RS1 an die $\beta 2$ Untereinheit steht jedoch noch aus. Das rRS1 bindet unabhängig von seiner oligomeren Form an die RS1-KO-Maus Netzhäute (Kap. 4.1.2). Ob das rRS1 auch unabhängig von seiner oligomeren Form an die $\beta 2$ Untereinheit bindet, wird mittels Immunopräzipitation überprüft.

Das rRS1 und die RS1-Cystein-Mutanten werden mit der extrazellulären Domäne der Na/K ATPase $\beta 2$ Untereinheit (r $\beta 2$ _AS1-239) inkubiert und anschließend für die Immunpräzipitation eingesetzt (Abb.21). Das RS1 wird jeweils durch den α RS1p Antikörper präzipitiert. Anschließend wird das RS1/r $\beta 2$ _AS1-239-Gemisch (Abb.21, Auftrag), die Protein-G Sepharose nach dem fünften Waschschritt (Abb.21, Eluat) und der Überstand des fünften Waschschrittes (Abb.21, Waschung) für einen Western Blot eingesetzt. Die spezifische Bindung der r $\beta 2$ _AS1-239 an das RS1 wird durch eine Immunpräzipitation in Abwesenheit des rRS1 überprüft.

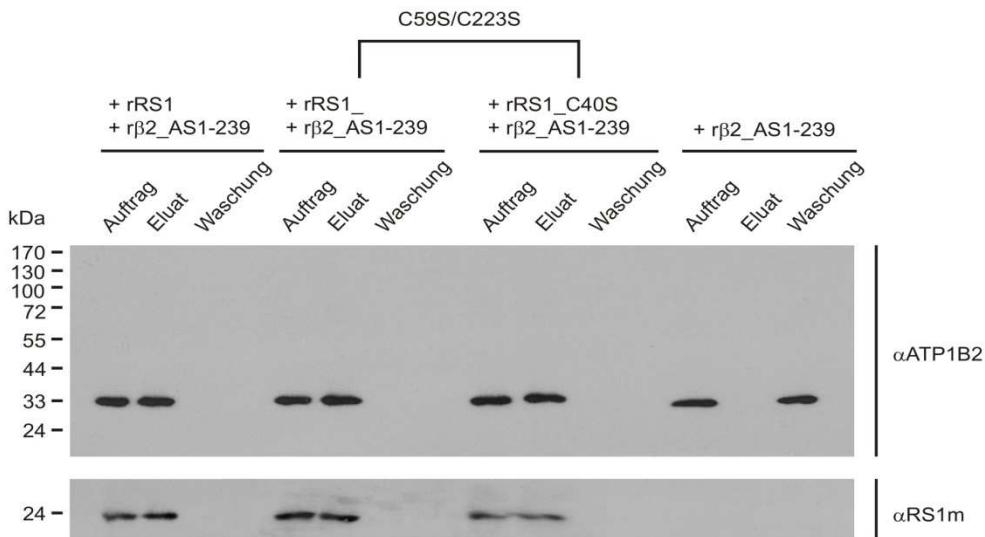


Abb.21: Überprüfung der Kopräzipitation des oktameren rRS1, des dimeren rRS1_C59S/C223S und des monomeren rRS1_C40S/C59S/C223S mit der extrazellulären Domäne der ATPase β 2 Untereinheit (r β 2_AS1-239). Das rRS1 und die RS1-Cystein-Mutanten werden zusammen mit r β 2_AS1-239 inkubiert und anschließend zur Immunpräzipitation eingesetzt. Für die Immunpräzipitation wird der α RS1p Antikörper verwendet. Als Kontrolle für eine spezifische Bindung wird die Immunpräzipitation in Abwesenheit des rRS1 durchgeführt. Das rRS1/r β 2_AS1-239-Gemisch (Auftrag), die Protein-G Sepharose nach den Waschschriften (Eluat) und der Überstand des fünften Waschschriften (Waschung) werden jeweils für den Western Blot eingesetzt. Das Retinoschisin wird mit Hilfe des α RS1m Antikörpers nachgewiesen. Die β 2 Untereinheit der Na/K ATPase wird mit Hilfe des α ATP1B2 Antikörpers im Western Blot detektiert.

Das rRS1, rRS1_C59S/C223S und rRS1_C40S/C59S/C223S wird jeweils im Auftrag und im Eluat detektiert. Dem entsprechend wird das eingesetzte rRS1 quantitativ präzipitiert. Das r β 2_AS1-239 wird immer im Auftrag nachgewiesen. In Abwesenheit des rRS1 wurde das r β 2_AS1-239 in der Waschung detektiert, was auf eine spezifische Bindung zum rRS1 deutet. Das r β 2_AS1-239 wird jeweils zusammen mit dem rRS1, rRS1_C59S/C223S und dem rRS1_C40S/C59S/C223S im Eluat detektiert. Dem entsprechend bindet das rRS1 unabhängig von seiner oligomeren Form an die extrazelluläre Domäne der β 2 Untereinheit. Das r β 2_AS1-239 wird bei einem berechneten Molekulargewicht von 27 kDa im Western Blot mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 33 kDa detektiert. Die Glykosylierung des r β 2_AS1-239 ist erheblich geringer als die der endogenen β 2 Untereinheit (Kap. 4.1.7, Abb.21), da sie nicht in die Plasmamembran integriert ist. Möglicherweise ist weder die Membranständigkeit der β 2 Untereinheit, noch deren Menge an Glykosylierungen entscheidend für die Bindung zum RS1.

4.1.9 Überprüfung der Bindung des Retinoschisins an die heterolog exprimierten Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten

Die Bindung des rRS1 an die $\beta 2$ Untereinheit wird in den vorherigen Kapiteln mit Hilfe der Immunpräzipitation gezeigt. Eine Methode bei der die $\beta 2$ Untereinheit jeweils aus der Plasmamembran gelöst oder gar nicht mit der Membran verbunden war. Anhand von homogenisiertem RS1-KO-Mausgewebe wird die Bindung des rRS1 an Netzhaut-Membranen gezeigt (Kap. 4.1.1), welche die Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten (Kap. 4.1.7) und eine Netzhaut spezifische Membranoberfläche enthalten. Wenn die $\beta 2$ Untereinheit alleine ausreichend für die Bindung des RS1 an die Plasmamembran ist, sollte umgekehrt das RS1 an jede Membran binden, welche die $\beta 2$ Untereinheit integral enthält. Diese Hypothese wird mit eukaryotischen Zellen, die endogen nicht die $\beta 2$ Untereinheit exprimieren, überprüft. Die Zellen werden jeweils mit der $\alpha 3$ Untereinheit, $\beta 2$ Untereinheit und beiden Untereinheiten zusammen transfiziert und die Expression mit Hilfe eines Western Blots und Immunocytochemie überprüft. Die Bindung des rRS1 zu den transfizierten HEK-293 EBNA Zellen wird nach dem gleichen Prinzip überprüft, wie bei der Bindung zur RS1-KO-Maus Netzhaut (Kap. 3.3.7).

Zuerst werden HEK-293 EBNA Zellen auf die endogene Expression der Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten untersucht (Abb.22). Das Zellkultur-Medium und die Zellen werden jeweils für einen Western Blot eingesetzt. Hierbei wird lediglich die $\alpha 3$ Untereinheit in den Zellen bei ca. 115 kDa detektiert. Darauf folgend werden die HEK-293 EBNA Zellen mit der $\alpha 3$ Untereinheit, $\beta 2$ Untereinheit und beiden Untereinheiten zusammen transfiziert. Anschließend wird die heterologe Expression der Na/K ATPase Untereinheiten mit Hilfe einer Western Blot Analyse überprüft (Abb.22).

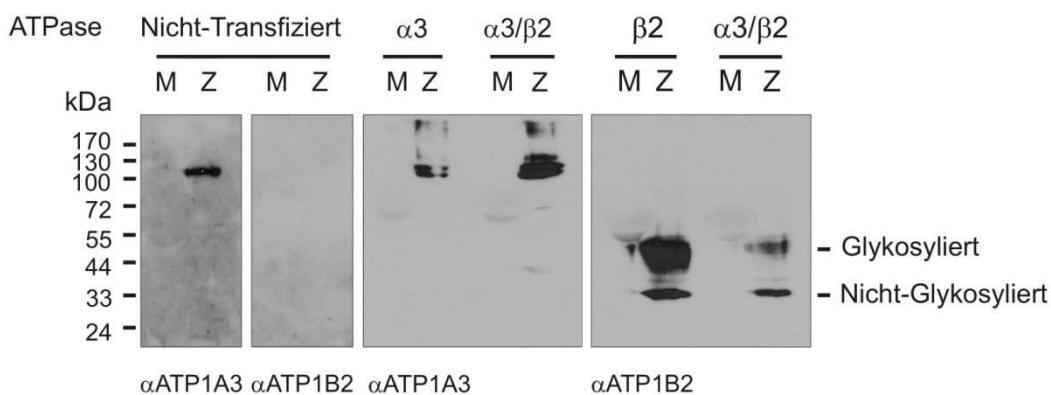


Abb.22: Überprüfung der endogenen und heterologen Expression der ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten in HEK-293 EBNA Zellen. Die Zellen werden jeweils mit der ATPase $\alpha 3$ Untereinheit, $\beta 2$ Untereinheit und mit beiden Untereinheiten zusammen transfiziert. Von den transfizierten und nicht-transfizierten Zellen wird jeweils das Zellkultur-Medium (M) und die Zellen (Z) für den Western Blot eingesetzt. Die glykosylierte und nicht-glykosylierte Form der ATPase $\beta 2$ Untereinheit ist gekennzeichnet. Die $\alpha 3$ Untereinheit wird mit Hilfe des α ATP1A3 Antikörpers und die $\beta 2$ Untereinheit mit dem α ATP1B2 Antikörper detektiert.

Beide Na/K ATPase Untereinheiten werden nicht im Zellkulturmedium detektiert. Die mit der $\alpha 3$ Untereinheit transfizierten Zellen zeigen im Western Blot eine Bande bei ca. 111 kDa und eine weitere bei ca. 115 kDa. Die Migration der $\alpha 3$ Untereinheit bei zwei Molekulargewichten deutet auf ihre nicht-glykosylierte und glykosylierte Form. Die nicht-glykosylierte $\alpha 3$ Untereinheit ist möglicherweise nur aufgrund ihrer Überexpression in den Zellen sichtbar. Die doppelt-transfizierten Zellen zeigen im Western Blot mit dem α ATP1A3 Antikörper eine Bande bei 111 kDa, 115 kDa und 130 kDa. Die Banden bei 111 kDa und 115 kDa sind durch die nicht-glykosylierte und glykosylierte Form erklärbar. Eine höhere Glykosylierung der $\alpha 3$ Untereinheit als 115 kDa ist in der Literatur nicht beschrieben, deshalb ist eine Migration der $\alpha 3$ Untereinheit von über 115 kDa möglicherweise ein Artefakt der Überexpression. Die mit der $\beta 2$ Untereinheit transfizierten Zellen zeigen im Western Blot Banden von 33 kDa bis 55 kDa. Bei 33 kDa wird die nicht-glykosylierte $\beta 2$ Untereinheit detektiert, die Migration mit höheren Molekulargewichten zeigt die unterschiedlichen Glykosylierungs-Zustände der $\beta 2$ Untereinheit. Der α ATP1B2 Antikörper detektiert im Western Blot der doppelt-transfizierten Zellen eine Bande bei 33 kDa und mehrere Banden im Bereich von 45 kDa bis 55 kDa. Diese Banden zeigen, wie bei den einfach-transfizierten Zellen, die unterschiedlichen Glykosylierungszustände der $\beta 2$ Untereinheit.

Die Expression der α 3 Untereinheit und β 2 Untereinheit in den HEK-293 EBNA Zellen ist erfolgreich, da jeweils die vollständig glykosylierte Form der Na/K ATPase Untereinheiten bei 115 kDa bzw. 55 kDa detektiert wird. Des Weiteren deuten die vollständig glykosylierten Na/K ATPase Untereinheiten auf eine Integration in die Plasmamembran hin, da die Glykosylierung dort vervollständigt wird (Chow & Forte 1995; Yarema & Bertozzi 2001). Die Lokalisierung der rekombinant exprimierten Proteine in den Zellen wird anschließend mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie überprüft (Abb.23). Die HEK-293 EBNA Zellen, transfiziert mit der α 3 Untereinheit, β 2 Untereinheit und doppelt-transfiziert mit beiden Untereinheiten, werden jeweils mit dem α ATP1A3 und dem α ATP1B2 Antikörper für die Immunocytochemie eingesetzt.

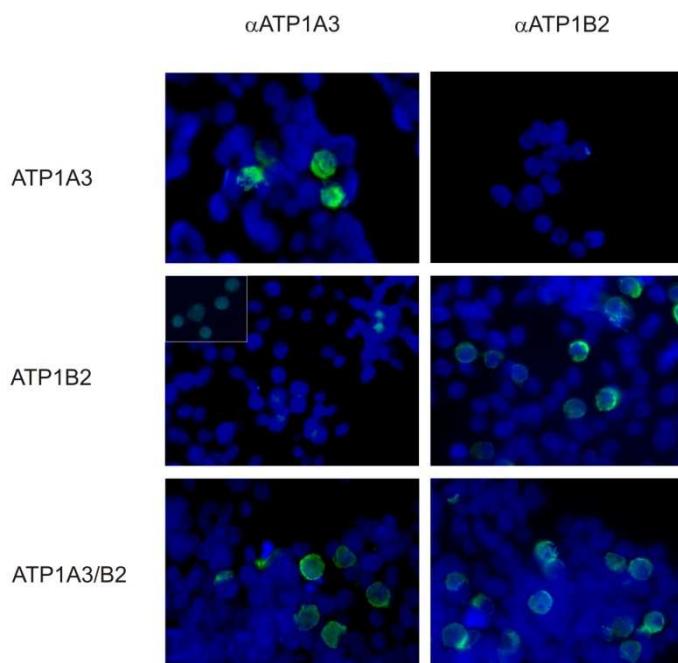


Abb.23: Immunocytochemische Analyse der endogenen und heterologen Expression der ATPase α 3/ β 2 Untereinheiten in HEK-293 EBNA Zellen. Die Zellen werden jeweils mit einer ATPase α 3 Untereinheit, β 2 Untereinheit oder mit beiden Untereinheiten zusammen transfiziert. Auf der linken Seite der Abbildung ist bezeichnet mit welcher ATPase Untereinheit die Zellen transfiziert wurden. Die α 3 Untereinheit wird mit Hilfe des α ATP1A3 Antikörpers (Bilder links) und die β 2 Untereinheit mit dem α ATP1B2 Antikörper (Bilder rechts) detektiert. Als 2. Antikörper wird der Alexa-488 (grün) eingesetzt. Der Ausschnitt im mittleren linken Bild zeigt die endogene Expression der ATPase α 3 Untereinheit. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt.

Die $\alpha 3$ Untereinheit wird in allen HEK-293 EBNA Zellen nachgewiesen. Das Signal der endogen exprimierten $\alpha 3$ Untereinheit ist allerdings erheblich schwächer als das in den transfizierten Zellen und wird nur durch eine Überexposition detektiert. Die endogene Expression der $\alpha 3$ Untereinheit ist als Bildausschnitt der mit der $\beta 2$ Untereinheit transformierten Zellen dargestellt (Abb.23, Bild Mitte links). Die ATPase $\beta 2$ Untereinheit wird jeweils nur in den mit ATPase $\beta 2$ transfizierten Zellen nachgewiesen. Die transfizierten Zellen zeigen eine Färbung des Cytoplasmas. Des Weiteren ist die Plasmamembran der transfizierten Zellen markiert, was auf eine Lokalisierung der Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten in der Plasmamembran hinweist. Die transfizierten HEK-293 EBNA Zellen exprimieren die $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K ATPase, transportieren sie an die Zelloberfläche, wo sie dann glykosyliert werden. Somit sind diese Zellen ein ideales System, um die Bindung des rRS1 an die Na/K ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten zu überprüfen (Abb.24).

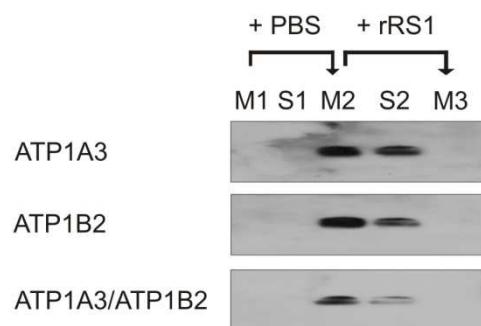


Abb.24: Bindung des rRS1 an HEK-293 EBNA Zellen, die mit der ATPase $\alpha 3$ Untereinheit (ATP1A3), ATPase $\beta 2$ Untereinheiten (ATP1B2) oder beiden Untereinheiten zusammen (ATP1A3/ATP1B2) transfiziert sind. Die Zellen werden homogenisiert und in zwei Zentrifugationsschritten (Pfeile) erst in PBS und danach in Zellkulturmedium mit rRS1 resuspendiert. Die Fraktionen mit unlöslichen Zellbestandteilen sind als M1-M3 gekennzeichnet. Die durch die Zentrifugation abgetrennten löslichen Fraktionen sind als S1 und S2 gekennzeichnet. Das RS1 wird mit Hilfe des α RS1p Antikörpers nachgewiesen.

Das rRS1 wird nach der Zugabe zu den transfizierten Zellen jeweils in der löslichen Fraktion (S2) nachgewiesen, unabhängig welche der Na/K ATPase Untereinheiten sie exprimieren. Offensichtlich bindet das rRS1 nicht an die rekombinanten ATPase $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten in der Plasmamembran. In den vorherigen Experimenten bindet das rRS1 an homogenisierte Membranen der RS1-KO-Mausnetzhäute (Kap. 4.1.1) und an die lösliche rekombinante $\beta 2$ Untereinheit (Kap. 4.1.8). Wenn das rRS1 nicht an die rekombinante $\beta 2$ -Untereinheit

bindet, die in einer Plasmamembran lokalisiert ist in der sie endogen nicht exprimiert ist, deutet es darauf hin, dass der Plasmamembran für die Bindung des rRS1 zur $\beta 2$ Untereinheit eine essentielle Komponente fehlt oder die Bindung blockiert.

4.2 Herstellung des α ARMS2 Antikörpers und der Nachweis des ARMS2 Proteins in humanem Gewebe

Das ARMS2 Gen hatte bis 2005 einen Annotationsstatus eines hypothetischen Gens (*LOC387715*), von dem in den Datenbanken nur eine mRNA-Sequenz und 16 ESTs (*expressed sequence tags*) hinterlegt waren. Die 818 bp lange cDNA-Sequenz besitzt einen offenen Leserahmen, der für ein 107 Aminosäuren langes Protein kodiert. Das ARMS2 Protein besitzt keine Homologien zu bekannten Proteinen oder Proteindomänen, daher sind Rückschlüsse auf seine Funktion nicht möglich.

Die Analyse mittels RT-PCR in humanem Gewebe zeigte eine Expression des ARMS2 in der Plazenta und in der Netzhaut (Rivera et al. 2005). Eine solche spezifische Expression deutet auf besondere Funktion des ARMS2 in der Netzhaut hin. In Bezug auf die gefundene Indel-Variante (NM_001099667.1: c.*372_815_del1443ins54) im 3'-nicht-translatierten Bereich des ARMS2 wurde die These aufgestellt, dass die Abwesenheit des ARMS2 Proteins direkten Einfluss auf das Risiko an AMD zu erkranken oder am Grad der Manifestation der Krankheit hat. Denn aufgrund des fehlenden Polyadenylierungssignals und der Insertion von 54 bp mit destabilisierenden mRNA-Sequenzen, die vermutlich zu einem frühzeitigen Abbau der mRNA führt, wird das ARMS2 wahrscheinlich nicht mehr oder nur vermindert translatiert. Ein unverzichtbares Werkzeug für die Arbeit mit Proteinen sind Antikörper, die in Methoden wie z.B. Western Blot, Immunpräzipitation oder Immunofluoreszenz-Färbungen eingesetzt werden. Nachfolgend wird beschrieben, wie für das ARMS2 ein Antikörper hergestellt, charakterisiert und für die Identifikation des ARMS2 in humanem Gewebe eingesetzt wurde, um die Expression des ARMS2 und seiner Indel-Variante zu überprüfen.

4.2.2 Expression des ARMS2 als Fusionsprotein in *E. coli* Zellen

Bei der Herstellung eines Antikörpers wird ein Antigen für die Immunisierung benötigt. Für den α ARMS2 Antikörper sollte rekombinantes ARMS2 eingesetzt werden, da somit auch Material für mögliche weitere Experimente zur Verfügung gestellt wird. Das ARMS2 Protein

wird in *E. coli* Zellen exprimiert, um in ausreichender Menge für die Immunisierung eines Kaninchens zur Verfügung zu stehen. ARMS2 hat ein Molekulargewicht von ca. 12 kDa und wird mit der Glutathion-S-Transferase (GST, ca. 26 kDa), dem Maltose-Bindepotein (MBP, ca. 43kDa) oder einem Anhang aus sechs Histidin Aminosäuren (His, ca. 2 kDa) als Fusionsprotein exprimiert. Die Expression der ARMS2-Fusionsproteine (rARMS2-GST; 38 kDa, rARMS2-MBP; 55 kDa, rARMS2-His; 14 kDa) in den *E. coli* BL21(DE3) und Rosetta Zellen ist in Abbildung 25 dargestellt.

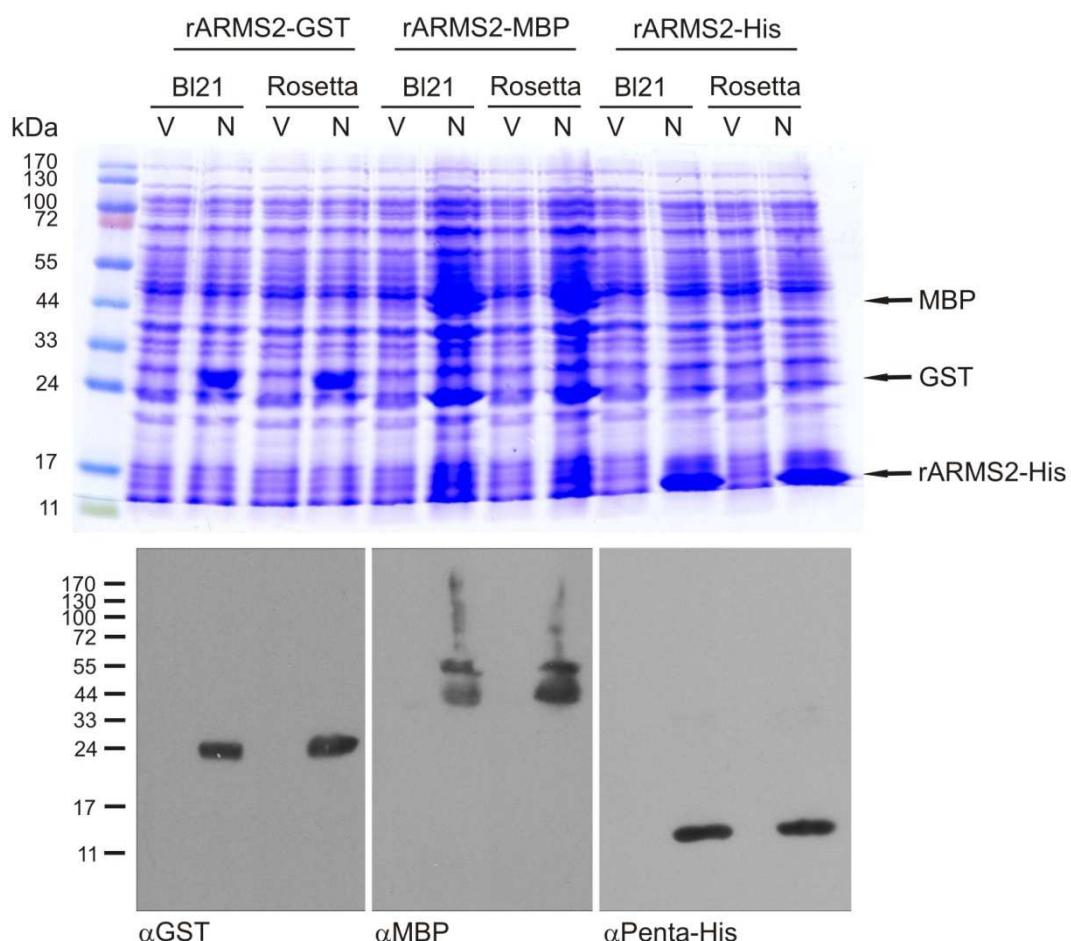


Abb.25: Überprüfung der Expression der rARMS2-GST, -MBP und -His Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) und Rosetta Zellen. Im oberen Teil der Abbildung ist ein Coomassie-Blau gefärbtes 12,5 % Gel dargestellt. Aufgetragen sind die Fusionsproteine, die jeweils in BL21(DE3) und Rosetta Zellen exprimiert werden. Für die SDS-PAGE wurden jeweils die Zellen vor (V) und 6 Stunden nach (N) der Induktion eingesetzt. Auf der rechten Seite des Gels ist mit Pfeilen die Laufhöhe des GST-Proteins, des MBP-Proteins und des rARMS2-His Fusionsprotein gezeigt. Im unteren Teil der Abbildung ist ein Western Blot mit den entsprechenden Fusionsproteinen dargestellt. Es wurde jeweils der α GST, α MBP und α Penta-His Antikörper eingesetzt.

Die Induktion ist bei allen Fusionsproteinen erfolgreich, da nach der Induktion im Western Blot jeweils das Fusionsprotein detektiert wird. Die rARMS2-GST transformierten Zellen zeigen im Coomassie-Blau gefärbten Gel ein starkes Signal bei ca. 26 kDa, im Western Blot wird dieses vom α GST Antikörper erkannt. Das rARMS2-GST Fusionsprotein hat ein berechnetes Molekulargewicht von 38 kDa. Offensichtlich wird das GST-Protein ohne den ARMS2-Anteil exprimiert. Das rARMS2-MBP hat ein berechnetes Molekulargewicht von 55 kDa und wird auch im Western Blot nachgewiesen. Gleichzeitig wird ein Signal bei ca. 43 kDa detektiert, welches dem Molekulargewicht des MPB-Proteins entspricht. Die Intensität der Signale deutet auf einen größeren Anteil an MBP-Protein als rARMS2-MBP hin. Das rARMS2-His hat ein berechnetes Molekulargewicht von ca. 14 kDa und wird im Western Blot auch bei dieser Migrationshöhe detektiert.

Die Expression der rARMS2-Fusionsproteine in *E. coli* BL21(DE3) und Rosetta Zellen sind vergleichbar, da sich die Intensitäten der Protein-Banden im Coomassie-Blau gefärbten Gel sowie im Western Blot nicht unterschieden. Das ARMS2 als GST- oder MBP-Fusionsprotein zeigt keine oder nur eine geringe Expression des vollständigen Fusionsproteins. Hauptsächlich wird der GST- oder MBP-*tag* exprimiert. Ob der ARMS2 Teil vom *tag* abbricht, die Translation vorher stoppt oder das ARMS2 durch eine Peptidase abgeschnitten wird, ist unklar. Einzig das rARMS2-His wird in ausreichender Menge exprimiert und wird für die nachfolgende Reinigung eingesetzt.

4.2.3 Reinigung des rARMS2-His Fusionsproteins

Der Großteil des rARMS2-His Fusionsproteins liegt als unlösliche Einschlussskörperchen in *E. coli* BL21(DE3) vor. Daher werden die Zellen mit einem harnstoffhaltigen Puffer lysiert. Harnstoff ist eine chaotrop Reagenz, die die Struktur des Wassers stört und so die hydrophoben Wechselwirkungen reduziert. Es bringt die Einschlussskörperchen in Lösung, jedoch denaturieren die Proteine aufgrund der reduzierten hydrophoben Wechselwirkungen. Die Lyse der Zellen wird durch Homogenisieren und anschließendes Sonifizieren vervollständigt und anschließend wird das Zelllysat für die Affinitäts-Chromatographie (Kap. 3.3.13) eingesetzt. Ausgewählte Fraktionen der Chromatographie sind für die SDS-PAGE und für eine Western Blot Analyse eingesetzt worden (Abb.26).

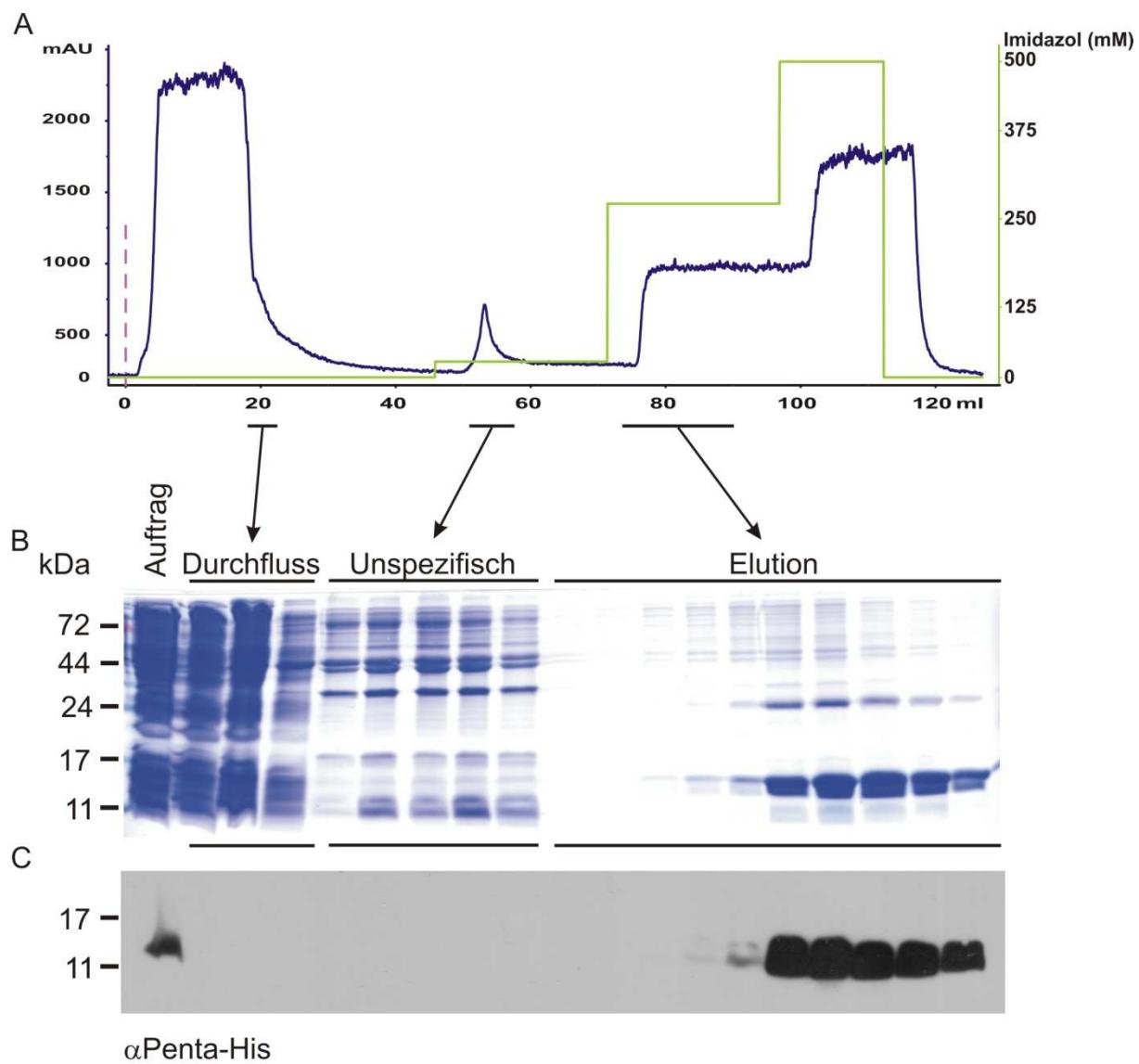


Abb.26: Chromatogramm der rARMS2-His Reinigung mit Hilfe einer Ni^{2+} -Sepharose Matrix, sowie ein Coomassie-Blau gefärbtes 15 % SDS-PAGE Gel und ein Western Blot mit ausgewählten Fraktionen. A) Im Chromatogramm ist auf der Abszissenachse das Volumen in Millilitern (ml) dargestellt und auf der linken Ordinatenachse ist die Absorption bei 280 nm in relativen Absorptionseinheiten (mAU) aufgetragen. Die rechte Ordinatenachse zeigt den Anteil des Imidazol im Elutionspuffer in Millimolar (mM) an. Die gestrichelte rosafarbende Linie markiert die Injektion des Zelllysats auf die Ni^{2+} -Chelat-Sepharose Säule. Die blaue Linie markiert die Absorption der Proteine bei 280 nm. Die grüne Linie markiert die Konzentration des Imidazols. Das eingesetzte Zelllysat wird als Auftrag bezeichnet. Die Fraktionen mit Proteinen, die nicht an die Säule binden werden als Durchfluss bezeichnet. Die unspezifisch gebundenen Proteine werden als Unspezifisch und die Fraktionen spezifisch gebundener Proteine werden als Eluat bezeichnet. C) Das rARMS2-His wurde mit Hilfe des α Penta-His Antikörpers im Western Blot detektiert.

Das rARMS2-His wird durch einen Imidazol Stufen-Gradienten bei 300 mM Imidazol eluiert. Das rARMS2-His wird bei einer Wellenlänge von 280 nm nur schlecht detektiert, möglicherweise weil es nur fünf aromatische Aminosäuren enthält. Die Fraktionen mit

rARMS2-His enthalten noch geringe Mengen an Verunreinigungen (Abb.26.B). Für die Immunisierung eines Kaninchens musst das rARMS2-His in einen isotonischen Puffer überführt werden, damit dem Kaninchen kein gesundheitlicher Schaden entsteht.

4.2.4 Überprüfung der Proteinsequenz des rARMS-His mittels MALDI-TOF

Die Aminosäuresequenz des rARMS2-His wird mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie überprüft. Durchgeführt und analysiert wurde die Massenspektrometrie von Herrn Dr. Günter Lochnit (Protein Analytics, Giessen). Das gereinigte rARMS2-His (Kap. 4.2.3) wird für eine SDS-PAGE mit einem 15 % Polyacrylamid-Gel eingesetzt. Das rARMS2-His wird anschließend aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und zur MALDI-Massenspektrometrie eingesetzt (Abb.27).

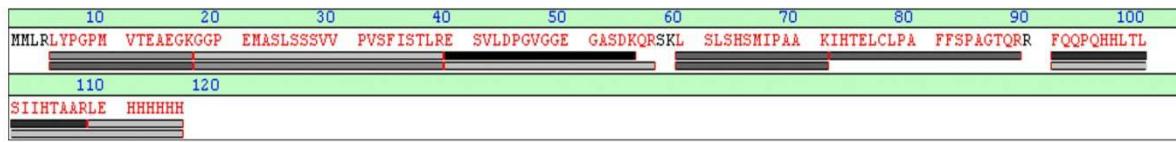


Abb.27: Sequenzabdeckung des rARMS2-His Proteins mittels der über MALDI-Massenspektrometrie identifizierten Peptide. In rot sind identifizierte Aminosäuren dargestellt, schwarz bezeichnet die nicht identifizierten Aminosäuren des rARMS2-His im Ein-Buchstaben-Code. Die grauen und schwarzen Balken unter den Aminosäuren stellen die Länge und Häufigkeit der identifizierten Peptide dar. Je häufiger ein Peptid detektiert wurde, desto dunkler ist der Balken.

Mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie wurden 21 Peptidsequenzen identifiziert, die mit 94 % die Aminosäure-Sequenz des rARMS2-His repräsentieren. Das rARMS2-His wurde fast komplett sequenziert, was auf eine vollständige und korrekte Translation des ARMS2 hinweist.

4.2.5 Renaturierung des rARMS2-His Proteins nach Vohra et al. (2007)

Die Renaturierung eines denaturierten Proteins kann durch das langsame Entfernen des Detergenz mittels Dialyse erfolgen. Nach der Methode von Vohra und Mitarbeiter (2007) wird das Detergenz in fünf Dialyseschritten reduziert und in zwei weiteren Dialyseschritten quantitativ entfernt. Die eingesetzten Puffer enthalten L-Arginin und Glycerol, welche die Renaturierung des Proteins unterstützen sollen.

Das rARMS2-His wird bei der Affinitätschromatographie mit einem Puffer eluiert (Kap. 4.2.3), der 8 M Harnstoff enthält. Die Konzentration des Harnstoffs wird mit der ersten Dialyse auf 4 M reduziert. In vier weiteren Dialyseschritten wird die Harnstoff-Konzentration weiter auf 1 M reduziert. Beim darauf folgenden Dialyseschritt zur quantitativen Entfernung des Harnstoffs präzipitiert das rARMS2-His. Die schrittweise Entfernung des Harnstoffs durch eine Dialyse wurde viermal durchgeführt. Offensichtlich ist die langsame Reduzierung der Harnstoff-Konzentration nicht geeignet für die Renaturierung des rARMS2-His und es müssen andere Methoden für eine Renaturierung gesucht werden.

4.2.6 Renaturierung des rARMS2-His nach Swope-Willis et al. (2005)

Swope-Willis und Mitarbeiter untersuchten die Eigenschaften verschiedener Reagenzien zur Renaturierung von Proteinen (Willis et al. 2005). Sie denaturierten gereinigte Enzyme und renaturierten die Enzyme, indem sie schnell in unterschiedlichen Puffern verdünnt wurden, anschließend wurde die Aktivität der Enzyme bestimmt. Dadurch zeigen sie, dass bestimmte pH-Werte und Reagenzien die Renaturierung eines Proteins fördern. Basierend auf ihren Ergebnissen wurden die geeigneten Pufferbedingungen für die Renaturierung des rARMS2-His überprüft (Tab.2) und optimiert (Tab.3).

Das rARMS2-His wird 1:8 mit verschiedenen Puffern verdünnt. Jeweils 25 µg des rARMS2-His werden pro Renaturierung eingesetzt. Alle Puffer enthalten 120 mM NaCl und 10 mM KCl. Das rARMS2-His wird bei vier unterschiedlichen pH-Werten, in Kombination mit verschiedenen Detergenzien und Reduktionsmittel verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert (Kap. 3.3.16). In den Tabellen 2 und 3 markiert ein rotes X präzipitiertes rARMS2-His und ein grünes X markiert lösliches rARMS2-His. Die Messungen werden jeweils in Triplikaten durchgeführt.

Tab. 2: Pufferbedingungen für die Renaturierung des rARMS2-His

Detergenz	-	DD M	T-80	-	DD M	T-80	-	DD M	T-80	-	DDM	T-80
Reduktionsmittel	-	-	-	DT T	DT T	DT T	TCE P	TCE P	TCE P	GS:GS SG	GS:GS SG	GS:GS SG
pH 5,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
pH 6,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
pH 8,2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
pH 9,5	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Das rARMS2-His präzipitiert in Abwesenheit von Detergenzien und in Gegenwart des DDM, bei den pH-Werten 5,5 und 6,5. Einzige Ausnahme ist die Bedingung bei pH-Wert 6,5, in Abwesenheit von Detergenzien und Gegenwart von TCEP. In Gegenwart des DDM und der Reduktionsmittel DTT und TCEP präzipitiert das rARMS2-His auch bei einem pH-Wert von 8,2. In Anwesenheit des DDM und eines Gemisches von oxidiertem/reduziertem Glutathion (GS:GSSG) präzipitiert das rARMS2-His auch bei den pH-Werten 8,2 und 9,5. Das Detergenz T-80 unterstützt offenbar die Renaturierung des rARMS2-His, da das Protein nur in Gegenwart des Glutathions bei einem pH-Wert von 9,5 präzipitiert. Die Reduktionsmittel haben offensichtlich keinen oder eher einen störenden Einfluss auf die Renaturierung des rARMS2-His. Zudem ist das rARMS2-His bei basischen pH-Werten besser löslich als bei sauren pH-Werten.

Zur Immunisierung eines Kaninchens mit rARMS2-His muss der Puffer bestimmte Bedingungen erfüllen. Der pH-Wert des Puffers sollte zwischen 7 und 8 liegen und keine Detergenzien oder Reduktionsmittel enthalten, damit die Gesundheit des Tieres nicht beeinträchtigt wird. Deshalb wurden die Pufferbedingungen zum Renaturierung des rARMS2-His dem physiologischen pH-Wert angepasst und auf Reduktionsmittel verzichtet (Tab.3).

Tab. 3: Endgültige Pufferbedingungen für die Renaturierung des rARMS2-His

pH-Wert	-	T-80
pH 6,5	X	X
pH 7,6	X	X
pH 7,8	X	X
pH 8,2	X	X

Das rARMS2-His präzipitiert wie oben beschrieben in Abwesenheit von Detergenzien bei einem pH-Wert von 6,5. Bei den pH-Werten 7,6, 7,8 und 8,2 bleibt das rARMS2-His in Lösung. In Gegenwart des T-80 bleibt das rARMS2-His bei allen getesteten pH-Werten in Lösung.

Ein Verdünnen des rARMS2-His mit Puffern, die einen physiologischen pH-Wert bei einer isotonischen Salz-Konzentration besitzen, ist scheinbar möglich. Jedoch ist die eingesetzte 1:8 Verdünnung zu gering, um die Harnstoff-Konzentration auf ein nicht toxisches Niveau von unter 10 mM zu bringen. Bei den getesteten Bedingungen wird die Harnstoff-Konzentration von 500 mM auf ca. 60 mM gesenkt. Eine weitere Reduzierung der Harnstoff-Konzentration durch eine höhere Verdünnung würde jedoch das Volumen für die Immunisierung zu stark erhöhen. Deshalb wird das rARMS2-His jeweils mit den positiv getesteten Puffern aus Tabelle 3 1:8 verdünnt und anschließend dialysiert (Kap. 3.3.15). Das rARMS2-His präzipitiert jedoch bei allen getesteten Pufferbedingungen bei der Dialyse. Eine quantitative Abtrennung des Harnstoffs ist somit nicht möglich. Daher musste eine alternative Methode für die Immunisierung mit rARMS2-His eingesetzt werden.

4.2.7 Isolierung der Einschlusskörperchen des rARMS2-His aus *E. coli* nach Nagai und Thogersen (1987)

Eine Alternative zur Immunisierung mit löslichem Protein ist der Einsatz des Proteins in Form von gereinigten Einschlusskörperchen. Zu diesem Zweck wird das rARMS2-His in *E. coli* Zellen exprimiert und mittels hypotonischem Puffer und Lysozym werden die Zellen lysiert. Die DNA wird durch Sonifizieren zerkleinert und der Großteil schwerlöslicher Zellbestandteile wird mit Hilfe eines detergenzhaltigen Puffers gelöst. Die Einschlusskörperchen werden durch eine Zentrifugation pelletiert und mehrmals mit einem

detergenzhaltigen Puffer gereinigt. Anschließend werden die Einschlusskörperchen mit 70 % Ethanol gewaschen und in PBS resuspendiert. Die isolierten rARMS2-His Einschlusskörperchen werden anschließend für SDS-PAGE und Western Blot Analysen eingesetzt (Abb.28).

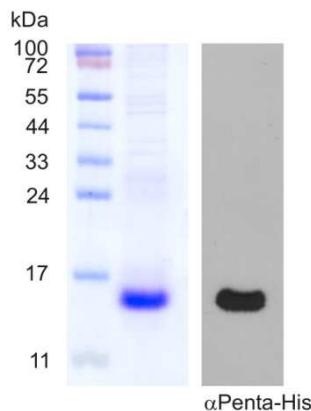


Abb.28: Coomassie-Blau gefärbtes 15 % SDS-Gel und Western Blot Analyse der gereinigten rARMS2-His Einschlusskörperchen. Für den Western Blot wurde der α Penta-His Antikörper eingesetzt.

Im Coomassie-Blau gefärbten SDS-Gel werden noch unspezifische Proteine detektiert. Das intensivste Signal im SDS-Gel wird bei ca. 15 kDa detektiert, was etwa dem Molekulargewicht des rARMS2-His entspricht. Im Western Blot zeigen die gereinigten Einschlusskörperchen ein Signal bei ca. 15 kDa. Die Einschlusskörperchen des rARMS2-His wurden erfolgreich isoliert. Sie enthalten noch geringe Verunreinigungen, welche bei der Immunisierung jedoch nicht stören.

4.2.8 Überprüfung des α ARMS2 Antikörper mittels Western Blot

Das Serum mit dem α ARMS2 Antikörper wurde von der Firma ImmunoGlobe Antikörpertchnik GmbH in drei Schritten gereinigt (Kap. 3.3.18). Im ersten und zweiten Schritt wurden die *E. coli* spezifischen und die α Histidin Antikörper durch positive Immunadsorptionen entfernt. Beim dritten Reinigungsschritt wurden die α ARMS2 Antikörper durch eine negative Immunadsorption gereinigt.

Die Sensitivität des gereinigten α ARMS2 Antikörpers wird mit Hilfe eines Western Blots überprüft. Die Einschlusskörperchen des rARMS2-His werden in Mengen von 0,5 bis 480 ng eingesetzt, anschließend wird das rARMS2-His mit dem gereinigten α ARMS2 Antikörper

und dem α Penta-His Antikörper detektiert (Abb.29). Die Antikörper werden jeweils in einer Konzentration von 1 μ g/ml eingesetzt.

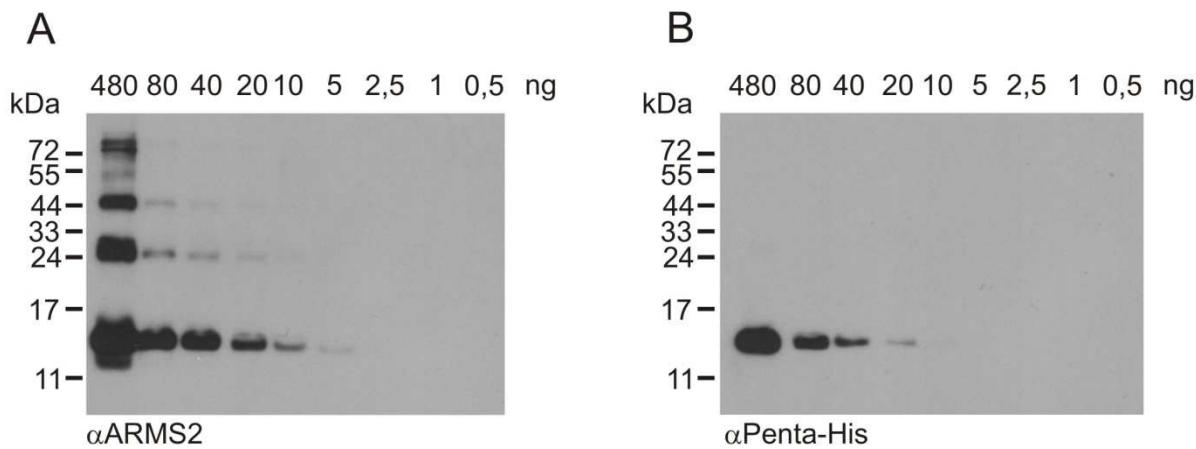


Abb.29: Sensitivität des α ARMS2 Antikörpers. Die Einschlusskörperchen des rARMS2-His werden jeweils in Mengen von 0,5 bis 480 ng für die Western Blot Analyse eingesetzt. Der α ARMS2 Antikörper detektiert bei 480 ng Protein neben dem rARMS2-His noch zahlreiche unspezifische Proteine. Die zwei unspezifischen Signale bei ca. 25 kDa und ca. 44 kDa werden bis zu einer Menge von 20 ng Protein detektiert. Das rARMS2-His wird in Mengen von bis zu 5 ng vom α ARMS2-His Antikörper detektiert. Der α Penta-His Antikörper detektiert das rARMS2-His bis zu einer Menge von 20 ng rARMS2-His.

Der α ARMS2 Antikörper detektiert das rARMS2-His bei ca. 15 kDa bis zu einer Menge von 5 ng Protein. Bei einer Proteinmenge von 480 ng werden zahlreiche unspezifische Protein detektiert. Die unspezifischen Signale bei 25 kDa und 44 kDa werden bis zu einer Menge von 20 ng detektiert. Der α Penta-His Antikörper detektiert nur ein Signal bei ca. 15 kDa bis zu einer Proteinmenge von 20 ng.

Das rARMS2-His wird von beiden Antikörpern spezifisch bei 15 kDa detektiert. Die Einschlusskörperchen des rARMS2-His enthalten noch Verunreinigungen durch *E. coli* Proteine, deshalb ist die tatsächlich eingesetzte Proteinmenge an rARMS2-His niedriger als die berechnete Proteinmenge. Eine Detektion von unter 5 ng Protein im Western Blot deutet auf eine gute Qualität des α ARMS2 Antikörpers hin. Inwiefern die unspezifischen Proteine einen Einfluss auf die Spezifität des α ARMS2 Antikörpers hat, wird durch einen Western Blot mit rekombinantem ARMS2 (rARMS2-His_e), das als His-tag Fusionsprotein in HEK-293 EBNA Zellen exprimiert wird, überprüft (Abb.30).

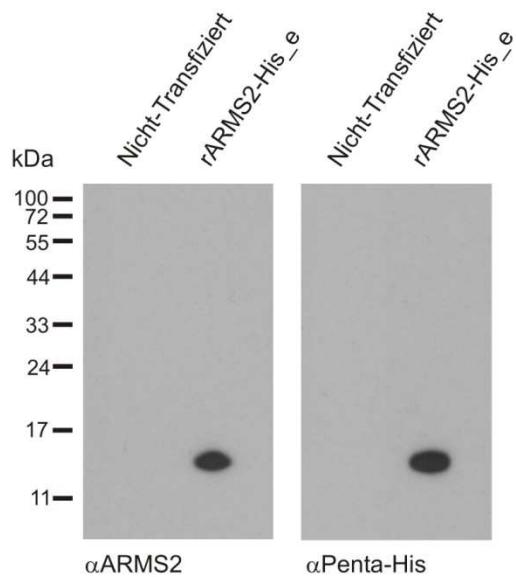


Abb.30: Expression des rARMS2-His_e in HEK-293 EBNA Zellen. Die nicht-transfizierten und die rARMS2-His_e transfizierten HEK-293 EBNA Zellen wurden für den Western Blot eingesetzt. Das rARMS2-His_e wurde jeweils mit dem α ARMS2 und α Penta-His Antikörper bei 15 kDa detektiert.

Der α ARMS2 und der α Penta-His Antikörper detektieren jeweils nur in den transfizierten Zellen bei 15 kDa das rARMS2-His_e. Bei den HEK-293 EBNA Zellen werden vom α ARMS2 Antikörper keine unspezifischen Proteine detektiert, dementsprechend ist der Antikörper bei eukaryotischen Zellen spezifisch.

4.2.9 Epitop Identifizierung des α ARMS2 Antikörpers

Ein Epitop ist ein Bereich oder eine Sequenz gegen das ein Antikörper spezifisch bindet und das in der Regel etwa 4 bis 12 Aminosäuren umfasst. Die Charakterisierung der Epitope des α ARMS2 Antikörpers könnte später Rückschlüsse auf die Lokalisierung, Funktion oder Struktur des ARMS2 ermöglichen. Des Weiteren könnte der α ARMS2 Antikörper polyklonal sein und Antikörper gegen mehrere Epitope enthalten. Die Peptide dieser Epitope könnten zur Epitop-spezifischen Reinigung der Antikörper eingesetzt werden, so dass man auf diese Weise unterschiedliche monoklonale Antikörper erhält, die das gleiche Protein erkennen.

Der α ARMS2 Antikörper wird nach den Vorgaben und dem Protokoll der Firma JPT Peptide Technologies GmbH für *PepSPOTs* kartiert. Dazu wird eine Cellulose-Membran eingesetzt, an der Peptide, welche der Aminosäuresequenz des ARMS2 entsprechen, kovalent gebunden sind (Abb.31). Die jeweiligen Peptide haben eine durchschnittliche Länge von

15 Aminosäuren und ihre Sequenzen überlappten jeweils mit 11 Aminosäuren der benachbarten Peptide. Der α ARMS2 Antikörper wird mit einer Konzentration von 1 μ g/ml für den Western Blot eingesetzt.

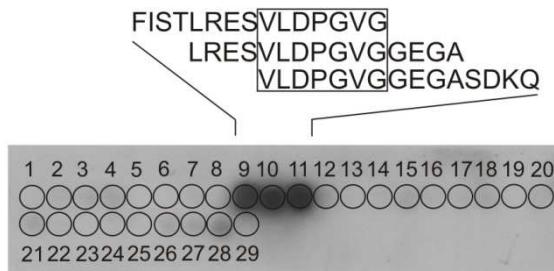


Abb.31: Die Epitop Kartierung des α ARMS2 Antikörpers mittels PepSPOT. Auf der Cellulose-Membran sind 29 Peptide kovalent an die Membran gebunden, welche die gesamte ARMS2 Proteinsequenz abdecken. Ein Peptid hat eine Länge von 15 Aminosäuren, dessen Sequenz überschneidet sich jeweils mit 11 Aminosäuren seiner benachbarten Peptide. Die Cellulose-Membran wird für einen Western Blot mit 1 μ g/ml α ARMS2 Antikörper eingesetzt. Die Peptide 9, 10 und 11 zeigen ein Signal. Die Aminosäuresequenz dieser Peptide ist dargestellt und die übereinstimmenden Aminosäuren der drei Peptide sind umrandet.

Im Western Blot wird ein spezifisches Signal bei den Peptiden 9, 10 und 11 detektiert. Die Aminosäuresequenz VLDPGVG ist bei allen drei Peptiden enthalten und ist deshalb Bestandteil des Epitops. Es wird nur ein Epitop identifiziert, dieses kann eventuell zur Reinigung des α ARMS2 Antikörpers eingesetzt werden.

4.2.10 Überprüfung der Expression des ARMS2 Proteins in humanen Geweben

Die Expression und Lokalisierung des ARMS2 wird bereits in Publikationen beschrieben (Kanda et al. 2007). Zum einen wird die Expression der mRNA des ARMS2 mittels RT-PCR in der Netzhaut und der Plazenta nachgewiesen (Rivera et al. 2005). Es wird auch gezeigt, dass die Expression des ARMS2 in der Netzhaut im Vergleich zur Plazenta geringer ist. Zum anderen wird mittels Immunofluoreszenzfärbungen eine Kolokalisation von rekombinantem ARMS2 und Mitochondrien in COS-1 Zellen gezeigt (Kanda et al. 2007). Das endogene ARMS2 Protein in humanem Gewebe wurde bisher aber noch nicht untersucht.

Das Gewebe von humaner Niere, Plazenta, Retina und Herz wird für den Nachweis des endogenen ARMS2 eingesetzt (Abb.32). Die Gewebe werden jeweils in einem glucosehaltigen Puffer homogenisiert und der lösliche Überstand nach einer Zentrifugation

zur Immunpräzipitation verwendet. Für den Nachweis des ARMS2 in der Netzhaut werden drei Netzhäute eingesetzt, um eine eindeutige Aussage über die Expression des ARMS2 zu ermöglichen. Da aufgrund des schwachen Signals der ARMS2 mRNA in der RT-PCR, auch ein entsprechend schwaches Signal im Western Blot erwartet wird. Die eingesetzte Menge an Zelllysat wird über ERK1/2 Färbung normalisiert.

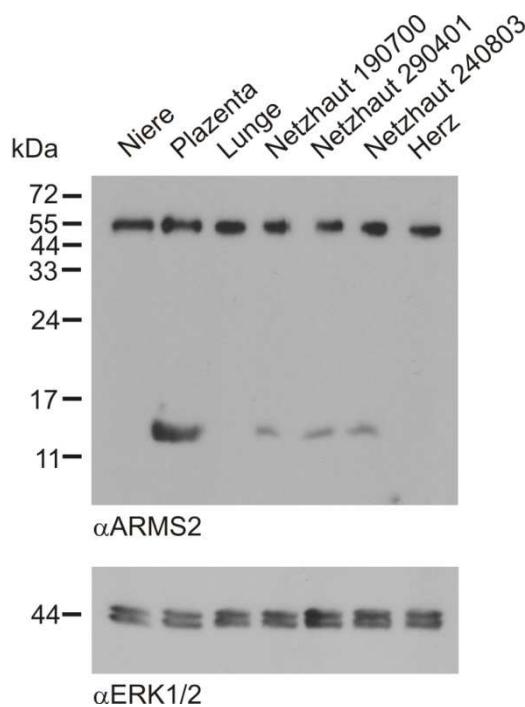


Abb.32: Immunpräzipitation des ARMS2 aus humanen Geweben durch den α ARMS2 Antikörper. Das ARMS2 wird mit Hilfe des α ARMS2 Antikörpers im Western Blot bei ca. 13 kDa nachgewiesen. Aufgetragen wurde jeweils das Eluat der Immunpräzipitationen. Bei ca. 55 kDa wird die schwere Kette des α ARMS2 Antikörpers detektiert. Die zur Immunpräzipitation eingesetzte Menge an Zelllysat wird auf Grundlage der ERK1/2 Färbung normalisiert.

Der α ARMS2 Antikörper zeigt im Western Blot ein Signal bei ca. 13 kDa und eins bei ca. 55 kDa. Das Signal bei 55 kDa wird in allen Geweben detektiert und entspricht dem Molekulargewicht der schweren Kette des Immunglobulins. Das Signal bei 13 kDa zeigt in der Plazenta und Netzhaut das endogene ARMS2. Der Nachweis des endogenen ARMS2 Proteins bedeutet zum einen, dass das ARMS2 Gen ein proteinkodierendes Gen ist und zum anderen, dass das ARMS2 Protein eine Funktion besitzen könnte die Einfluss auf die Entwicklung der AMD hat.

4.2.11 Vergleich der Proteinexpression des ARMS2 und der ARMS2_indel Variante in humanen Plazenten

In einer Region, die sich vom *ARMS2* bis hin zur Promotorregion des *HTRA1* erstreckt, wurden 15 Hoch-Risikovarianten identifiziert, die alle mit der AMD assoziiert sein könnten (Fritzsche et al. 2008). Eine der Hoch-Risikovarianten ist besonders auffällig, da sie im *ARMS2* Gen eine Insertion und eine Deletion enthält (NM_001099667.1:c.*372_815del443ins54), diese Variante des *ARMS2* wird in dieser Arbeit bezeichnet als *ARMS2_indel*. Bei *ARMS2_indel* fehlen 443 bp des 3'-nicht-translatierten Bereichs einschließlich des Polyadenylierungssignals. Stattdessen ist dort eine 54 bp-Insertion mit Sequenzmotiven, die als destabilisierende RNA-Elemente bekannt sind (Khabar 2005; Garneau et al. 2007; Fritzsche et al. 2008). Das *ARMS2-indel* ist deshalb interessant, weil durch das fehlende Polyadenylierungssignal und die destabilisierenden RNA-Elemente es höchst wahrscheinlich nicht, oder nur im reduzierten Maße translatiert wird. Dementsprechend könnte das erhöhte Risiko an AMD zu erkranken auf eine erniedrigte Konzentration oder einem Fehlen des *ARMS2* zurück zu führen sein.

Die Proteinexpression des *ARMS2* und des *ARMS2_indel* wird mittels Immunpräzipitation aus Plazenta-Zelllysat mit anschließendem Western Blot überprüft (Abb.33). Die Plazenten wurden genotypisiert und für das *ARMS2* (+) bzw. *ARMS2_indel* (indel) als homozygot (+/+, indel/indel) oder heterozygot (+/indel) klassifiziert. Es werden von einem Genotyp jeweils drei individuelle Plazenten eingesetzt, um eine eindeutige Aussage über die Expression des *ARMS2* bzw. *ARMS2_indel* zu ermöglichen. Von den Plazenten die homozygot für das *ARMS2_indel* sind, stand nur eine zu Verfügung. Damit auch schwächste Signale eindeutig detektiert werden, werden mit der homozygoten *ARMS2_indel* Plazenta drei unabhängige Immunpräzipitationen durchgeführt. Die Plazenten werden jeweils in einem glucosehaltigen Puffer homogenisiert und der lösliche Überstand nach einer Zentrifugation zur Immunpräzipitation eingesetzt. Das *ARMS2* bzw. *ARMS2_indel* wird mit Hilfe des α *ARMS2* Antikörpers im Western Blot nachgewiesen. Die eingesetzte Menge an Zelllysat wird durch die Menge an ERK1/2 normalisiert.

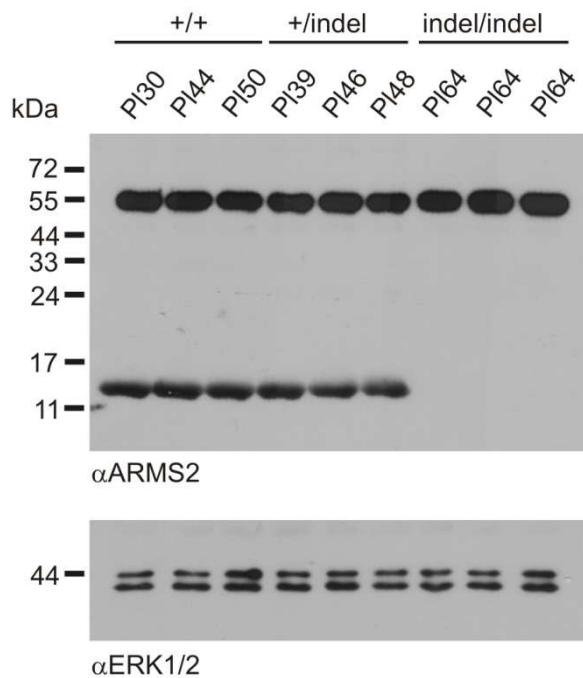


Abb.33: Immunpräzipitation des ARMS2 und ARMS2_indel aus humanen Plazenten durch den α ARMS2 Antikörper. Die Plazenten PI30, PI44 und PI50 sind homozygot für das ARMS2 (+/+). Die Plazenten PI39, PI46 und PI48 sind heterozygot für das ARMS2_indel (+/indel) und die Plazenta PI64 ist homozygot für das ARMS2_indel (indel/indel). Das ARMS2 bzw. ARMS2_indel wird mit Hilfe des α ARMS2 Antikörpers im Western Blot jeweils bei ca. 13 kDa nachgewiesen. Aufgetragen wird jeweils das Eluat der Immunpräzipitationen. Bei ca. 55 kDa wird die schwere Kette des Immunglobulins detektiert. Die zur Immunpräzipitation eingesetzte Menge an Zelllysat wird über das ERK1/2 Protein normalisiert.

Das ARMS2 wird in den Plazenten PI30, PI44 und PI50 bei ca. 13 kDa detektiert. In den heterozygoten Plazenten PI39, PI46 und PI48 wird ebenfalls ein Signal bei ca. 13 kDa detektiert. In der homozygoten ARMS2_indel Plazenta PI64 wird kein Signal bei 13 kDa detektiert. Bei allen Immunpräzipitationen wird ein Signal bei ca. 55 kDa nachgewiesen, das dem Molekulargewicht einer schweren Kette des Immunglobulins entspricht.

Eine verminderte Expression des ARMS2 bei den heterozygoten Plazenten, im Vergleich zu den ARMS2 homozygoten Plazenten, ist nur schlecht abzuschätzen. Eindeutig ist jedoch, dass das in der ARMS2_indel homozygoten Plazenta kein ARMS2 exprimiert wird oder die Menge an ARMS2 unterhalb der Detektionsgrenze des Western Blots liegt. Dieser Befund unterstützt die These von einem erhöhten Risiko an AMD zu erkranken aufgrund eines Verlustes oder einer reduzierten Menge an ARMS2.

5. Diskussion

Die erblichen Dystrophien der Netzhaut umfassen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die aufgrund von Mutationen in einem Gen zu Störungen in der Netzhautentwicklung oder dessen Funktion führen. Einen kleinen Ausschnitt vom Erscheinungsbild und Verständnis der erblichen Netzhautdystrophien wird anhand in dieser Arbeit behandelten Erkrankungen der X-gebundene juvenilen Retinoschisis (XRS) und der altersabhängigen Makuladegeneration (AMD) gezeigt.

Bisher werden Phospholipide, Kollagene, Kohlenhydrate und diverse Proteine, darunter auch die Na/K-ATPase, als Bindungspartner für das vermeindliche Strukturprotein RS1 diskutiert. Jedoch konnte keiner der gefundenen Bindungspartner bestätigt werden. Durch die Überprüfung der potentiellen Bindungspartner des RS1 können Phospholipide und Kollagene als Bindungspartner ausgeschlossen werden. Die Bindung an bestimmte Kohlenhydrate und der Na/K-ATPase wird bestätigt und deutet auf eine komplexe Funktion des RS1, als Vermittlerprotein zwischen verschiedenen Na/K-ATPasen, hin.

Die Identifizierung eines Genlokus, der mit der AMD assoziiert ist, warf die Fragen auf welches und wie sind die Gene, die der Genlokus umfasst, mit der AMD verknüpft. Der Genlokus umfasst das ARMS2 und den Promotorbereich des HTRA1. Für die Untersuchung des ARMS2 auf Proteinebene war die Herstellung und Charakterisierung eines Antikörpers, als Werkzeug der Proteinbiochemie, nötig. Durch den Nachweis des ARMS2 Proteins wird gezeigt, dass das ARMS2 ein proteinkodierendes Gen ist. Zudem wird gezeigt, dass die ARMS2_{indel} Variante aufgrund ihres fehlenden Polyadenylierungssignals und der Insertion von mRNA destabilisierenden Sequenzen nicht translatiert wird. Das Fehlen des ARMS2 bietet, durch den daraus resultierenden Funktionsverlust, eine Erklärung für das erhöhte Risiko an AMD zu erkranken. Die Assoziation des HTRA1 mit der AMD kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

5.1 Die Rolle des Retinoschisins bei der X-gebundenen juvenilen Retinoschisis

Die X-gebundene juvenile Retinoschisis (XRS) ist eine Netzhautdystrophie, die durch Mutationen im Retinoschisin Gen (*RS1*) zu charakteristische Aufspaltungen in den inneren Netzhautschichten und zu zystischen Veränderungen der zentralen Netzhaut führt. Ungefähr

die Hälfte der Patienten entwickeln auch periphere Manifestationen in der Netzhaut (George et al. 1995; Sauer et al. 1997). Die Mutationen im *RS1* sind größtenteils in der Sequenz lokalisiert, die für die Discoidin Domäne des RS1 kodiert (www.dmd.nl/rs/). Von der Discoidin Domäne ist bekannt, dass diese an bestimmte Komponenten der Plasmamembran bindet, wie z.B. Kollagene, Phospholipide und der Na/K ATPase, und eine Funktion bei der Zelladhäsion oder bei Entwicklungsprozessen hat (Baumgartner et al. 1998; Kiedzierska et al. 2007). Die extrazelluläre Lokalisation des RS1 an den Photorezeptoren und Bipolarzellen, sowie die zelluläre Disorganisation der Netzhaut bei phänotypischen Mutationen im *RS1* Gen, deuten auf eine Funktion in der Organisation und Adhäsion der Zellen hin (Weber et al. 2002). Bisher ist unklar wie das RS1 an der Plasmamembran bindet, welche Bindungspartner es hat und welche Funktion das RS1 ausübt.

In dieser Arbeit wird die Bindung des RS1 zu Phospholipiden, Kollagenen, Kohlenhydrate und der Na/K-ATPase untersucht, um mit Hilfe des Bindungspartners auf eine mögliche Funktion des RS1 zu schließen. Des Weiteren wird der Einfluss der oligomeren Struktur des RS1 bei der Bindung zur Plasmamembran und den potentiellen Bindungspartnern überprüft. Für die Arbeit stand mir die RS1-KO-Maus zur Verfügung, mit dessen Hilfe ich eine Methode entwickelt habe die Bindung von rekombinantem RS1 (rRS1) an homogenisiertem Gewebe der RS1-KO-Maus Netzhaut zu untersuchen. Die Bindung des rRS1 wurde charakterisiert, indem unterschiedliche RS1-Mutanten für die Bindung an die RS1-KO-Maus Netzhäute eingesetzt wurden und durch die Zugabe von Peptiden oder Kohlenhydraten, welche die Bindung des rRS1 zur RS1-KO-Maus Netzhaut blockierten. Die Bindung des rRS1 zu Phospholipiden und Kollagenen wurden durch ELISA überprüft, wohingegen die Bindung zur Na/K-ATPase mit Hilfe von Immunpräzipitationen untersucht wurde.

5.1.1 Die RS1-KO-Maus Netzhaut als Mittel zur Charakterisierung des RS1

Die RS1-*knock out*-Maus (RS1-KO-Maus) ist ein ideales Modell für die Charakterisierung des RS1, da es viele Parallelen zum menschlichen Krankheitsbild der XRS aufweist, wie z.B. die zystenähnlichen Strukturen in der inneren und peripheren Netzhaut und das charakteristische negative ERG (Weber et al. 2002). Die Degeneration der Netzhaut bei RS1-KO-Mäusen beginnt schon in den ersten Wochen nach der Geburt (Gehrig et al. 2006). Die Apoptose der Photorezeptoren in der RS1-KO-Maus ist schon bei 14 Tage alten Tieren zu detektieren und

erreicht seinen Höhepunkt bei ca. 18 Tage alten Tieren (Gehrig et al. 2006). Das Auge einer 14 Tage alten RS1-KO-Maus ist nahezu vollständig entwickelt und die zelluläre Struktur der Netzhaut ist noch intakt. Zu diesem Zeitpunkt entspricht die Netzhaut der RS1-KO-Maus nahezu einer gesunden Netzhaut, nur ohne das RS1 Protein. In der 14 Tage alten RS1-KO-Maus Netzhaut sind wahrscheinlich auch die Bindungspartner vom RS1 noch vorhanden und richtig lokalisiert. Das macht die Netzhaut einer 14 Tage alten RS1-KO-Maus zu einem idealen Modell, um die Bindung des RS1 an die Netzhaut zu untersuchen.

Die Zugabe von rekombinantem RS1 (rRS1) zu verschiedenen Geweben der RS1-KO-Maus zeigt, dass das rRS1 spezifisch an das Gewebe der Netzhaut bindet. Offensichtlich enthält die Netzhaut den Bindungspartner des RS1, wohingegen die Gewebe wie Herz, Lunge, Leber oder Niere diesen nicht enthalten. Durch die Bindung von rRS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus lässt sich nicht der Bindungspartner identifizieren, jedoch lässt sich mit dieser Methode die Bindung des RS1 zum Bindungspartner charakterisieren und damit Rückschlüsse auf die Funktion des RS1 und dessen Bindungspartner ziehen.

Über die Struktur-Funktionsbeziehung des RS1 ist bisher nur wenig bekannt. Das RS1 wird als homo-oktaeres Protein von den Photorezeptoren und Bipolarzellen sezerniert (Weber et al. 2002). *Missense*-Mutationen im RS1, insbesondere innerhalb der Discoidin Domäne, führen zu einer Missfaltung des Proteins und werden deshalb größtenteils nicht von den Zellen sezerniert (Wu & Molday 2003; Wang et al. 2006). Eine Sonderstellung scheinen die Cysteine C40, C59 und C223 im RS1 einzunehmen, durch die Disulfidbrückenbindungen für die oligomere Struktur ausgebildet werden (Wu et al. 2005). Die RS1-Mutanten C40S, C59S und C223S sind pathogen, sie werden jedoch trotzdem von den Zellen sezerniert (Wu & Molday 2003). Die Proteinstruktur dieser RS1 Cystein-Mutanten ist offensichtlich intakt, da sie an die Plasmamembran binden. Die RS1 Cystein-Mutanten binden unabhängig von der oligomeren Struktur an die Netzhäute. Dies deutet darauf hin, dass die oligomere Struktur des RS1 nicht für die Bindung an die Plasmamembarn wichtig ist, sondern für dessen Funktion.

Das RS1 Monomer besteht hauptsächlich aus der Discoidin Domäne. Die Discoidin Domäne ist aus anderen Proteinen für die Binding an Phospholipide, Kollagene, Integrine und Galactose bekannt, wie z.B. dem HMFG2 und den Blutgerinnungsfaktoren V und VIII (Kiedzierska et al. 2007; Aragao et al. 2008). Die Bindung zum jeweiligen Bindungspartner erfolgt über drei Peptid-Schlaufen, den sogenannten *Spikes*, die aus der globulären Struktur der Discoidin Domäne heraus ragen (Kiedzierska et al. 2007). Abhängig vom Bindungspartner sind die *Spikes* unterschiedlich an der Bindung beteiligt und ermöglichen dadurch Rückschlüsse auf den jeweiligen Bindungspartner des RS1 zu (Kiedzierska et al.

2007). Die Bindung an die Phospholipide, insbesondere an das Phosphatidylserin, erfolgt über die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren von allen drei Spikes (Fraternali et al. 2003). Für die Bindung an die Kollagene sind die *Spikes* 1 und 3 elementar (Leitinger 2003). An bestimmte Integrine bindet die Discoidin Domäne über die Aminosäuresequenz Arginin (R), Glycin (G) und Asparaginsäure (D), dieses RGD-Motif ist in *Spike* 3 lokalisiert (Andersen et al. 2000). Das RS1 enthält kein RGD-Motif, da es anstelle des Glycins ein Cystein im eigentlichen RGD-Motif enthält. Die Bindung an Galactose erfolgt über eine Spalte, die sich zwischen zwei Discoidin Domänen ausbildet. Die Bindung der Galactose wird vermutlich vom *Spike* 1 unterstützt (Aragao et al. 2008).

Welche *Spikes* für die Bindung des RS1 an die RS1-KO-Maus Netzhaut entscheidend sind, wurde durch die Kompetition mit Peptiden die analog der Sequenz der *Spikes* 1-3 sind überprüft. Der *Spike* 3 nimmt offensichtlich eine zentrale Rolle bei der Bindung des RS1 zur Netzhaut ein, da das Peptid 3 die Bindung vollständig blockiert. Aufgrund der Disulfidbrücke C110-C142 zwischen den *Spikes* 2 und 3 und der daraus entstehenden räumlichen Nähe scheint der *Spike* 2 ebenfalls an der Bindung des RS1 zur Netzhaut beteiligt zu sein, da es die Bindung teilweise blockiert.

Das Peptid analog des *Spike* 1 hat keinen Einfluss auf die Bindung des RS1 zur Netzhaut. Die Kombination der *Spikes* die an der Bindung des RS1 zu seinem Bindungspartner beteiligt sind entspricht keinem bisher bekannten Bindungspartner einer Discoidin Domäne und deutet auf einen bisher unbekannten Bindungspartner hin.

Das RS1 bindet unabhängig von seiner oligomeren Form an die RS1-KO-Maus Netzhaut. Da alle RS1 Monomere identisch sind, binden sie auch alle an den gleichen Bindungspartner. Die homo-oktamere Struktur des RS1 wirft folgende Fragen auf: Warum bindet ein RS1 an acht identische Bindungspartner und was ist der Bindungspartner?

5.1.2 Potentielle Bindungspartner des Retinoschisin

In der Literatur werden Phospholipide und verschiedene Proteine als Bindungspartner des RS1 beschrieben (Molday et al. 2007; Vijayasarathy et al. 2007). Bislang sind diese Bindungspartner jedoch noch nicht von anderen Gruppen bestätigt worden. In dieser Arbeit wird die Bindung des RS1 zu Phospholipiden, Kollagenen, Sacchariden und im Besonderen der Na/K-ATPase überprüft. Die Phospholipide, Saccharide und die Na/K-ATPase werden in der Literatur als Bindungspartner des RS1 beschrieben, wohingegen die Kollagene als Bindungspartner anderer Discoidin Domäne enthaltenden Proteine bekannt sind (Leitinger 2003; Molday et al. 2007; Vijayasarathy et al. 2007; Dyka et al. 2008).

5.1.2.1 Phospholipide als Bindungspartner des Retinoschisins

Die Bindung der Discoidin Domäne an Phospholipide ist vom HMFG8 sowie den Blutgerinnungsfaktoren V und VIII bekannt. Sie binden jeweils an das Phosphatidylserin (PS) (Macedo-Ribeiro et al. 1999; Pratt et al. 1999; Andersen et al. 2000). Für das RS1 wurden anionische Phospholipide, als Bindungspartner in einem computergeneriertem (*in silico*) Model vorgeschlagen (Frernali et al. 2003). Die Grundlage für das *in silico* Model vom RS1 war die Struktur des Blutgerinnungsfaktors V, das eine Sequenzhomologie von 37,7 % zum RS1 besitzt (Frernali et al. 2003). Darauf aufbauend exprimierten Vijayasarathy und Mitarbeiter die Discoidin Domäne des RS1 als GST-Fusionsprotein und untersuchten dessen Bindung zu Phospholipiden, die auf einer Cellulose-Membran fixiert waren (Vijayasarathy et al. 2007). Vijayasarathy beschreibt eine starke Affinität der Discoidin Domäne des RS1 GST-Fusionsprotein zu anionischen Phospholipiden wie Phosphatidylinositol-phosphaten, Phosphatidylinositol-di-phosphaten und Phosphatidylserin. Diese Ergebnisse stehen zur Diskussion, da die Bindung des RS1 durch immobilisiertes PS mittels ELISA oder aus Netzhäuten hergestellten Liposomen nicht reproduziert werden konnte (Molday et al. 2007). Diese widersprüchlichen Ergebnisse wurden in dieser Arbeit, zum einen durch immobilisierte Phospholipide und zum anderen durch artifizielle Phospholipidvesikel überprüft. Weder die immobilisierten Phospholipide noch die artifiziellen Phospholipidvesikel zeigen eine Affinität des RS1 zu anionischen Phospholipiden. Im Gegensatz zu Vijayasarathy und Mitarbeitern wurde die Bindung zu Phospholipiden nicht mit einem in *E. coli* exprimierten Discoidin Domäne GST-Fusionsprotein untersucht, sondern mit dem in eukaryotischen Zellen

exprimiertem RS1 Protein. Die von Vijayasarathy beschriebene Affinität des RS1 zu anionischen Phospholipiden ist wahrscheinlich ein Artefakt und durch eine fehlerhafte Faltung des GST-Fusionsproteins zu erklären. Das RS1 enthält mehrere Disulfid-Brückenbindungen, die bei einer Expression in *E. coli* nicht oder nur willkürlich geknüpft werden (Sevier & Kaiser 2002).

Gegen eine Bindung des RS1 an PS spricht auch die spezifische Bindung des rRS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus. Da das PS ein Bestanteil fast aller Plasmamembranen ist (Pomorski et al. 2001), hätte das rRS1 auch an alle anderen Gewebe der RS1-KO-Maus binden müssen. Die Bindung des RS1 an Phospholipide konnte durch drei unabhängige Methoden nicht bestätigt werden, dementsprechend wird eine spezifische Bindung zu PS und anderen Phospholipiden ausgeschlossen.

5.1.2.2 Kollagene als Bindungspartner des Retinoschisins

Die Discoidin Domäne Rezeptoren 1 und 2 (DDR1, DDR2) sind Zelloberflächenrezeptor Tyrosin Kinasen, die spezifisch mit ihrer Discoidin Domäne an die fibrillenartigen Kollagene I, II und III binden und Funktionen der Signaltransduktion sowie der Zell-Adhäsion übernehmen (Curat et al. 2001; Leitinger et al. 2004). Das RS1 ist ebenfalls extrazellulär an der Zelloberfläche lokalisiert und das Krankheitsbild der XRS zeigt einen Verlust der Zellorganisation durch verminderte Zell-Adhäsion (George et al. 1996; Weber et al. 2002). Aktuell sind 28 Kollagentypen bekannt, die sich in ihrer Struktur und Sequenz unterscheiden (Myllyharju & Kivirikko 2004; Veit et al. 2006). Die Bindung des RS1 wurde mittels ELISA für die Kollagene I bis V überprüft. Die Kollagene I bis V sind die wahrscheinlichsten Bindungspartner für das RS1, wenn das RS1 auf ähnliche Weise wie das DDR1 oder DDR2 an Kollagene bindet. Diese Kollagene sind die bisher einzigen bekannten Kollagene die lange fibrilläre oder netzartige molekulare Strukturen ausbilden (Prockop & Kivirikko 1995). Die Kollagene I bis V werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert, was im Widerspruch zur gewebespezifischen Bindung des RS1 steht. In meiner Arbeit wird keine Affinität des RS1 zu den Kollagenen I bis V festgestellt und dementsprechend bindet das RS1 nicht wie das DDR1 oder DDR2 an die Kollagene. Deshalb werden diese Kollagene als Bindungspartner für das RS1 ausgeschlossen.

5.1.2.3 Saccharide als Bindungspartner des Retinoschisins

Die Discoidin Domäne wurde ursprünglich im Discoidin I und II (Disc I, Disc II) des Schleimpilzes *Dictyostelium discoideum* identifiziert (Cooper et al. 1983). Disc I und II binden an Saccharidderivate mit Galactosekonformation, wie N-Acetyl-D-Galactosamin (GalNAc) oder Methyl- β -Galactosid (β MeGal) (Aragao et al. 2008). Seit kurzem ist bekannt, dass die oktamere und dimere Form des RS1 spezifisch an Galactose, nicht jedoch an GalNAc oder β MeGal, binden (Dyka et al. 2008). Abgesehen von ihrer Bindung zu Galactose haben RS1 und Disc II weitere Gemeinsamkeiten, wie eine oligomere Struktur und die *Spikes* der Discoidin Domäne mit der sie an die Bindungspartner binden. Das Disc II ist ein homotrimeres Protein, dass das Saccharid-Derivate in einer Spalte zwischen zwei Monomeren mit Hilfe der *Spikes* 2 und 3 seiner Discoidin Domäne bindet (Aragao et al. 2008). Das RS1 ist ein Homooktamer, das ebenfalls nur in seiner oligomeren Form an immobilisierte Galactose bindet (Dyka et al. 2008). Die Affinität des monomeren RS1 zur Galactose ist vermutlich geringer, als die des oligomeren RS1, da nur bei einem Oligomer eine Spalte ähnlich wie beim Disc II gebildet werden kann. Deshalb bindet das monomere RS1 nicht an die immobilisierte Galactose. Die Bedeutung der *Spikes* 2 und 3 für die Bindung an den Bindungspartner wird durch das Blockieren der Bindung des RS1 an die Netzhaut der RS1-KO-Maus mit den entsprechenden Peptiden gezeigt.

Das RS1 bindet unabhängig von seiner oligomeren Form an die Netzhaut der RS1-KO-Maus. Durch die Gegenwart der Galactose wird die Bindung des oktameren, dimeren und monomeren RS1 zur RS1-KO-Maus Netzhaut inhibiert. Dies deutet auf eine Bindung der Galactose in einem Bereich des RS1, welcher für die Bindung zur Netzhaut entscheidend ist. Die spezifische Bindung des RS1 zur Netzhaut kann nicht alleine durch die Galactose erklärt werden, da sie extrazellulär als Monosaccharid und als ubiquitärer Bestandteil der Glykosylierung von Proteinen vorkommt (Gandhi & Mancera 2008). Eine Bindung an das Monosaccharid ist für das membrangebundene RS1 unwahrscheinlich. In Kombination mit einem Protein, bei dem die Galactose Bestandteil der Glykosylierung ist, könnte die Galactose eine notwendige Bedingung für die Bindung des RS1 darstellen.

5.1.2.4 Die Na/K ATPase als Bindungspartner des Retinoschisins

Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Bindungspartnern des RS1, sind die $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K-ATPase als Bindungspartner der Discoidin Domäne erst seit kurzem bekannt. Molday und Mitarbeiter (2008) identifizierten die Na/K ATPase als Bindungspartner des RS1 mittels der Immunpräzipitation von Wildtyp Maus Netzhautproben und zeigten auch die Kolokalisation des RS1 mit der Na/K ATPase $\alpha 3$ Untereinheiten in der Netzhaut. An welche der beiden Na/K ATPase Untereinheiten das RS1 bindet, konnte nicht bestimmt werden. Aufgrund der wesentlich größeren extrazellulären Domäne der $\beta 2$ -Untereinheit wird vermutet, dass diese der entscheidende Bindungspartner ist.

Die Bindung des RS1 zur Na/K ATPase wird durch die Immunpräzipitation mit rekombinantem RS1 und RS1-KO-Maus Netzhaut bestätigt. Durch die Bindung der extrazellulären Domäne der $\beta 2$ -Untereinheit an das RS1 wird die Hypothese gestärkt, dass diese Untereinheit der essentielle Bindungspartner ist. Die vollständige Glykosylierung und die Membranständigkeit der $\beta 2$ -Untereinheit spielt offensichtlich keine Rolle für die Bindung, da die extrazelluläre Domäne trotz verminderter Glykosylierung und fehlender Transmembrandomäne an das RS1 bindet. Unerwartet ist, dass das rRS1 nicht an die rekombinant exprimierten $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K ATPase in HEK-293 EBNA Zellen bindet. Es wurde gezeigt, dass die rekombinannten $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K ATPase in der Plasmamembran der HEK 293 EBNA Zellen lokalisiert und auch glykoliert sind. Offensichtlich wird die Bindung des rRS1 zu den $\alpha 3/\beta 2$ Untereinheiten der Na/K ATPase blockiert, wenn die Untereinheiten rekombinant in Zellen exprimiert werden, in denen sie normalerweise nicht vorhanden sind. Es ist bekannt, dass die Na/K ATPase in der Plasmamembran in einem Multi-Enzym-Komplex (MEK) integriert ist (Zhang et al. 2008). Dieser MEK setzt sich aus zelltypspezifischen Proteinen wie z.B. Caveolin, EGFR, PLC, PI3K oder Src zusammen (Schoner & Scheiner-Bobis 2007; Zhang et al. 2008). Diese MEK sind in Caveolae oder *lipid rafts* lokalisiert (Vagin et al. 2005; Welker et al. 2007). Caveolae sind Einstülpungen der Membran durch Caveolin Proteine und haben ähnlich wie die *lipid rafts* eine detergenzresistente Lipidzusammensetzung (Simons & Ikonen 1997). Die *lipid rafts* sind kleine Domänen in der Membran, die sich durch eine höhere Konzentration an Glykolipiden, Sphingolipiden und Cholesterol abgrenzen (Simons & Vaz 2004). Durch ihre Lipid-Zusammensetzung können die Caveolae und *lipid rafts* den Transport von Proteinen in bzw. auf der Membran beeinflussen und die Interaktion von Membranproteinen sowie dessen Signalwege regulieren (Simons & Ikonen 1997). Aufgrund der Vielzahl an Bindungspartnern

ist es wahrcheinlich, dass die rekombinant exprimierte Na/K ATPase in den HEK-293 EBNA Zellen nicht an das rRS1 bindet, weil die potentiellen Bindestellen der Na/K ATPase durch andere Proteine aus dem MEK verdeckt wird.

Das RS1 bindet direkt und ohne unterstützende Faktoren wie z.B. Proteine oder die Plasmamembran an die extrazelluläre Domäne der $\beta 2$ -Untereinheit der Na/K ATPase. Wenn die Na/K ATPase jedoch in die Plasmamembran integriert ist, bindet das RS1 offensichtlich nur an die Na/K ATPase, wenn diese in dem für die Netzhaut spezifischen MEK integriert ist und nicht im MEK aus einem anderen Gewebe.

Das Besondere an der Bindung des RS1 zur Na/K ATPase ist, dass die Spezifität der Bindung nicht alleine auf die gewebespezifischen Expression beider Bindungspartner beruht, sondern scheinbar noch durch andere gewebespezifische Faktoren in der Plasmamembran beeinflusst wird. Dieser hohe Grad an Spezifität, der durch die gewebespezifische Expression des RS1 und der Na/K ATPase und dem Einfluss anderer gewebespezifischer Faktoren unterliegt, deutet auf eine exklusive Funktion des RS1 in der Netzhaut hin.

Das RS1 ist wahrscheinlich ein symmetrisch homo-oktaeres Protein aus identischen Monomeren (Wu et al. 2005). Somit binden alle Monomere auch an identische Bindungspartner bzw. an das identische Bindungsmotiv. Die oktaeres Struktur des RS1 ist für die Bindung der Na/K ATPase nicht notwendig, da schon das RS1 Monomer an sie bindet. Ein sich mehrfach wiederholendes Bindemotiv ist in der Na/K ATPase nicht bekannt. Somit liegt es nahe, dass jeweils ein RS1 Monomer an eine Na/K ATPase bindet. Im Fall des oktaeren RS1 bedeutet es, dass das RS1 an acht Na/K ATPasen bindet. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Na/K ATPase in der Plasmamembran nicht nur als Protomer ($\alpha\beta$), sondern auch als Di- und Tetraprotomer ($(\alpha\beta)_2$, $(\alpha\beta)_4$) vorliegt (Kobayashi et al. 2007; Mimura et al. 2008). Aufgrund der intermolekularen Disulfidbrücken des RS1 könnten zwei unterschiedliche Strukturen ausgebildet werden (Wu et al. 2005). Zum einen kann das RS1 eine ringförmige Struktur ausbilden, zum anderen eine säulenförmige Struktur aus zwei sich gegenüber liegenden Tetrameren (Abb.34).

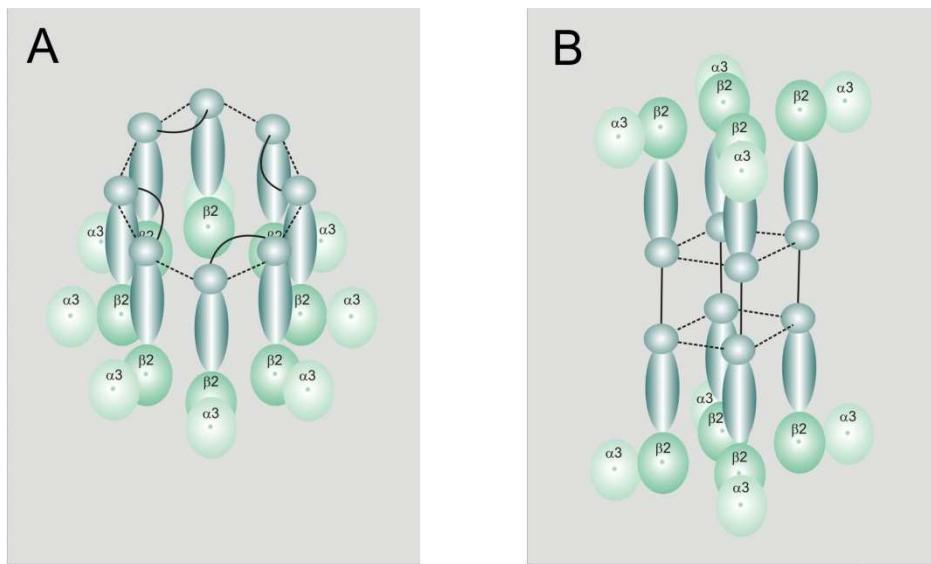


Abb.34: Zwei Strukturmodelle des RS1 mit den ATPase α 3/ β 2-Untereinheiten. A) Ringförmiges Model des RS1 über die C59-C223 Disulfidbrücken. **B)** Säulenförmiges Model des RS1 durch die Verbindung zweier Tetramere über die C40-C40 Disulfidbrücken. Das RS1 ist in Blau, die α 3-Untereinheit in hell grün und die β 2-Untereinheit ist in dunkelgrün dargestellt. Die gestrichelte Linie stellt die C59-C223 Disulfidbrücke und die durchgezogene Linie die C40-C40 Disulfidbrücke des RS1 dar. Die Abbildung ist modifiziert nach Molday 2005.

Beide Strukturmodelle des RS1 sind mit der oligomeren Form der Na/K ATPase vereinbar. Das ringförmige Model würde an die protomere oder diprotomere Na/K ATPase binden, weil sie die Bewegungsfreiheit der einzelnen RS1 Monomeren nicht so einschränken wie die tetraprotomere Form es tun würde. Ein Tetraprotomer der Na/K ATPase entspricht dem säulenförmigen Modell des RS1, dabei würde jeweils ein Tetraprotomer auf einer Seite des RS1 binden. Welches dieser Modelle eher der Wirklichkeit entspricht, ist bisher nicht abzuschätzen.

5.1.3 Potentielle Funktionen des Retinoschisins für die Na/K ATPase

Die Identifizierung der Na/K ATPase als Bindungspartner und das bessere Verständnis der Struktur-Funktions Beziehung des RS1 eröffnen viele neue Fragestellungen für die Funktion der Netzhaut und damit auch für den Pathomechanismus der XRS. Basierend auf dem Phänotyp der RS1-KO-Maus wurde die Funktion des RS1 bisher als Gerüstprotein oder Adhäsionsprotein zur Verbindung von Zellen beschrieben, weil in Abwesenheit des RS1 die

Photorezeptorzellen degenerieren und ein Verlust der Zellorganisation eintritt (Weber et al. 2002; Wu et al. 2005).

Durch die Erkenntnis, dass die Na/K ATPase ein Bindungspartner des RS1 ist, muss man die Funktion des RS1 neu überdenken. Es existiert eine Na/K ATPase $\beta 2$ Untereinheit KO-Maus die einen ähnlichen Phänotypen in der Netzhaut entwickelt wie die RS1-KO-Maus (Magyar et al. 1994; Weber et al. 2002). Beide KO-Mäuse zeigen eine Degeneration der Photorezeptoren und eine Verminderung der Zelladhäsion in der Netzhaut. Der Phänotyp der RS1-KO-Maus ist auf die Netzhaut begrenzt, wohingegen der Phänotyp der Na/K ATPase $\beta 2$ Untereinheit KO-Maus ubiquitär ist. Aufgrund der essentiellen Funktion der Na/K ATPase als Regulator des Membranpotentials gehören zum Phänotyp der Na/K ATPase $\beta 2$ Untereinheit KO-Maus Defekte wie z.B. motorische Inkoordination, Degeneration der Astrozyten und Bildung von Vakuolen im Gehirn (Magyar et al. 1994). Diese Defekte führen in der Regel zum Tod der Tiere nach 17-18 Tagen (Magyar et al. 1994). Warum führt der Verlust eines vermeindlichen Strukturproteins, das an die Na/K ATPase bindet, zu einem ähnlichen Phänotyp in der Netzhaut wie der Verlust der Na/K ATPase selbst? Die Na/K ATPase benötigt für ihre Funktion in den anderen Geweben kein Discoidin Domäne enthaltendes Protein, zumindest ist bisher keines bekannt. Das Besondere am RS1 ist zum einen seine exklusive Expression in der Netzhaut und zum anderen seine homo-oktamere Struktur, die eine Bindung an vermutlich bis zu acht Bindungspartner ermöglicht. Das deutet zum einen auf eine gewebespezifische Funktion des RS1 und zum anderen auf eine lokale Konzentrierung des Bindungspartners hin. Von der Na/K ATPase ist bekannt, dass sie das Membranpotential und diverse Signalwege auf zweierlei Arten reguliert, zum einen durch die direkte Interaktion mit anderen Proteinen und zum anderen durch die Konzentration der Na/K Ionen (Xie & Askari 2002; Orlov & Hamet 2006; Zhang et al. 2008). Für das RS1 sind folgende Funktionen in Bezug auf die Na/K ATPase denkbar:

- 1) Es dient als Gerüstprotein, das die Position der Na/K ATPase in der Plasmamembran fixiert und die Bildung von Multi-Enzym-Komplexen unterstützt. Als Gegenargument für diese Hypothese steht, dass die Na/K ATPase in keinem andern Gewebe ein solches Helferprotein hat, sondern sich wahrscheinlich durch die Verknüpfung seiner Glycanketten und mit den Glycanketten benachbarter Na/K ATPasen in der Plasmamembran ausrichtet (Vagin et al. 2007).
- 2) Es dient als Vermittlerprotein zwischen den Na/K ATPasen, indem es an bis zu acht Na/K ATPasen bindet und die Aktivität bzw. die Konformationsänderung einer

Na/K ATPase den anderen Na/K ATPasen mitteilt. Es ist bekannt, dass der Blutgerinnungsfaktor VIII durch die Bindung an Phosphatidylserin eine Konformationsänderung durchführt (Purohit et al. 2003). Eine Konformationsänderung des RS1 durch die Bindung an den Bindungspartner oder eine Konformationsänderung induziert durch einen Bindungspartner ist ebenso denkbar. Das Pumpen der Ionen erfordert mehrere Konformationsänderungen von der Na/K ATPase (Scheiner-Bobis 2002; Morth et al. 2007). Diese Konformationsänderungen der Na/K-ATPase könnten Konformationsänderungen bei einer Untereinheit des RS1 bewirken. Da die Untereinheiten des RS1 über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, könnte diese Konformationsänderung auf die anderen Untereinheiten des RS1 übertragen werden und diese übertragen die Konformationsänderung jeweils weiter auf die anderen gebundenen Na/K ATPasen. Der Vorteil einer solchen Verbindung der Na/K ATPasen über das RS1 wäre eine direkte Kommunikation zwischen den Na/K ATPasen oder eine Synchronisation der Na/K ATPase Aktivitäten. Die Synchronisation der Na/K ATPase Aktivitäten erhöht die Pumprate und beschleunigt die Wiederherstellung des Membranpotentials (Chen & Dando 2008). In einem so aktivem Gewebe wie der Netzhaut erscheint eine Maximierung der Na/K ATPase Aktivität sinnvoll, weil die Zellen in der Netzhaut sehr häufig und schnell ihr Membranpotential verändern müssen, um die Lichtreize weiter an das Gehirn zu leiten. Eine Synchronisation der Na/K ATPasen bedeutet nicht zwangsläufig nur eine Regulation der Pumpleistung, sondern auch eine Verstärkung von Signalen durch die mehrfache Aktivierung eines Signalwegs.

Für die zukünftige Charakterisierung der Bindung des RS1 an die Na/K ATPase wäre die Klärung, welches der beiden RS1-Strukturmodelle (Abb. 32) der Realität entspricht sehr hilfreich, da die Struktur weitere Schlüsse auf die Funktion des RS1 zuließen. Das Ringmodell des RS1 steht für eine einseitige Konzentrierung der Na/K ATPase an der Zelloberfläche, wohingegen das Säulenmodell als Verbindung zwischen zwei Zellen die Zell-Zell Adhäsion stärken und auch zur Signaltransduktion zwischen den Zellen dienen könnte. Zudem wäre es ein weiterer Schritt zu einem besseren Verständnis der molekularen Abläufe innerhalb und zwischen den Zellen der Netzhaut.

5.2 Die Assoziation des ARMS2 mit der AMD

Die altersabhängige Makuladegeneration (AMD) ist eine Erkrankung des Auges bei Menschen ab dem 50. Lebensjahr mit einer multifaktoriellen Ätiologie (Hawkins et al. 1999). Die AMD ist eine komplexe genetische Erkrankung mit vielen beteiligten Genen, deren Effekte auf die Krankheit unterschiedlich stark ausgeprägt sind (Edwards & Malek 2007). Zusätzlich zu den genetischen Faktoren spielen Umweltfaktoren wie z.B. das Alter, Rauchen und Gewicht eine wichtige Rolle bei der Pathogenese (Group. 2000). Als dritthäufigste Ursache für Blindheit (Resnikoff et al. 2004) und aufgrund der demographischen Entwicklung, einhergehend mit den gesteigerten Lebenserwartungen, rückt die AMD immer weiter in den Fokus der Forschung und der Öffentlichkeit.

Im Jahr 2005 wurde durch eine Meta-Analyse von Kopplungsdaten ein AMD-Suszeptibilitätslocus beschrieben, der für die Chromosomenregion 10q23.33-10qter eine genomweite Signifikanz aufzeigte (Fisher et al. 2005). Mittels einer SNP-Feinkartierung wurde das Kopplungssignal auf eine kleine Region eingegrenzt, welche die zwei Gene *ARMS2* und *HTRA1* enthält. Aufgrund des starken Kopplungssignals in dieser Region kann nicht weiter zwischen diesen beiden Genloci unterschieden werden (Jakobsdottir et al. 2005). Die Entscheidung, welches Gen oder ob beide Gene mit der AMD assoziiert sind, kann nur experimentell gelöst werden. Demzufolge ist eine Analyse der Proteine von *ARMS2* und *HTRA1* für ein besseres Verständnis der Pathogenese von AMD unumgänglich.

In meiner Dissertation habe ich das ARMS2 Protein bzw. eine besondere Variante des ARMS2 (ARMS2_indel) in humanem Gewebe nachgewiesen. Dadurch wird gezeigt, dass das *ARMS2* ein proteinkodierendes Gen ist und die fehlende Expression der ARMS2_indel Variante lässt auf einen Funktionsverlust schließen, der zu einem erhöhten Risiko führt an AMD zu erkranken.

Hierzu wurde ein Reinigungsprotokoll entwickelt, um rekombinantes ARMS2 (rARMS2) zu isolieren. Das rARMS2 wurde für die Gewinnung von spezifischen Antikörpern aus Kaninchen benutzt. Diese α ARMS2 Antikörper wurden gereinigt, charakterisiert und anschließend dafür eingesetzt, endogenes ARMS2 in humanem Gewebe zu detektieren. Des Weiteren wurde das ARMS2 und die ARMS2_indel Variante in humanen Plazenten charakterisiert (Fritzsche et al. 2008).

5.2.1 Expression und Reinigung von rekombinantem ARMS2

Das rARMS2-His wurde unter denaturierenden Bedingungen gereinigt, um die für His-*tag* Fusionsproteine typischen Einschlusskörperchen in Lösung zu bringen (Burgess 2009). Die Reinigung durch einen Imidazol Stufengradienten ermöglichte einen Reinheitsgrad von ca. 80 % und sorgte für eine konzentrierte Elution des Proteins. Für weiterführende Arbeiten, wie z.B. strukturaufklärende Methoden (NMR-Spektroskopie, Protein-Kristallographie) müsste der Reinheitsgrad durch z.B. eine anschließende Größenausschluss Chromatographie gesteigert werden.

Die denaturierende Reinigung des rARMS2-His in Gegenwart von Harnstoff machte eine anschließende Renaturierung erforderlich. Ein Austausch des Puffers zu physiologischen Bedingungen führte, unabhängig von der Geschwindigkeit des Puffer-Wechsels, zur Präzipitation des rARMS2-His. Die Präzipitation des rARMS2-His kann zwei Ursachen haben:

1) Das Protein ist nicht korrekt gefaltet und die hydrophoben Domänen des Proteins verursachen eine Aggregatbildung (McCarney et al. 2005; Doglia et al. 2008). Die Bildung solcher Aggregate wurde zwar durch Detergenzien wie z.B. Tween-80 minimiert, jedoch war das rARMS2-His auch ohne Detergenz bis zu einer Harnstoff-Konzentration von ca. 60 mM löslich. Bei dieser geringen Konzentration sollte der Harnstoff keinen Einfluss mehr auf die Proteinfaltung haben (Chrunk & Matthews 1990). Warum der vollständige Entzug des Harnstoffs zur Präzipitation des rARMS2-His führte, ist unklar.

Die Faltung und damit die Löslichkeit des rARMS2-His könnte durch die zusätzliche Fusion des rARMS2-His mit einem *maltose binding protein* (MBP) als *Tag* verbessert werden. Das MBP ist für seine gute Löslichkeit bekannt, da es vermutlich die Faltung des naszierenden Fusionsproteins unterstützt und so der Bildung von Aggregaten entgegen wirkt (Sahdev et al. 2008).

2) Das ARMS2 selbst ist offensichtlich nicht löslich, da es vermutlich ein membranassoziiertes Protein ist und an hydrophobe Flächen bindet (Kanda et al. 2007; Fritsche et al. 2008). Deshalb minimiert das ARMS2 vermutlich seine hydrophobe Oberfläche, indem es sich mit anderen ARMS2 Molekülen zusammen lagert und auf diese Weise unlösliche Aggregate bildet.

Die Lokalisation des ARMS2 in der Zelle ist unklar. Einerseits wurde das rekombinante ARMS2 an bzw. in der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Kanda et al. 2007;

Fritsche et al. 2008). Andererseits wird das ARMS2 auch im Zytosol von ARPE19 Zellen nachgewiesen (Wang et al. 2009). Für die weitere Charakterisierung des rekombinanten ARMS2 Proteins ist zu klären, inwiefern das ARMS2 überhaupt ein lösliches Protein ist.

5.2.2 Nachweis des endogenen ARMS2 mit dem α ARMS2 Antikörper

Der α ARMS2 Antikörper wurde aus einem Kaninchen gewonnen, das mit *E. coli* exprimiertem rARMS2-His immunisiert wurde. Die Reinigung des Antikörpers erfolgte gegen unspezifische *E. coli* Proteine, Hexa-Histidin Peptide und das rARMS2-His. Der gereinigte Antikörper detektierte im Western Blot mit transformierten *E. coli* Zellen hauptsächlich das rARMS-His und in geringem Maße zwei unspezifische *E. coli* Proteine. Eine Western Blot Analyse mit transient transfizierten HEK-293 EBNA Zellen detektierte nur das rARMS2-His_e. Offensichtlich ist die Reinheit und die Spezifität des α ARMS2 Antikörper ausreichend, um in eukaryotischen Zellen mit Hilfe eines Western Blots eine qualifizierte Aussage zu geben.

Die Immunpräzipitation des ARMS2 aus humanem Gewebe wurde mit einem glucosehaltigen Puffer durchgeführt, um die Mitochondrien in Lösung zu halten. Durch die anschließende Western Blot Analyse wurde das endogene ARMS2 Protein in der Plazenta und der Netzhaut nachgewiesen. Die Expression des ARMS2 Proteins ist konsistent mit dessen RNA Expression (Rivera et al. 2005). Diese Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass das ARMS2 ein proteinkodierendes Gen ist. Seit kurzem wurde die mRNA des ARMS2 auch in anderen Geweben bzw. Zellen detektiert wie z.B. im Blut, Hippokampus, Muskel, Lunge und Leber (Wang et al. 2010). Die Expression auf Proteinebene wurde jedoch nicht überprüft.

Vom rekombinantem ARMS2 ist bekannt, dass es in COS-1 Zellen mit den Mitochondrien und als endogenes Protein in ARPE19 Zellen im Zytosol kolokalisiert ist (Kanda et al. 2007; Wang et al. 2009). Die unterschiedlich gefundene Lokalisation des ARMS2, im Zytosol und bei den Mitochondrien, könnte zum einen auf die Expression in unterschiedlichen Zelllinien und zum anderen auf die endogene bzw. rekombinante Expression des ARMS2 zurückzuführen sein.

Bei der Immunpräzipitation wurde kein Detergenz eingesetzt, deshalb blieben die Membranen der Mitochondrien intakt. Damit das ARMS2 bei der Immunpräzipitation an die Antikörper bindet, muss es entweder löslich oder von der Oberfläche der Mitochondrien abgelöst worden sein. Denn die Präzipitation des ARMS2, als Transmembranprotein, würde die Präzipitation

ganzer Mitochondrien anhand eines sehr gering exprimierten Proteins bedeuten und das ist sehr unwahrscheinlich.

Der in dieser Arbeit hergestellte α ARMS2 Antikörper wurde, in der Gruppe von Professor Weber (Institut für Humangenetik, Universität Regensburg), auch für immunhistologische Fluoreszenzfärbungen der humanen Netzhaut eingesetzt (Fritzsche et al. 2008). Diese Färbungen zeigten eine Kolokalisation des ARMS2 mit den Mitochondrien der Photorezeptoren. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation aus Zelllysat, inklusive Mitochondrien und der immunhistologischen Fluoreszenzfärbungen unterstützen die These, das ARMS2 an der Oberfläche der Mitochondrien lokalisiert ist und lassen auf eine Funktion des ARMS2 in Zusammenhang mit den Mitochondrien vermuten. Diese Ergebnisse schließen eine zufällige zytosolische Kolokalisation des ARMS2 mit den Mitochondrien jedoch nicht aus.

5.2.3 Steigt ohne funktionsfähigen ARMS2 Protein das Risiko an AMD zu erkranken?

Es wurde gezeigt, dass das ARMS2 für ein Protein kodiert und dieses Protein in der Plazenta und der Netzhaut exprimiert wird. Die Identifizierung der ARMS2 Varianten legt nahe, dass Mutationen im ARMS2 seine Funktion beeinflussen, und auf diese Weise zu einem erhöhten Risiko führen, an AMD zu erkranken. Anhand der ARMS2_indel Variante wurde explizit gezeigt, dass es aufgrund des fehlenden Polyadenylierungssignals und der mRNA destabilisierenden Sequenzen nicht exprimiert wird, oder die Expression unter die Detektionsgrenze des Western Blots fällt (Fritzsche et al. 2008). Demzufolge kann das erhöhte Risiko an AMD zu erkranken, für die ARMS2_indel Variante durch das Fehlen des ARMS2 erklärt werden.

Die Annahme, dass ARMS2 durch Abwesenheit zu AMD führt, wirft Fragen auf. Denn es ist auch eine ARMS2 Variante (rs2736911, R38X) bekannt, die vermutlich zu einem vorzeitigen Stopp der Translation bei Aminosäure 38 führt und deren mRNA durch einen vorzeitigen Abbau mittels „*nonsense-mediated mRNA decay*“ ebenfalls nicht exprimiert wird (Chang et al. 2007; Fritzsche et al. 2008). Inwiefern das Fehlen des ARMS2 einmal zu einem erhöhtem Risiko führt an AMD zu erkranken und einmal nicht ist bisher unklar. Möglicherweise reichen die ersten 38 Aminosäuren der ARMS2 rs2736911 Variante aus, um ihre Funktion aufrecht zu erhalten. Denkbar sind auch andere Mechanismen, die zu einem vollständigen

Protein bzw. einer anderen Isoform führen wie z.B. durch eine Stopp-Codon-Durchlässigkeit oder einem alternativen Spleißen (Allikmets & Dean 2008; Fritzsche et al. 2008).

Bisher konnte nicht geklärt werden, ob ARMS2 oder HTRA1 das gesuchte AMD-Suszeptilitätsgen ist, oder wie die beiden Gene sich untereinander beeinflussen. Nach aktuellen Erkenntnissen ist das mRNA Expressionslevel in der Netzhaut von *ARMS2*, der *ARMS2_indel* Variante und *HTRA* konstant, unabhängig davon, ob jemand AMD hat oder nicht (Kanda et al. 2010). Andererseits wird auch diskutiert, dass mit der *ARMS2_indel* Variante gleichzeitig die Transkription von *HTRA1* hoch reguliert wird (Yang et al. 2010). Inwiefern das mRNA Expressionslevel von *ARMS2* oder *HTRA1* für die AMD eine Rolle spielen, muss erst noch geklärt werden.

Das Problem die Funktion des ARMS2 zu identifizieren liegt vermutlich daran, dass die Auswirkungen des Funktionsverlustes vom ARMS2 so gering sind, dass man sie nur schwer detektieren kann. Die Auswirkungen akkumulieren sich über Jahrzehnte und führen erst im hohen Alter zur AMD (Buch et al. 2005; Scholl et al. 2007; Wang et al. 2007).

Die Funktion des ARMS2 könnte mit den Mitochondrien assoziiert sein, da fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Netzhaut und COS-1 Zellen eine Kolokalisation des ARMS2 mit den Mitochondrien zeigen (Kanda et al. 2007; Fritzsche et al. 2008). Ein Zusammenhang zwischen Mitochondrien bzw. dem von ihnen erzeugten oxidativen Stress und AMD wird schon seit längeren diskutiert. Die Mitochondrien sind die Hauptquelle für Superoxidanionen in der Zelle. Diese Superoxidanionen generieren hochreaktive Radikale die mit Proteinen, DNA und Lipiden einer Zelle reagieren und die Zelle somit schädigen. Verschiedenen Studien zeigen in AMD Spender Augen einen erhöhten Anteil an oxydativ geschädigten Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden, sowie höhere Anteile von antioxidativen Enzymen (Frank et al. 1999; Crabb et al. 2002; Howes et al. 2004; Decanini et al. 2007). Welche Funktion das ARMS2 im Zusammenhang mit den Mitochondrien hat, lässt sich zu diesem Zeitpunkt noch nicht beantworten, jedoch eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit neue Wege und somit auch neue Ansatzpunkte für ein besseres Verständnis der Entwicklung von AMD.

I. Abkürzungsverzeichnis, Maßeinheiten und SI-Einheiten**I.I Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenosin
AS	Aminosäure
Abb.	Abbildung
AMD	Altersabhängige Makuladegeneration
ARMS2	<i>age-related maculopathy susceptibility 2</i>
APS	Amoniumpersulfat
BBS	N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid
BMC	Bis-mercaptoacetamid
bp	Basenpaar(e)
C	Cystidin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DDR2	Discoidin Domäne Rezeptor 2
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	2'-Desoxynucleotid-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
ERG	Elektroretinogramm
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EZM	Extrazelluläre Matrix
G	Guanosin
H ₂ O	Wasser
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinetansulfonsäure
HMFG8	Milchfett globulärer-EGF Faktor 8
HPLC	Hochdruck Flüssigkeits Chromatographie
HTRA1	<i>hightemperature requirement protein A1</i>
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilodalton
l	Liter
mA	Milliampere
MEK	Multi-Enzym-Komplex
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
N	Normal
p.A.	pro Analysis
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Pyrococcus furiosus
PLEKHA1	<i>pleckstrin homology domain containing, family A member 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	rekombinant

Rho	Rhodopsin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
XRS	X-gebundene juvenile Retinoschisis
RS1	Retinoschisis assoziiertes Gen (Alias: XLRS1); Retinoschisin
Rs1h	murines RS1 Ortholog
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
T	Thymidin
TA	Anlagerungstemperatur
Tab.	Tabelle
Taq	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCEP	(Tris(2-carboxyethylphosphin)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylamin
TIMP2	Gewebsinhibitor der Metalloproteasen-2
Tm	Schmelztemperatur
TTR	Transthyretin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit (unit); Uracil
UTR	nichttranslatierte Region
Vol	Volumen
v/v	Volumenanteil einer Flüssigkeit in einer Lösung (volume per volume)
X-Gal	5-Brom, 4-Chlor, 3-Indoxyl-D-Galactosid
z.B.	zum Beispiel

I.II Maße und Einheiten

%	Prozent
%ige Lösung	Gramm in 100 ml Lösung
°C	Grad Celsius
Å	Ångström 10^{-10} Meter
aa	Aminosäure(n)
AU	Absorptionseinheiten (Extinktion)
bp	Basenpaare
Da	Dalton
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
l	Liter
m	Meter
M	Molar
min	Minute
M_w	Molekulargewicht
OD	Optische Dichte
OD ₅₉₅	Optische Dichte bei der Wellenlänge 595 nm
sek	Sekunde
U	Unit (Einheit für Enzymaktivität)
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht

I.III SI-Vorsätze von dezimalen Vielfachen und Teilen

c	Centi, 10^{-2}
m	Milli, 10^{-3}
μ	Mikro, 10^{-6}
n	Nano, 10^{-9}
p	Pico, 10^{-12}
f	Femto, 10^{-15}

II. Liste der eingesetzten Primer

Name	Sequenz	Richtung
pET HMFG F	gagatatacatatgccgcgcggccctgctggcccg	F
pET HMFG R	gtgctcgagacagcccagcagctccaggcgc	R
hDDR1Rev	ctcgagcacaccgttgtgagtgcac	R
pET RS1newF	gtgctcgaggcacacttgctgacgcact	F
hDDR1_Rev2	ctcgagattcccaccgttgtgagtgcac	R
hDDR2_For	ggtaccaatgatcctgattctgattccagaatg	F
pET RS1newR	agatatacatatcttaccgaggatgaaggcga	R
hDDR2_Rev	ctcgagcactcgcccttgtgaag	R
hDDR2_For2	ggtaccgggatcaggagctatggac	F
DDR2int2	tgcctctccaccaccgaatg	F
DDR2int1	ggcttagatggcttgtgtct	F
LOC-GFP-R	tcgatctagacctgctgcagtgtggat	R
DDR2int3	tgtggctgtggaggagtt	F
RS1 D143A	acccaggggcgctgtgccatcgatgagtggat	F
hDDR2_Rev2	ctcgagccctcgcccttgtgaag	R
ATP1B2 F NotI F	agcggccgcatggcatccagaaagagaag	F
ATP1B2 R BamHI R	tggatcccgcggttttgtatgcggagttga	R
ATP1B2 F NdeI	gccgcggattcatatggcatccagaaagagaag	F
ATP1B2 R XhoI	ctcgagggttttgtatgcggagttga	R
ATP1a3 BsmI R	ctcaaggtaggcattctgaaaggcct	R
ATPB2 stop BamH1 R	cgcctaggatcctcaggtttgtatgcg	R
ATPA3 stop BamH1 R	gctcaggatcctcagtagtaggtttccctc	R
ATP1a3 BsmI F	aggcctccagaatgcctacccgt	F
ATP1B2 F cDNA	atggtcattccagaaagagaag	F
ATP1B2 R cDNA	tcaaggtttgtatgcggagtt	R
ATP1B2ex NheI F	gtaccagctgtagcatgcagactgtctccgac	F
ATP1B2ex XhoI R	gcgcctcgagcgggttttgtatgcggagttga	R

ATP1A3 F cDNA	atgggggacaagaagatgaca	F
ATP1A3 R BamHI R	tggatccgcgtagtaggttccttctcca	R
DDR2 Signal f	aagttggctagcatgatcctgattcccagaat	F
ATP1A3 R cDNA	tcaagttaggtttccttctcca	R
DDR2-TM-r	gctaactcgagggtgtgctgtcaatcaacttt	R
ATP1A3 F Not F	agcggccgcatggggacaagaagatgaca	F
ATP1A3 F NdeI	gccgcgggattcatatggggacaagaagatgaca	F
RS1c40s_for	ccaaaaagcatgcaagtccgattgccaaggagg	F
RS1c40s_rev	cctccttggcaatcggaatttcgtgcatttttg	R
RS1 C219S F	atggagctgctggagtcgcgtcagcaagtg	F
RS1 C219S R	cacttgcacggactccagcagctccat	R
DDR2 TM r	cttaaagttgatgacagcaacagctcgagcaa	R
DDR2 End r	ctcgctgccttgttgaaggaggcctcgagtatc	R

III. Literaturverzeichnis

- (1998). "Functional implications of the spectrum of mutations found in 234 cases with X-linked juvenile retinoschisis. The Retinoschisis Consortium." Hum Mol Genet 7(7): 1185-92.
- Alexander, S., L. M. Sydow, D. Wessels and D. R. Soll (1992). "Discoidin proteins of Dictyostelium are necessary for normal cytoskeletal organization and cellular morphology during aggregation." Differentiation 51(3): 149-61.
- Allikmets, R. and M. Dean (2008). "Bringing age-related macular degeneration into focus." Nat Genet 40(7): 820-1.
- Andersen, M. H., H. Graversen, S. N. Fedosov, T. E. Petersen and J. T. Rasmussen (2000). "Functional analyses of two cellular binding domains of bovine lactadherin." Biochemistry 39(20): 6200-6.
- Aragao, K. S., M. Satre, A. Imbert and A. Varrot (2008). "Structure determination of Discoidin II from Dictyostelium discoideum and carbohydrate binding properties of the lectin domain." Proteins 73(1): 43-52.
- Baumgartner, S., K. Hofmann, R. Chiquet-Ehrismann and P. Bucher (1998). "The discoidin domain family revisited: new members from prokaryotes and a homology-based fold prediction." Protein Sci 7(7): 1626-31.
- 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.
- Buch, H., N. V. Nielsen, T. Vinding, G. B. Jensen, J. U. Prause and M. la Cour (2005). "14-year incidence, progression, and visual morbidity of age-related maculopathy: the Copenhagen City Eye Study." Ophthalmology 112(5): 787-98.
- Burgess, R. R. (2009). "Refolding solubilized inclusion body proteins." Methods Enzymol 463: 259-82.
- Chang, Y. F., J. S. Imam and M. F. Wilkinson (2007). "The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway." Annu Rev Biochem 76: 51-74.
- Chen, H., Z. Yang, D. Gibbs, X. Yang, V. Hau, P. Zhao, X. Ma, J. Zeng, L. Luo, E. Pearson, R. Constantine, Y. Kaminoh, J. Harmon, Z. Tong, C. A. Stratton, D. J. Cameron, S. Tang and K. Zhang (2008). "Association of HTRA1 polymorphism and bilaterality in advanced age-related macular degeneration." Vision Res 48(5): 690-4.
- Chen, W. and R. Dando (2008). "Membrane potential hyperpolarization in Mammalian cardiac cells by synchronization modulation of Na/K pumps." J Membr Biol 221(3): 165-73.
- Chow, D. C. and J. G. Forte (1995). "Functional significance of the beta-subunit for heterodimeric P-type ATPases." J Exp Biol 198(Pt 1): 1-17.

- Chrunk, B. A. and C. R. Matthews (1990).** "Role of diffusion in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase from Escherichia coli." Biochemistry 29(8): 2149-54.
- Cingolani, C., B. Rogers, L. Lu, S. Kachi, J. Shen and P. A. Campochiaro (2006).** "Retinal degeneration from oxidative damage." Free Radic Biol Med 40(4): 660-9.
- Condon, G. P., S. Brownstein, N. S. Wang, J. A. Kearns and C. C. Ewing (1986).** "Congenital hereditary (juvenile X-linked) retinoschisis. Histopathologic and ultrastructural findings in three eyes." Arch Ophthalmol 104(4): 576-83.
- Congdon, N., B. O'Colmain, C. C. Klaver, R. Klein, B. Munoz, D. S. Friedman, J. Kempen, H. R. Taylor and P. Mitchell (2004).** "Causes and prevalence of visual impairment among adults in the United States." Arch Ophthalmol 122(4): 477-85.
- Conley, Y. P., J. Jakobsdottir, T. Mah, D. E. Weeks, R. Klein, L. Kuller, R. E. Ferrell and M. B. Gorin (2006).** "CFH, ELOVL4, PLEKHA1 and LOC387715 genes and susceptibility to age-related maculopathy: AREDS and CHS cohorts and meta-analyses." Hum Mol Genet 15(21): 3206-18.
- Cooper, D. N., S. C. Lee and S. H. Barondes (1983).** "Discoidin-binding polysaccharide from Dictyostelium discoideum." J Biol Chem 258(14): 8745-50.
- Crabb, J. W., M. Miyagi, X. Gu, K. Shadrach, K. A. West, H. Sakaguchi, M. Kamei, A. Hasan, L. Yan, M. E. Rayborn, R. G. Salomon and J. G. Hollyfield (2002).** "Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A 99(23): 14682-7.
- Curat, C. A., M. Eck, X. Dervillez and W. F. Vogel (2001).** "Mapping of epitopes in discoidin domain receptor 1 critical for collagen binding." J Biol Chem 276(49): 45952-8.
- Decanini, A., C. L. Nordgaard, X. Feng, D. A. Ferrington and T. W. Olsen (2007).** "Changes in select redox proteins of the retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol 143(4): 607-15.
- Dewan, A., M. Liu, S. Hartman, S. S. Zhang, D. T. Liu, C. Zhao, P. O. Tam, W. M. Chan, D. S. Lam, M. Snyder, C. Barnstable, C. P. Pang and J. Hoh (2006).** "HTRA1 promoter polymorphism in wet age-related macular degeneration." Science 314(5801): 989-92.
- Ding, X., M. Patel and C. C. Chan (2009).** "Molecular pathology of age-related macular degeneration." Prog Retin Eye Res 28(1): 1-18.
- Doglia, S. M., D. Ami, A. Natalello, P. Gatti-Lafranconi and M. Lotti (2008).** "Fourier transform infrared spectroscopy analysis of the conformational quality of recombinant proteins within inclusion bodies." Biotechnol J 3(2): 193-201.
- Dyka, F. M., W. W. Wu, T. A. Pfeifer, L. L. Molday, T. A. Grigliatti and R. S. Molday (2008).** "Characterization and purification of the discoidin domain-containing

- protein retinoschisin and its interaction with galactose." Biochemistry 47(35): 9098-106.
- Edwards, A. O. and G. Malek (2007). "Molecular genetics of AMD and current animal models." Angiogenesis 10(2): 119-32.
- Edwards, A. O., R. Ritter, 3rd, K. J. Abel, A. Manning, C. Panhuysen and L. A. Farrer (2005). "Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration." Science 308(5720): 421-4.
- Fernandez-Vizarra, E., M. J. Lopez-Perez and J. A. Enriquez (2002). "Isolation of biogenetically competent mitochondria from mammalian tissues and cultured cells." Methods 26(4): 292-7.
- Fisher, S. A., G. R. Abecasis, B. M. Yashar, S. Zareparsi, A. Swaroop, S. K. Iyengar, B. E. Klein, R. Klein, K. E. Lee, J. Majewski, D. W. Schultz, M. L. Klein, J. M. Seddon, S. L. Santangelo, D. E. Weeks, Y. P. Conley, T. S. Mah, S. Schmidt, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, M. B. Gorin, H. L. Schulz, F. Pardi, C. M. Lewis and B. H. Weber (2005). "Meta-analysis of genome scans of age-related macular degeneration." Hum Mol Genet 14(15): 2257-64.
- Francis, P. J., S. George, D. W. Schultz, B. Rosner, S. Hamon, J. Ott, R. G. Weleber, M. L. Klein and J. M. Seddon (2007). "The LOC387715 gene, smoking, body mass index, environmental associations with advanced age-related macular degeneration." Hum Hered 63(3-4): 212-8.
- Frank, R. N., R. H. Amin and J. E. Puklin (1999). "Antioxidant enzymes in the macular retinal pigment epithelium of eyes with neovascular age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol 127(6): 694-709.
- Fraternali, F., L. Cavallo and G. Musco (2003). "Effects of pathological mutations on the stability of a conserved amino acid triad in retinoschisin." FEBS Lett 544(1-3): 21-6.
- Fritzsche, L. G., T. Loenhardt, A. Janssen, S. A. Fisher, A. Rivera, C. N. Keilhauer and B. H. Weber (2008). "Age-related macular degeneration is associated with an unstable ARMS2 (LOC387715) mRNA." Nat Genet 40(7): 892-6.
- Gandhi, N. S. and R. L. Mancera (2008). "The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins." Chem Biol Drug Des 72(6): 455-82.
- Garneau, N. L., J. Wilusz and C. J. Wilusz (2007). "The highways and byways of mRNA decay." Nat Rev Mol Cell Biol 8(2): 113-26.
- Gehrig, A., A. Janssen, F. Horling, C. Grimm and B. H. Weber (2006). "The role of caspases in photoreceptor cell death of the retinoschisin-deficient mouse." Cytogenet Genome Res 115(1): 35-44.
- George, N. D., J. R. Yates and A. T. Moore (1995). "X linked retinoschisis." Br J Ophthalmol 79(7): 697-702.
- George, N. D., J. R. Yates and A. T. Moore (1996). "Clinical features in affected males with X-linked retinoschisis." Arch Ophthalmol 114(3): 274-80.

- Gilbert, G. E. and A. A. Arena (1995). "Phosphatidylethanolamine induces high affinity binding sites for factor VIII on membranes containing phosphatidyl-L-serine." J Biol Chem 270(31): 18500-5.
- Group., A.-R. E. D. S. R. (2000). "Risk factors associated with age-related macular degeneration. A case-control study in the age-related eye disease study: Age-Related Eye Disease Study Report Number 3." Ophthalmology 107(12): 2224-32.
- Hawkins, B. S., A. Bird, R. Klein and S. K. West (1999). "Epidemiology of age-related macular degeneration." Mol Vis 5: 26.
- Howes, K. A., Y. Liu, J. L. Dunajef, A. Milam, J. M. Frederick, A. Marks and W. Baehr (2004). "Receptor for advanced glycation end products and age-related macular degeneration." Invest Ophthalmol Vis Sci 45(10): 3713-20.
- Iannaccone, A., M. Mura, F. M. Dyka, M. L. Ciccarelli, B. M. Yashar, R. Ayyagari, M. M. Jablonski and R. S. Molday (2006). "An unusual X-linked retinoschisis phenotype and biochemical characterization of the W112C RS1 mutation." Vision Res 46(22): 3845-52.
- Ichikawa, O., M. Osawa, N. Nishida, N. Goshima, N. Nomura and I. Shimada (2007). "Structural basis of the collagen-binding mode of discoidin domain receptor 2." Embo J 26(18): 4168-76.
- Jager, R. D., W. F. Mieler and J. W. Miller (2008). "Age-related macular degeneration." N Engl J Med 358(24): 2606-17.
- Jakobsdottir, J., Y. P. Conley, D. E. Weeks, T. S. Mah, R. E. Ferrell and M. B. Gorin (2005). "Susceptibility genes for age-related maculopathy on chromosome 10q26." Am J Hum Genet 77(3): 389-407.
- Kanda, A., W. Chen, M. Othman, K. E. Branham, M. Brooks, R. Khanna, S. He, R. Lyons, G. R. Abecasis and A. Swaroop (2007). "A variant of mitochondrial protein LOC387715/ARMS2, not HTRA1, is strongly associated with age-related macular degeneration." Proc Natl Acad Sci U S A 104(41): 16227-32.
- Kanda, A., D. Stambolian, W. Chen, C. A. Curcio, G. R. Abecasis and A. Swaroop (2010). "Age-related macular degeneration-associated variants at chromosome 10q26 do not significantly alter ARMS2 and HTRA1 transcript levels in the human retina." Mol Vis 16: 1317-23.
- Kawano, K., K. Tanaka, F. Murakami and N. Ohba (1981). "Congenital hereditary retinoschisis: evolution at the initial stage." Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol 217(4): 315-23.
- Khabar, K. S. (2005). "The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease." J Interferon Cytokine Res 25(1): 1-10.
- Khan, N. W., J. A. Jamison, J. A. Kemp and P. A. Sieving (2001). "Analysis of photoreceptor function and inner retinal activity in juvenile X-linked retinoschisis." Vision Res 41(28): 3931-42.

- Kiedzierska, A., K. Smietana, H. Czepczynska and J. Otlewski (2007). "Structural similarities and functional diversity of eukaryotic discoidin-like domains." Biochim Biophys Acta 1774(9): 1069-78.
- Kirsch, L. S., S. Brownstein and D. de Wolff-Rouendaal (1996). "A histopathological, ultrastructural and immunohistochemical study of congenital hereditary retinoschisis." Can J Ophthalmol 31(6): 301-10.
- Klein, R., T. Peto, A. Bird and M. R. Vannewkirk (2004). "The epidemiology of age-related macular degeneration." Am J Ophthalmol 137(3): 486-95.
- Klein, R. J., C. Zeiss, E. Y. Chew, J. Y. Tsai, R. S. Sackler, C. Haynes, A. K. Henning, J. P. SanGiovanni, S. M. Mane, S. T. Mayne, M. B. Bracken, F. L. Ferris, J. Ott, C. Barnstable and J. Hoh (2005). "Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration." Science 308(5720): 385-9.
- Kobayashi, T., Y. Tahara, H. Takenaka, K. Mimura and Y. Hayashi (2007). "Na+- and K+-dependent oligomeric interconversion among alphabeta-protopomers, diprotomers and higher oligomers in solubilized Na+/K+-ATPase." J Biochem 142(2): 157-73.
- Kondo, N., S. Honda, K. Ishibashi, Y. Tsukahara and A. Negi (2007). "LOC387715/HTRA1 variants in polypoidal choroidal vasculopathy and age-related macular degeneration in a Japanese population." Am J Ophthalmol 144(4): 608-12.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-5.
- Leitinger, B. (2003). "Molecular analysis of collagen binding by the human discoidin domain receptors, DDR1 and DDR2. Identification of collagen binding sites in DDR2." J Biol Chem 278(19): 16761-9.
- Leitinger, B., A. Steplewski and A. Fertala (2004). "The D2 period of collagen II contains a specific binding site for the human discoidin domain receptor, DDR2." J Mol Biol 344(4): 993-1003.
- Macedo-Ribeiro, S., W. Bode, R. Huber, M. A. Quinn-Allen, S. W. Kim, T. L. Ortel, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik, M. T. Stubbs, W. H. Kane and P. Fuentes-Prior (1999). "Crystal structures of the membrane-binding C2 domain of human coagulation factor V." Nature 402(6760): 434-9.
- Magyar, J. P., U. Bartsch, Z. Q. Wang, N. Howells, A. Aguzzi, E. F. Wagner and M. Schachner (1994). "Degeneration of neural cells in the central nervous system of mice deficient in the gene for the adhesion molecule on Glia, the beta 2 subunit of murine Na,K-ATPase." J Cell Biol 127(3): 835-45.
- Mandel, M. and A. Higa (1970). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection." J Mol Biol 53(1): 159-62.
- Mandel, M. and A. Higa (1992). "Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970." Biotechnology 24: 198-201.

- McCarney, E. R., J. E. Kohn and K. W. Plaxco (2005). "Is there or isn't there? The case for (and against) residual structure in chemically denatured proteins." Crit Rev Biochem Mol Biol 40(4): 181-9.
- Mimura, K., Y. Tahara, N. Shinji, E. Tokuda, H. Takenaka and Y. Hayashi (2008). "Isolation of stable (alpha/beta)4-Tetraprotomer from Na⁺/K⁺-ATPase solubilized in the presence of short-chain fatty acids." Biochemistry 47(22): 6039-51.
- Molday, L. L., D. Hicks, C. G. Sauer, B. H. Weber and R. S. Molday (2001). "Expression of X-linked retinoschisis protein RS1 in photoreceptor and bipolar cells." Invest Ophthalmol Vis Sci 42(3): 816-25.
- Molday, L. L., W. W. Wu and R. S. Molday (2007). "Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex." J Biol Chem 282(45): 32792-801.
- Morth, J. P., B. P. Pedersen, M. S. Toustrup-Jensen, T. L. Sorensen, J. Petersen, J. P. Andersen, B. Vilsen and P. Nissen (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." Nature 450(7172): 1043-9.
- Myllyharju, J. and K. I. Kivirikko (2004). "Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms." Trends Genet 20(1): 33-43.
- Nagai, K. and H. C. Thogersen (1987). "Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in Escherichia coli." Methods Enzymol 153: 461-81.
- Orlov, S. N. and P. Hamet (2006). "Intracellular monovalent ions as second messengers." J Membr Biol 210(3): 161-72.
- Pascolini, D., S. P. Mariotti, G. P. Pokharel, R. Pararajasegaram, D. Etya'ale, A. D. Negrel and S. Resnikoff (2004). "2002 global update of available data on visual impairment: a compilation of population-based prevalence studies." Ophthalmic Epidemiol 11(2): 67-115.
- Pomorski, T., S. Hrafnssdottir, P. F. Devaux and G. van Meer (2001). "Lipid distribution and transport across cellular membranes." Semin Cell Dev Biol 12(2): 139-48.
- Poole, S., R. A. Firtel, E. Lamar and W. Rowekamp (1981). "Sequence and expression of the discoidin I gene family in Dictyostelium discoideum." J Mol Biol 153(2): 273-89.
- Pratt, K. P., B. W. Shen, K. Takeshima, E. W. Davie, K. Fujikawa and B. L. Stoddard (1999). "Structure of the C2 domain of human factor VIII at 1.5 Å resolution." Nature 402(6760): 439-42.
- Prockop, D. J. and K. I. Kivirikko (1995). "Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy." Annu Rev Biochem 64: 403-34.
- Purohit, V. S., K. Ramani, R. S. Kashi, M. J. Durrani, T. J. Kreiger and S. V. Balasubramanian (2003). "Topology of factor VIII bound to phosphatidylserine-containing model membranes." Biochim Biophys Acta 1617(1-2): 31-8.

- Resnikoff, S., D. Pascolini, D. Etya'ale, I. Kocur, R. Pararajasegaram, G. P. Pokharel and S. P. Mariotti (2004).** "Global data on visual impairment in the year 2002." Bull World Health Organ 82(11): 844-51.
- Rivera, A., S. A. Fisher, L. G. Fritzsche, C. N. Keilhauer, P. Lichtner, T. Meitinger and B. H. Weber (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.
- Rodriguez de Cordoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa and P. Sanchez-Corral (2004).** "The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations." Mol Immunol 41(4): 355-67.
- Sahdev, S., S. K. Khattar and K. S. Saini (2008).** "Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies." Mol Cell Biochem 307(1-2): 249-64.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977).** "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5463-7.
- Sauer, C. G., A. Gehrig, R. Warneke-Wittstock, A. Marquardt, C. C. Ewing, A. Gibson, B. Lorenz, B. Jurklies and B. H. Weber (1997).** "Positional cloning of the gene associated with X-linked juvenile retinoschisis." Nat Genet 17(2): 164-70.
- Scheiner-Bobis, G. (2002).** "The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport." Eur J Biochem 269(10): 2424-33.
- Scholl, H. P., M. Fleckenstein, P. Charbel Issa, C. Keilhauer, F. G. Holz and B. H. Weber (2007).** "An update on the genetics of age-related macular degeneration." Mol Vis 13: 196-205.
- Schoner, W. and G. Scheiner-Bobis (2007).** "Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth." Am J Physiol Cell Physiol 293(2): C509-36.
- Sevier, C. S. and C. A. Kaiser (2002).** "Formation and transfer of disulphide bonds in living cells." Nat Rev Mol Cell Biol 3(11): 836-47.
- Shi, L., K. Jian, M. L. Ko, D. Trump and G. Y. Ko (2009).** "Retinoschisin, a new binding partner for L-type voltage-gated calcium channels in the retina." J Biol Chem 284(6): 3966-75.
- Simons, K. and E. Ikonen (1997).** "Functional rafts in cell membranes." Nature 387(6633): 569-72.
- Simons, K. and W. L. Vaz (2004).** "Model systems, lipid rafts, and cell membranes." Annu Rev Biophys Biomol Struct 33: 269-95.

- Steiner-Champliaud, M. F., J. Sahel and D. Hicks (2006).** "Retinoschisin forms a multi-molecular complex with extracellular matrix and cytoplasmic proteins: interactions with beta2 laminin and alphaB-crystallin." Mol Vis 12: 892-901.
- Szoka, F., Jr. and D. Papahadjopoulos (1978).** "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation." Proc Natl Acad Sci U S A 75(9): 4194-8.
- Tantri, A., T. R. Vrabec, A. Cu-Unjieng, A. Frost, W. H. Annesley, Jr. and L. A. Donoso (2004).** "X-linked retinoschisis: a clinical and molecular genetic review." Sury Ophthalmol 49(2): 214-30.
- Towbin, H., T. Staehelin and J. Gordon (1979).** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.
- Vagin, O., S. Turdikulova and G. Sachs (2005).** "Recombinant addition of N-glycosylation sites to the basolateral Na,K-ATPase beta1 subunit results in its clustering in caveolae and apical sorting in HGT-1 cells." J Biol Chem 280(52): 43159-67.
- Vagin, O., S. Turdikulova and E. Tokhtaeva (2007).** "Polarized membrane distribution of potassium-dependent ion pumps in epithelial cells: different roles of the N-glycans of their beta subunits." Cell Biochem Biophys 47(3): 376-91.
- Veit, G., B. Kobbe, D. R. Keene, M. Paulsson, M. Koch and R. Wagener (2006).** "Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain." J Biol Chem 281(6): 3494-504.
- Vijayasarathy, C., Y. Takada, Y. Zeng, R. A. Bush and P. A. Sieving (2007).** "Retinoschisin is a peripheral membrane protein with affinity for anionic phospholipids and affected by divalent cations." Invest Ophthalmol Vis Sci 48(3): 991-1000.
- Vohra, R. S., J. E. Murphy, J. H. Walker, S. Homer-Vanniasinkam and S. Ponnambalam (2007).** "Functional refolding of a recombinant C-type lectin-like domain containing intramolecular disulfide bonds." Protein Expr Purif 52(2): 415-21.
- Wang, G., K. L. Spencer, B. L. Court, L. M. Olson, W. K. Scott, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (2009).** "Localization of age-related macular degeneration-associated ARMS2 in cytosol, not mitochondria." Invest Ophthalmol Vis Sci 50(7): 3084-90.
- Wang, G., K. L. Spencer, W. K. Scott, P. Whitehead, B. L. Court, J. Ayala-Haedo, P. Mayo, S. G. Schwartz, J. L. Kovach, P. Gallins, M. Polk, A. Agarwal, E. A. Postel, J. L. Haines and M. A. Pericak-Vance (2010).** "Analysis of the indel at the ARMS2 3'UTR in age-related macular degeneration." Hum Genet 127(5): 595-602.

- Wang, J. J., E. Rochtchina, A. J. Lee, E. M. Chia, W. Smith, R. G. Cumming and P. Mitchell (2007). "Ten-year incidence and progression of age-related maculopathy: the blue Mountains Eye Study." *Ophthalmology* 114(1): 92-8.**
- Wang, T., A. Zhou, C. T. Waters, E. O'Connor, R. J. Read and D. Trump (2006). "Molecular pathology of X linked retinoschisis: mutations interfere with retinoschisin secretion and oligomerisation." *Br J Ophthalmol* 90(1): 81-6.**
- Weber, B. H., H. Schrewe, L. L. Molday, A. Gehrig, K. L. White, M. W. Seeliger, G. B. Jaissle, C. Friedburg, E. Tamm and R. S. Molday (2002). "Inactivation of the murine X-linked juvenile retinoschisis gene, Rs1h, suggests a role of retinoschisin in retinal cell layer organization and synaptic structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6222-7.**
- Welker, P., B. Geist, J. H. Fruhauf, M. Salanova, D. A. Groneberg, E. Krause and S. Bachmann (2007). "Role of lipid rafts in membrane delivery of renal epithelial Na⁺-K⁺-ATPase, thick ascending limb." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292(3): R1328-37.**
- Wieacker, P., T. F. Wienker, B. Dallapiccola, K. Bender, K. E. Davies and H. H. Ropers (1983). "Linkage relationships between Retinoschisis, Xg, and a cloned DNA sequence from the distal short arm of the X chromosome." *Hum Genet* 64(2): 143-5.**
- Willis, M. S., J. K. Hogan, P. Prabhakar, X. Liu, K. Tsai, Y. Wei and T. Fox (2005). "Investigation of protein refolding using a fractional factorial screen: a study of reagent effects and interactions." *Protein Sci* 14(7): 1818-26.**
- Wu, W. W. and R. S. Molday (2003). "Defective discoidin domain structure, subunit assembly, and endoplasmic reticulum processing of retinoschisin are primary mechanisms responsible for X-linked retinoschisis." *J Biol Chem* 278(30): 28139-46.**
- Wu, W. W., J. P. Wong, J. Kast and R. S. Molday (2005). "RS1, a discoidin domain-containing retinal cell adhesion protein associated with X-linked retinoschisis, exists as a novel disulfide-linked octamer." *J Biol Chem* 280(11): 10721-30.**
- Xie, Z. and A. Askari (2002). "Na(+)/K(+)-ATPase as a signal transducer." *Eur J Biochem* 269(10): 2434-9.**
- Yang, Z., N. J. Camp, H. Sun, Z. Tong, D. Gibbs, D. J. Cameron, H. Chen, Y. Zhao, E. Pearson, X. Li, J. Chien, A. Dewan, J. Harmon, P. S. Bernstein, V. Shridhar, N. A. Zabriskie, J. Hoh, K. Howes and K. Zhang (2006). "A variant of the HTRA1 gene increases susceptibility to age-related macular degeneration." *Science* 314(5801): 992-3.**
- Yang, Z., Z. Tong, Y. Chen, J. Zeng, F. Lu, X. Sun, C. Zhao, K. Wang, L. Davey, H. Chen, N. London, D. Muramatsu, F. Salasar, R. Carmona, D. Kasuga, X. Wang, M. Bedell, M. Dixie, P. Zhao, R. Yang, D. Gibbs, X. Liu, Y. Li, C. Li, B. Campochiaro, R. Constantine, D. J. Zack, P. Campochiaro, Y. Fu, D. Y. Li, N. Katsanis and K. Zhang (2010). "Genetic and functional dissection of HTRA1 and LOC387715 in age-related macular degeneration." *PLoS Genet* 6(2): e1000836.**

Yarema, K. J. and C. R. Bertozzi (2001). "Characterizing glycosylation pathways." **Genome Biol** 2(5): REVIEWS0004.

Zeng, Y., Y. Takada, S. Kjellstrom, K. Hiriyanna, A. Tanikawa, E. Wawrousek, N. Smaoui, R. Caruso, R. A. Bush and P. A. Sieving (2004). "RS-1 Gene Delivery to an Adult Rs1h Knockout Mouse Model Restores ERG b-Wave with Reversal of the Electronegative Waveform of X-Linked Retinoschisis." **Invest Ophthalmol Vis Sci** 45(9): 3279-85.

Zhang, L., Z. Zhang, H. Guo and Y. Wang (2008). "Na+/K+-ATPase-mediated signal transduction and Na+/K+-ATPase regulation." **Fundam Clin Pharmacol** 22(6): 615-21.

IV. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Humangenetik an der Universität Regensburg angefertigt. Ich danke allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für ihre Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Mein persönlicher Dank gilt:

Prof. Dr. Bernhard Weber für die Überlassung des Themas, seiner Diskussionsbereitschaft und die Möglichkeit an seinem Institut diese Arbeit anfertigen zu können.

Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für die Übernahme der Aufgabe als Erstgutachter meiner Arbeit.

Barbara Bathke und **Andrea Milenkovic** für ihre Gedult bei meiner Einarbeitung im Umgang mit Mäusen und DNA.

Florian Rauscher für seine Diskussionsbereitschaft auch abseit der Laborarbeitszeit.

Vladimir Milenkovic für seine stets aufmunternden Sprüche und das Organisieren der LAN-Partys.

Dr. Thomas Langmann für seine Diskussionsbereitschaft, seine hilfreichen Tipps im Labor und seine fordernde Streckenplanung bei den wöchentlichen Laufabenden.

Laura Klingeisen und **Tobias Schöberl** für ihre Unterstützung und Motivation im Labor und beim Laufen.

Yana Walczak für ihr immer währendes Lächeln und die netten Gespräche im Labor und abseits davon.

Andrea Gehrig für ihre entlose Gedult mir das Genotypisieren der Mäuse beizubringen.

Jürgen Kaschkötö seine hilfsbereitschaft in allen IT-Fragen und darüber hinaus.

Yessica Lemke für ihre Fähigkeit auch noch den kleinsten Rechtschreibfehler in dieser Arbeit zu finden und mich dennoch zu motivieren.

Meiner Familie und meinen Freunden aus Mönchengladbach und Köln, die durch ihr ständiges Nachfragen, nach der Beendigung dieser Arbeit, ein unerschöpflicher Quell der Motivation war.