

# **Molekulare Mechanismen der Retinadegeneration**

## **Aufklärung der erblichen Retinadegenerationen Sorsby Fundusdystrophie und Retinitis Pigmentosa (RP28) - Pathomechanismus und Funktion der beteiligten Proteine**



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

vorgelegt von

**Frank Zach**

aus Cham

im Jahr 2013



Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 05.02.2013

Diese Arbeit wurde angeleitet von: PD Dr. Heidi Stöhr

Unterschrift:

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender:	Prof. Dr. Reinhard Wirth
Erstgutachter:	Prof. Dr. Ernst Tamm
Zweitgutachter:	PD Dr. Heidi Stöhr
Drittprüfer:	Prof. Dr. Stephan Schneuwly



## *Meinen Eltern*

*„Das schönste Glück des denkenden Menschen ist,  
das Erforschliche erforscht zu haben  
und das Unerforschliche zu verehren.“*

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau der Säugetiernetzhaut .....	1
1.1.1	Überblick .....	1
1.1.2	Aufbau und Funktion der Makula .....	3
1.1.3	Aufbau und Funktion des RPEs und der BM .....	4
1.1.4	Aufbau und Funktion der Photorezeptoren .....	5
1.2	Erbliche Erkrankungen der Netzhaut .....	7
1.2.1	Überblick .....	7
1.2.2	Sorsby Fundusdystrophie (SFD) .....	7
1.2.3	Retinitis Pigmentosa .....	12
1.2.3.1	Überblick .....	12
1.2.3.2	Pathophysiologie, klinisches Bild, Symptome .....	13
1.2.3.3	Diagnose und Befund .....	13
1.2.3.4	Therapiemöglichkeiten .....	14
1.2.3.5	Aufklärung des RP28-assoziierten Gendefekts .....	14
1.2.3.6	Klinische Charakterisierung der Patienten mit <i>FAM161A</i> -Mutationen .....	16
1.2.3.7	Das Retinitis Pigmentosa Protein FAM161A .....	16
<b>2</b>	<b>Ziele der Arbeit .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>Material .....</b>	<b>23</b>
3.1	Chemikalien .....	23
3.2	Kit- und Reaktionssysteme .....	24
3.3	Beads .....	25
3.4	Enzyme .....	25
3.5	Vektoren .....	26
3.6	cDNA-Klone und Plasmide .....	26
3.7	Antikörper .....	26
3.8	Molekularmassenstandards .....	27
3.9	Oligonukleotide .....	28
3.10	Puffer und Lösungen .....	31
3.11	Kultur- und Einfriermedien .....	33
3.12	Zelllinien und Bakterienstämme .....	34
3.13	Mauslinien .....	34
3.14	Verbrauchsmaterialien .....	35
3.15	Glaswaren .....	36
3.16	Geräte und Software .....	36
<b>4</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>38</b>
4.1	Sterilisation von Medien und Materialien .....	38
4.2	Kultivierung und Manipulation von Säugetierzellen .....	38
4.2.1	Verwendete Zelllinien .....	38
4.2.2	Allgemeine Wachstumsbedingungen .....	39
4.2.3	Weiterzucht konfluenter Zellen .....	39
4.2.4	Ermittlung der Zellzahl von Zellsuspensionen .....	40
4.2.5	Kryokonservierung und Auftauen von Säugetierzellen .....	40
4.2.6	Transiente Transfektion .....	41
4.2.7	Herstellung von Zelllysaten .....	42
4.2.8	Nocodazolbehandlung von COS-7-Zellen .....	42
4.2.9	Kultivierung von Fibroblastenzelllinien aus murinem Lungengewebe .....	42
4.2.10	Isolierung und Kultivierung von primären RPE-Zellen .....	42
4.3	Kultivierung und Manipulation von bakteriellen Zellen ( <i>E. coli</i> ) .....	43
4.3.1	Verwendete Bakterienstämme .....	43
4.3.1.1	<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	43
4.3.1.2	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) .....	43
4.3.2	Allgemeine Wachstumsbedingungen .....	44
4.3.3	Glyzerinstocks .....	44

4.3.4	Quantifizierung von Bakterienkulturen .....	44
4.3.5	Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	44
4.3.6	Transformation von chemisch kompetenten <i>E. coli</i> Zellen mittels Hitzeschock.....	45
4.3.7	Zelllyse mittels der „FRENCH® Press“ Zellpresse .....	45
4.4	DNA-basierte molekularbiologische Methoden .....	45
4.4.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	45
4.4.2	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	46
4.4.2.1	Durchführung einer PCR .....	46
4.4.2.2	PCR-basierte Amplifikation von Genen bzw. Genstücken zur Klonierung .....	46
4.4.2.3	Kolonie-PCR zur Identifizierung positiver Transformanden .....	47
4.4.2.4	Semi-quantitative Reverse Transkriptions (RT)-PCR .....	48
4.4.2.5	PCR zur Genotypisierung der <i>Timp3</i> -KI und -KO Mauslinien und Fibroblasten .....	48
4.4.2.6	Quantitative Real Time (qRT)-PCR .....	49
4.4.3	<i>In vitro</i> Mutagenese .....	50
4.4.4	Agarosegelelektrophorese zur DNA-Analyse .....	51
4.4.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmente aus Agarosegelen.....	51
4.4.6	DNA-Konzentrationsbestimmung .....	51
4.4.7	Sequenzspezifischer Restriktionsverdau von DNA .....	52
4.4.8	Ligation.....	52
4.4.9	DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse .....	53
4.4.10	Ablauf einer Klonierung .....	54
4.5	RNA-spezifische Methoden .....	54
4.5.1	Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben .....	54
4.5.2	cDNA-Synthese aus RNA mittels Reverser Transkription.....	55
4.6	Protein-basierte biochemische Analysen.....	55
4.6.1	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	55
4.6.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	55
4.6.3	Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen .....	57
4.6.4	Blotting von Proteinen nach Towbin .....	57
4.6.5	Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen .....	57
4.6.6	Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine .....	57
4.6.7	Expression und Aufreinigung rekombinanter MBP-Fusionsproteine .....	58
4.6.8	Protein-Protein Bindungsexperimente.....	58
4.6.8.1	GST-Pulldown Experimente mit Proteinen aus Säugetierzelllysaten.....	58
4.6.8.2	GST-Pulldown mit MBP-Fusionsproteinen .....	59
4.6.9	„Microtubule Binding Protein Spin-down Assay“ .....	59
4.6.10	„Tubulin Polymerization Assay“ .....	60
4.6.11	Proteasomaktivitätsassay .....	61
4.6.12	Isolierung und Enzymverdau von EZMs aus Fibroblasten und RPE-Zellen.....	62
4.6.13	Radioaktive Markierung von Fibroblasten- bzw. RPE-EZMs.....	63
4.7	Immunologische Methoden .....	63
4.7.1	Herstellung polyklonaler Antikörperseren .....	63
4.7.2	Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren.....	64
4.7.3	Blocken von polyklonalen Antikörperseren .....	64
4.7.4	Immunblot .....	65
4.7.5	Immunzytochemische (ICC) Färbungen von Zellen .....	65
4.7.6	Immunhistochemische (IHC) Färbungen von Retinaschnitten.....	66
4.7.7	Immunpräzipitation (IP) .....	67
4.7.8	„Enzym Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) .....	67
4.8	Mikroskopie und mikroskopische Bildaufnahme .....	68
4.9	Bioinformatische Analysen .....	68
4.10	Statistische Datenanalyse .....	68
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>69</b>
5.1	Projekt 1: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Sorsby Fundusdystrophie - Pathomechanismus und Funktion von TIMP3 .....	69
5.1.1	<i>Timp3</i> -Genexpressionsanalysen in murinen Fibroblasten- und RPE-Kulturen .....	69



5.1.2	Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen der TIMP3-S156C-Knockin-Mäuse .....	70
5.1.3	Proteasomaktivitätstests mit murinen Zellen der Genotypen <i>Timp3</i> <sup>-/-</sup> , <i>Timp3</i> <sup>+/+</sup> , <i>Timp3</i> <sup>S156C/+</sup> und <i>Timp3</i> <sup>S156C/S156C</sup> .....	72
5.1.4	<i>De novo</i> EZM-Produktion muriner Zellen der Genotypen <i>Timp3</i> <sup>+/+</sup> , <i>Timp3</i> <sup>S156C/+</sup> und <i>Timp3</i> <sup>S156C/S156C</sup> .....	74
5.1.5	Wechselwirkungen von TIMP3-Varianten mit EZM-Komponenten .....	75
5.1.5.1	Experimente mit endogenem TIMP3 in murinen Fibroblastenkulturen der Genotypen <i>Timp3</i> <sup>-/-</sup> , <i>Timp3</i> <sup>+/+</sup> , <i>Timp3</i> <sup>S156C/+</sup> und <i>Timp3</i> <sup>S156C/S156C</sup> .....	75
5.1.5.2	Experimente mit transient überexprimiertem TIMP3 in HEK293-EBNA-Zellen .....	79
5.2	Projekt 2: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Retinitis Pigmentosa (RP28) - Pathomechanismus und Funktion von FAM161A .....	84
5.2.1	Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen FAM161A .....	84
5.2.2	Lokalisierung und Eigenschaften von überexprimiertem FAM161A in Säugetierzellen ..	87
5.2.3	Physikalische Interaktion von FAM161A mit polymerisierten Mikrotubuli .....	90
5.2.4	Tubulin-Polymerisationsassays .....	96
5.2.5	Homotypische Interaktion von FAM161A .....	97
5.2.6	Heterotypische Interaktion von FAM161A und FAM161B .....	101
5.2.7	Kartierung von bedeutenden Aminosäuren für die Ausbildung von homo- und heterotypischen FAM161A-Interaktionen .....	104
5.2.8	Hefe-Zwei-Hybrid-Assay zur Ermittlung von FAM161A-Interaktionspartnern .....	105
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>112</b>
6.1	Projekt 1: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Sorsby Fundusdystrophie - Pathomechanismus und Funktion von TIMP3 .....	112
6.1.1	Analysen zu Veränderungen der <i>Timp3</i> -Genexpression .....	112
6.1.2	Ultrastrukturelle und histologische Untersuchungen in S156C-TIMP3 Mäusen .....	112
6.1.3	Erhöhung der Proteasomaktivität durch die S156C-TIMP3-Mutation .....	114
6.1.4	S156C-TIMP3-vermittelte Erhöhung der EZM-Produktion .....	116
6.1.5	Veränderungen der EZM-Wechselwirkung von mutiertem TIMP3 .....	117
6.1.6	Molekulare Mechanismen der <i>TIMP3</i> -assoziierten Sorsby Fundusdystrophie .....	121
6.2	Projekt 2: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Retinitis Pigmentosa (RP28) - Pathomechanismus und Funktion von FAM161A .....	123
6.2.1	Lokalisierung von humanem und murinem FAM161A im Verbindungszilium und dem Basalkörper der Photorezeptoren .....	123
6.2.2	Mikrotubuli-Lokalisierung und Eigenschaften von überexprimiertem FAM161A .....	128
6.2.2.1	Ko-Lokalisierung von FAM161A mit $\alpha$ -, $\gamma$ - und acetyliertem $\alpha$ -Tubulin .....	128
6.2.2.2	Physikalische Interaktion von FAM161A mit Mikrotubuli .....	131
6.2.2.3	FAM161A-vermittelte Erhöhung des Mikrotubuliacylierungslevels .....	135
6.2.3	UPF0564-vermittelte Interaktionen der FAM161-Proteine .....	139
6.2.4	Heterotypische Interaktionen von FAM161A mit Y2H-Kandidaten .....	139
6.2.4.1	Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF3A .....	141
6.2.4.2	Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF21B .....	143
6.2.4.3	Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF1A .....	144
6.2.4.4	Potentielle Interaktion von FAM161A mit DCTN1 .....	145
6.2.4.5	Potentielle Interaktion von FAM161A mit MAPK8IP3 .....	147
6.2.5	Molekulare Mechanismen der RP28-vermittelten Retinitis Pigmentosa .....	148
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>149</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>151</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>163</b>
9.1	Abkürzungsverzeichnis .....	163
9.2	Abbildungsverzeichnis .....	166
9.3	Tabellenverzeichnis .....	168
9.4	Publikationen .....	169
9.5	Tagungsbeiträge .....	169
9.6	Lebenslauf .....	170
9.7	Danksagungen .....	171

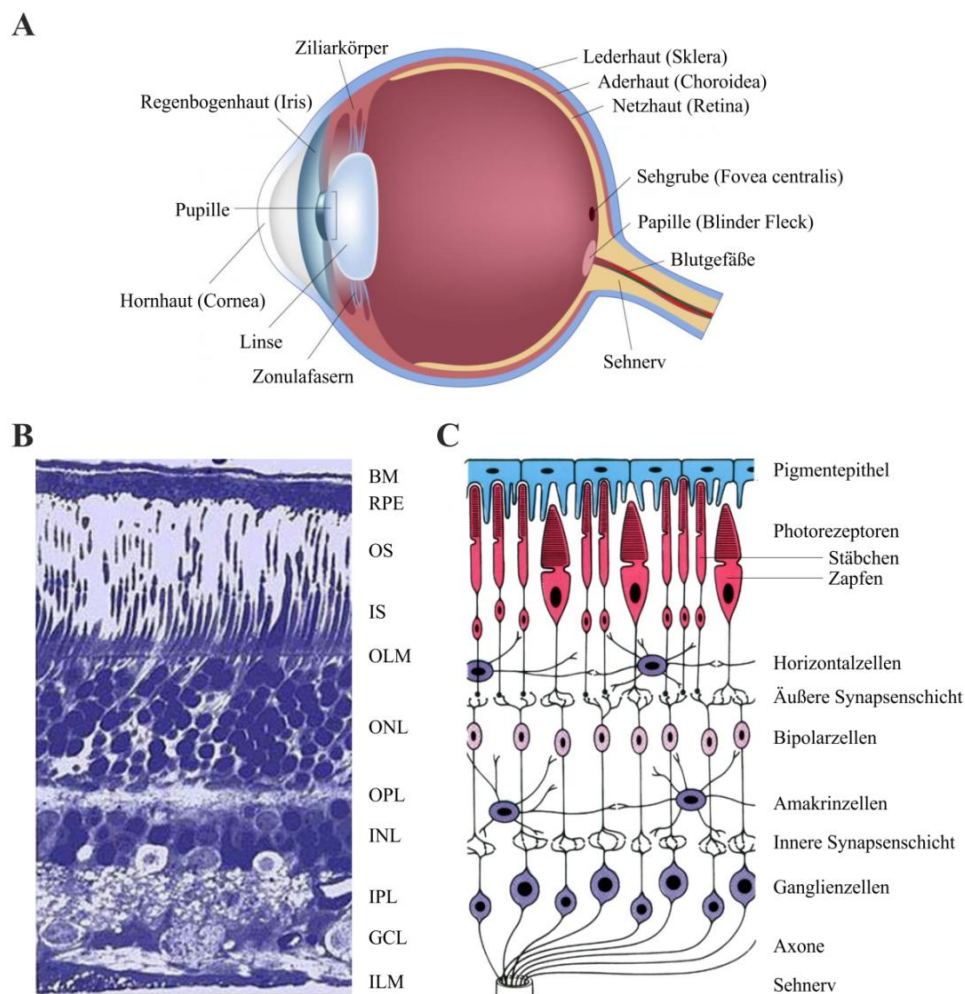


# 1 Einleitung

## 1.1 Aufbau der Säugetiernetzhaut

### 1.1.1 Überblick

Die Netzhaut (Retina) der Säugetiere bezeichnet ein hochspezialisiertes und lichtsensitives neuronales Gewebe, das durch die Wahrnehmung der visuellen Information für den wohl wichtigsten menschlichen Sinn verantwortlich ist. Abbildung 1A zeigt die schematische Darstellung eines sagittalen Querschnitts des menschlichen Auges.



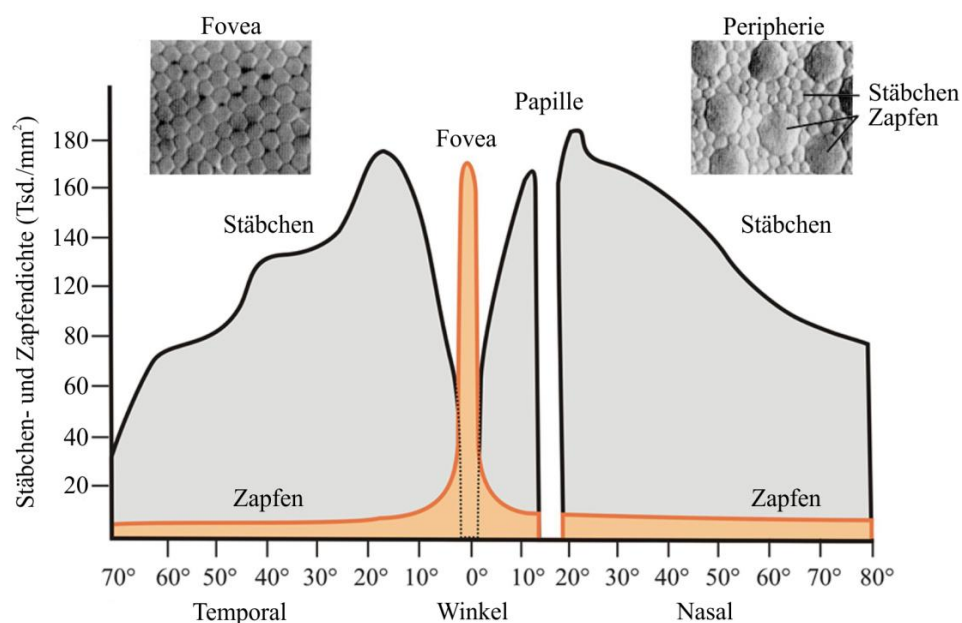
**Abb. 1: Schematische Darstellung des menschlichen Auges und Übersicht der Zusammensetzung und des Aufbaus der retinalen Schichten.** (A) Schematische Darstellung der wichtigsten Bestandteile des menschlichen Auges anhand eines sagittalen Querschnitts durch das Auge. (B) Lichtmikroskopische Aufnahme einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung eines vertikalen Schnitts durch den peripheren Bereich der humanen Retina. BM, Bruchsche Membran; RPE, retinales Pigmentepithel; OS, outer segments (Außensegmente); IS, inner segments (Innensegmente); OLM, outer limiting membrane (äußere Grenzmembran); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglienzellschicht); ILM, inner limiting membrane (innere Grenzmembran). (C) Schematische Darstellung der Hauptzelltypen der Retina. Abbildungen verändert nach <http://images.wisegeek.com/anatomy-of-the-human-eye.jpg> (A), <http://webvision.umh.es/webvision/imageswv/huperi.jpeg> (B) und <http://www.insightseyecare.net/EyeEducation/retinaNeuronalLayers.jpg> (C).

Die Retina kann entlang der inneren Oberfläche des Augapfels lokalisiert werden und steht dort in direktem Kontakt mit der Aderhaut. Licht tritt durch alle Abschnitte der Netzhaut hindurch und trifft, nachdem es vom retinalen Pigmentepithel (RPE) reflektiert wurde, auf die lichtsensitiven Zellen der Retina, die Zapfen und Stäbchen. Aufgrund seines Aufbaus wird dieser Augentyp als inverses Auge bezeichnet. Die Säugetierretina, bestehend aus mindestens 55 verschiedenen Zelltypen (Masland 2001), gliedert sich, ausgehend vom RPE bis hin zur inneren limitierenden Membran, in mehrere, geordnet aufgebaute Schichten (Abb. 1B; Dowling & Dubin 2011). Das RPE ist eine einzellige, pigmentierte Schicht zwischen Ader- und Netzhaut und bildet zusammen mit der Bruchschen Membran (BM), einer fünf-schichtigen Grenzmembran, den äußeren Abschluss der Netzhaut. Eingebettet in das RPE befinden sich die Außensegmente der lichtsensitiven Zapfen und Stäbchen mit den Opsin-gefüllten Disks (Abb. 1C). Die Kerne der Photorezeptoren bilden die äußere Körnerschicht (ONL). Mit Hilfe der rund 6 Millionen Zapfen (photopisches Sehen) und 125 Millionen Stäbchen (skotopisches Sehen) werden die eintreffenden Photonen durch die Phototransduktionskaskade in eine Hyperpolarisation der Photorezeptormembranen umgewandelt (Campbell & Reece 2003). Das absorbierte Licht bewirkt dabei die Isomerisierung von 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal und damit die Trennung des Chromophors vom Opsin, die in einer Konformationsänderung des Opsins resultiert (Campbell & Reece 2003). Durch diese lichtinduzierte Konformationsänderung kommt es zur Aktivierung des G-Proteins Transducin, das wiederum die Phosphodiesterase (PDE) aktiviert (Campbell & Reece 2003). Das Enzym PDE hydrolysiert nun zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) zu 5'-GMP (Campbell & Reece 2003). Die cGMP-Hydrolyse führt zur Schließung von cGMP-gesteuerten Na<sup>+</sup>-Kanälen, wodurch es zu einer Hyperpolarisation der Membran und damit zu einer verminderten Freisetzung des Transmitters Glutamat kommt (Campbell & Reece 2003). Diese veränderten chemischen Signale werden an den Synapsen zwischen Photorezeptor- und Bipolarzellen verarbeitet und durch Horizontalzellen in der äußeren plexiformen Schicht (OPL) weitergegeben. Die Zellkerne Bipolar- und Horizontalzellen bilden zusammen mit denen der Amakrinzellen die innere Körnerschicht (INL) (Abb. 1). In der inneren plexiformen Schicht (IPL) liegen die synaptischen Kontakte der Axonterminalen der Bipolarzellen mit den Dendriten von Amakrin- und Ganglienzellen. Die Signale der Photorezeptoren werden über Bipolar- und Horizontalzellen und durch Verschaltung und Modulation mittels Amakrinzellen letztendlich auf die Ganglienzellen in der gleichnamigen Zellschicht (GCL) geleitet. Die Axone der Ganglienzellen bündeln sich und bilden den Sehnerv, der die Informationen der Lichtreize zur Verarbeitung ins Gehirn überträgt. Neben den beschriebenen neuronalen Zellen, die

hauptsächlich der Wahrnehmung und Verarbeitung der Lichtreize dienen, besitzt die Netzhaut verschiedene Arten von Gliazellen, darunter Müllerzellen, Astrozyten und Mikrogliazellen (Kolb et al. 2011). Müllerzellen durchziehen die komplette Retina und umgeben dadurch die neuronalen Zellen. Somit wirken die Müllerzellen unterstützend auf die Entwicklung und Funktion, sowie das Überleben der Neurone (Bringmann et al. 2006). Astrozyten, die durch den optischen Nerv in die Retina gelangen, sind Teil der Blut-Hirn-Schranke und spielen z.B. eine Rolle in der Nährstoffversorgung der Neurone. Mikroglia sind Makrophagen-ähnliche Zellen, die u.a. der Phagozytose von degenerierenden Nervenzellen dienen (Kolb et al. 2011).

### 1.1.2 Aufbau und Funktion der Makula

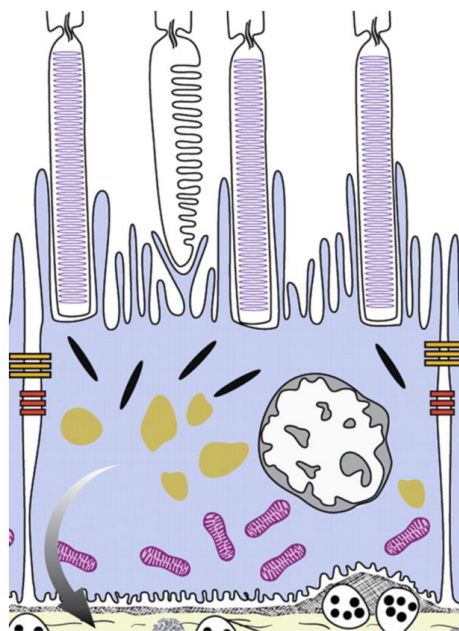
Die kreisförmige Makula im Zentrum der menschlichen Retina stellt den Bereich mit der höchsten Dichte an Photorezeptorzellen dar und wird durch die starke gelbliche Pigmentierung auch als gelber Fleck oder Makula lutea bezeichnet (Kolb et al. 2011). Die Makula besitzt einen Durchmesser von ca. 5 mm und beherbergt im Zentralbereich die sogenannte Sehgrube oder Fovea centralis (Abb. 2A). Die weiteren Bestandteile der Makula sind der Foveahang, die Parafovea, sowie die Perifovea. Die Fovea centralis im Zentralbereich der Makula hat einen Durchmesser von etwa 200  $\mu\text{m}$  und besteht ausschließlich aus Zapfen. Jede Photorezeptorzelle wird im Bereich der Fovea direkt durch eine Ganglienzelle verschaltet (Kolb et al. 2011). Aufgrund der genannten Eigenschaften fungiert die Fovea centralis im Wirbeltierauge als Ort des schärfsten Sehens (Yamada 1969).



**Abb. 2: Stäbchen- und Zapfendichte der Fovea centralis.** Graphische Darstellung der Stäbchen- und Zapfendichte gegen den Winkel der anatomischen Achse. Die Bildausschnitte der Photorezeptoren im Bereich der Fovea und Peripherie verdeutlichen das Verhältnis zwischen Stäbchen und Zapfen. Abbildung verändert nach <http://www.rags-int-inc.com/PhotoTechStuff/CameraEye/EyeConeDistrubition.jpg>.

### 1.1.3 Aufbau und Funktion des RPEs und der BM

Die einzellige Schicht des retinalen Pigmentepithels (RPE) bildet die Trennlinie zwischen neuronaler Netzhaut und Aderhaut (Choroidea) und fungiert als Teil der Blut-Retina-Schranke (Strauss 2005). Die polaren RPE-Zellen sind hexagonal geformt und mit verschiedenen Pigmenten, überwiegend Melanin in Melanosomen, bepackt (Sparrow et al. 2010). In apikaler Richtung besitzen die Zellen unterschiedlich lange, fingerartige Mikrovillifortsätze, die mit den Außensegmenten der Photorezeptorzellen in strukturellem und funktionellem Kontakt stehen (Abb. 3).



**Abb. 3: Kontaktbereich zwischen Photorezeptor- und RPE-Zellschicht.** Die schematische Darstellung zeigt die fingerartigen Mikrovillifortsätze, die in Kontakt mit den Photorezeptoren stehen, sowie die gefurchte basolaterale Membran der RPE-Zellen, die an die Bruchsche Membran angrenzt. Die Abbildung deutet die Wanderung von ApoE (schwarzer Pfeil, gelbe Flecken) in den Bereich der Bruchschen Membran und die daraus folgende Entstehung der AMD-assoziierten Protein- und Lipidablagerungen (Drusen) an. Abbildung verändert nach <http://www.pnas.org/content/108/46/18569/F1.large.jpg>.

Die hochgradig gefurchte basolaterale Membran ist der BM, welche das RPE vom fenestrierten Endothelium der stark vaskularisierten Choriocapillarschicht trennt, zugewandt und fungiert somit als Vermittler vielfältiger Transportprozesse zwischen Netz- und Aderhaut (Strauss 2005). Die BM besteht aus fünf unterscheidbaren Schichten und wird durch die Basalmembranen des RPE bzw. des Endotheliums der Aderhaut gebildet (Booij et al. 2010). Die Schichten ausgehend vom RPE werden als Basalmembran der RPE-Zellen, innere Kollagenschicht, Elastinschicht, äußere Kollagenschicht und Basalmembran der Choriocapillaren bezeichnet (Booij et al. 2010). Die Hauptaufgaben der BM bestehen aus der Regulierung der Diffusion von Molekülen zwischen Aderhaut und RPE, der Zelladhäsion der RPE-Zellen, sowie der Ausbildung einer Diffusionsbarriere für die Unterbindung der

Zellmigration von choroidalen und retinalen Zellen (Booij et al. 2010). Pathologische Veränderungen der BM, z.B. eine Verdickung als Folge der Akkumulation von drusenartigen Ablagerungen (Abb. 3) oder die Neubildung von Blutgefäßen (Neovaskularisation), werden oftmals in Netzhauterkrankungen wie der altersabhängigen Makulardegeneration (AMD) oder der Sorsby Fundusdystrophie (SFD) sichtbar (Booij et al. 2010).

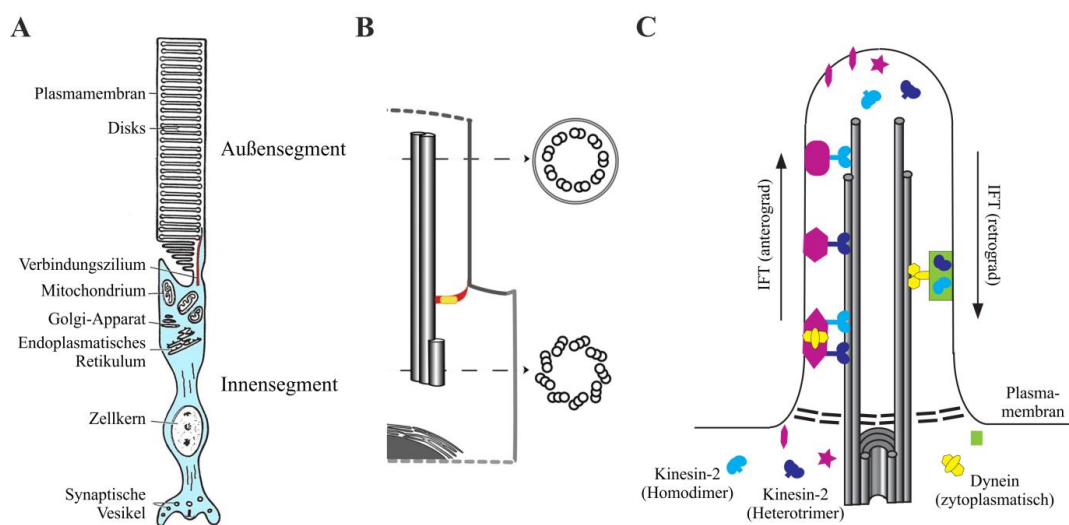
Die Zellen des RPE besitzen, mit Unterstützung der BM (Booij et al. 2010), eine große Bandbreite wichtiger Aufgaben (Strauss 2005). Durch die starke Pigmentierung der RPE-Zellen mit Melanin wird die Absorption von Streulicht und sehr schädlichem Licht im blauen Wellenlängenbereich gewährleistet (Strauss 2005). Im Zusammenspiel mit einer Vielzahl an hochregulierten Enzymen wie z.B. der Superoxiddismutase und der Katalase, wirkt das RPE der permanenten Oxidation von Proteinen und Lipiden und damit der oxidativen Zerstörung der Photorezeptorzellen entgegen (Strauss 2005). Darüber hinaus erfüllt die RPE-Zellschicht durch die hohe transepitheliale Transportaktivität wichtige Funktionen in der Entsorgung von metabolischen Endprodukten der Photorezeptoren ins Blut und zur Versorgung der Photorezeptoren mit Glukose und anderen Nährstoffen aus dem Blut (Strauss 2005). Weiterhin wirken die RPE-Zellen an der Isomerisierung von *all-trans*-Retinal zu *11-cis*-Retinal, an der kontinuierlichen Erneuerung der Außensegmente der Photorezeptoren durch die Phagozytose von alten Disks, sowie an der Sekretion von Wachstumsfaktoren und immunsuppressiver Substanzen mit (Strauss 2005). Diese Vielzahl von unentbehrlichen Aufgaben veranschaulicht die große Bedeutung der RPE-Zellen für die Aufrechterhaltung der visuellen Wahrnehmung. Aufgrund dessen sind Störungen dieser Abläufe und Funktionen sehr häufig mit retinalen Erkrankungen bzw. Degenerationsprozessen der Retina verbunden.

#### **1.1.4 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren**

Wie bereits beschrieben, besitzt die humane Retina mit den Zapfen und Stäbchen zwei verschiedene Typen von Sinneszellen zur Wahrnehmung von Lichtreizen und zur Bilderkennung. Die 125 Millionen Stäbchen dienen dem skotopischen Sehen und damit der Hell-Dunkel-Wahrnehmung. Die selteneren, nur etwa 6 Millionen Zapfen zeigen sich dagegen hauptsächlich für das photopische Sehen bei Tageslicht und das Farbsehen verantwortlich (Campbell & Reece 2003). Zapfen und Stäbchen besitzen Opsin-gefüllte Außensegmente, sowie Innensegmente. Die länglichen (Stäbchen) bzw. konisch zulaufenden (Zapfen) Außensegmente sind der Ort der Phototransduktionskaskade. Die Innensegmente beherbergen den Zellkern und stellen mit einer Vielzahl von Mitochondrien sowie mit den Komponenten der Proteinbiosynthese die Versorgung der Außensegmente sicher. Die Verbindung der



Außen- und Innensegmente der Photorezeptoren wird durch ein primäres, unbewegliches Zilium gebildet (Abb. 4A). Dieses sogenannte Verbindungszilium („connecting cilium“, CC) der Photorezeptoren besitzt ein Mikrotubuli-basiertes Axonem, das dem Basalkörper („basal body“, BB) entspringt. Die Basalkörperstrukturen entsprechen den Zentriolen des Zentrosoms, welche den Zusammenbau der bipolaren Spindel während der Mitose regeln. Die Mikrotubulistrukturen der primären Zilien unterliegen für gewöhnlich einer 9x2+0 Struktur von neun kreisförmig angeordneten Mikrotubulidupletts. Im Gegensatz dazu besitzen bewegliche Zilien (z.B. Spermienzellen) eine 9x2+2 Anordnung mit einem zusätzlichen zentralen Mikrotubulipaar (Abb. 4B).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des Photorezeptorziliums und des intraflagellaren Transports in primären Zilien.** (A) Schema einer Photorezeptorzelle. Das Außensegment ist über das Verbindungszilium mit dem Innensegment verbunden. (B) Darstellung der Mikrotubulistruktur eines primären Ziliums im Bereich der Basis (9x3) bzw. des Axonems (9x2). (C) Schematische Abbildung des Mikrotubuli-basierten IFT-Prozesses und der darin involvierten Motoren Kinesin-2 und zytoplasmatisches Dynein. Abbildungen verändert nach <http://www.bioscience.org/2002/v7/d/krizaj/fig1.jpg> (A), <http://jcb.rupress.org/content/190/5/715/F1.large.jpg> (B) und [http://www-personal.umich.edu/~kjverhey/images/Fig8\\_IFT.jpg](http://www-personal.umich.edu/~kjverhey/images/Fig8_IFT.jpg) (C).

Das Axonem ist von einer doppelschichtigen Membran, die sich durch eine spezielle Protein- und Lipidzusammensetzung deutlich von der Plasmamembran unterscheidet, umgeben (Reiter et al. 2012). Durch die Abgrenzung des Ziliums durch Übergangsfasern und die daraus folgende Ausbildung einer regulierbaren Übergangszone im Bereich des Verbindungsziliums entsteht ein vom Zytosol unterscheidbares, ziliäres Kompartiment (Reiter et al. 2012). Der Transport von Makromolekülen aus den Innensegmenten in die Außensegmente der Photorezeptoren und umgekehrt wird entlang der axonemalen Mikrotubuligleise des Verbindungsziliums bewerkstelligt. Durch den sogenannten intraflagellaren Transports (IFT) werden mit Hilfe von Kinesin- (retrograd, vorwärtsgerichtet) und Dyneinmotoren (anterograd, rückwärtsgerichtet) Transportvesikel zur Spitze des Ziliums bzw. zurück zum Basalkörper befördert (Abb. 4C, Rosenbaum et al. 1999). Das Verbindungszilium ist somit für die



Funktion und das Überleben der Photorezeptoren von essentieller Bedeutung. Dies wird durch das Auftreten vielfältiger retinaler Ziliopathien, aufgrund fehlerhafter oder fehlender Komponenten des Photorezeptorziliums bzw. der ziliären Transportmaschinerie verdeutlicht.

## **1.2 Erbliche Erkrankungen der Netzhaut**

### **1.2.1 Überblick**

Erblich bedingte Beeinträchtigungen der Netzhaut bilden zusammen mit komplexen Netzhauterkrankungen, wie z.B. der AMD, die sowohl durch genetische als auch umweltbedingte Faktoren beeinflusst wird, den weltweiten Hauptgrund für den Verlust des Augenlichts. Die außerordentliche Komplexität der humanen Netzhaut wird deutlich durch die Vielzahl an Genen, die durch Mutationen und einer daraus folgenden Beeinträchtigung der korrekten Funktion der entsprechenden Genprodukte an den erblichen Netzhauterkrankungen beteiligt sind. Die RetNet-Datenbank (<https://sph.uth.edu/retnet/>), die eine Übersicht der hereditären retinalen Erkrankungen liefert, listet derzeit (Stand: Januar 2013) mehr als 230 Gene bzw. Genloci, die mit Netzhauterkrankungen assoziiert sind, auf. Die, gemessen an der Anzahl der unterschiedlichen beeinträchtigten Gene und der betroffenen Personen, am weitesten verbreitete erbliche Erkrankung stellt die autosomal dominant, autosomal rezessiv, oder X-chromosomal vererbte Retinitis Pigmentosa (RP) dar. Neuesten Daten zu Folge konnten bisher 50 verschiedene Genorte mit RP assoziiert werden. Neben Erkrankungen wie dem Bardet-Biedl-Syndrom (BBS, 14 Loci), oder der kongenitalen Leberschen Amaurose (LCA, 12 Loci) mit einer relativ hohen Anzahl an unterschiedlichen Genloci, sind selten vorkommende Formen der Retinadegeneration, wie z.B. die Sorsby Fundusdystrophie gelistet (<https://sph.uth.edu/retnet/>). SFD wird durch verschiedene Gendefekte in nur einem Gen ausgelöst. Manche Mutationen, z.B. im Gen des zentrosomalen Proteins CEP290, können dabei je nach Position in verschiedene retinale Degenerationen involviert, oder Teil einer syndromischen Erkrankung sein (<https://sph.uth.edu/retnet/>).

### **1.2.2 Sorsby Fundusdystrophie (SFD)**

Die Sorsby Fundusdystrophie (OMIM 136900: <http://omim.org/entry/136900>) bezeichnet eine sehr seltene Form der autosomal dominanten Makuladegeneration, die durch Mutationen im *TIMP3*-Gen ausgelöst wird (Weber et al. 1994). Es handelt sich um eine spät beginnende Erkrankung, die sich im Durchschnitt etwa in der 4. Lebensdekade durch einen raschen Verlust des zentralen Sehens, sowie eine fortschreitende Beeinträchtigung des peripheren Sehens manifestiert und die durch eine letztendlich einsetzende Erblindung charakterisiert ist

(Sorsby & Mason 1949). Weitere klinische Merkmale können Störungen des Farbsehens (Kalmus & Seedburgh 1976) sowie die Ausbildung einer Nachtblindheit umfassen (Jacobson et al. 1995). Eine Steigerung in der Drusenanzahl und -größe, eine fortschreitende Atrophie des RPE, der Makula, sowie der Choriocapillaren und eine sich zunehmend entwickelnde Neubildung von Blutgefäßen (choroidale Neovaskularisation, CNV) charakterisieren die SFD in späteren Stadien und führen letztendlich zum Photorezeptorzelltod und zum Verlust des zentralen Sehens (Chen et al. 2010).

Histopathologisch sichtbar wird die SFD erstmals im Bereich der fünfschichtigen Bruchschen Membran. Durch die krankhafte Ablagerung von lipidhaltigem, drusenartigem Material im sub-RPE Bereich kommt es zu einer Verdickung der BM (Capon et al. 1989, Chong et al. 2000). Die BM-Verdickungen konnten zusätzlich mit der Akkumulation von TIMP3-Molekülen in der BM von SFD-Spenderaugen in Verbindung gebracht werden (Fariss et al. 1998). Weiterhin wurden SFD-bedingte morphologische Veränderungen der BM im Bereich der Elastinschicht beobachtet (Chong et al. 2000). Die SFD als relativ seltene erbliche Erkrankung der Makula zeigt somit, beispielsweise durch die CNV (Chen et al. 2010) oder die BM-Verdickungen (Capon et al. 1989, Chong et al. 2000), pathologische Überlappungen mit der weitaus häufiger auftretenden altersabhängigen Makuladegeneration (AMD). Die AMD, die eine multifaktorielle Erkrankung der Makula ist, stellt die weltweite Hauptursache für die Erblindung der älteren Bevölkerungsschichten in entwickelten Ländern dar (Chen et al. 2010, Ambati & Fowler 2012). Man unterscheidet hierbei zwei Formen der AMD, die trockene Form mit geographischer Atrophie, sowie die feuchte Ausprägung mit CNV von Blutgefäßen in die Retina (Ambati & Fowler 2012). Die AMD zeigt eine komplexe Pathogenese, an deren Entstehung neben verschiedenen Umweltfaktoren und persönlichen Charakteristika, wie z.B. Tabakkonsum, auch Mutationen in mehreren Genen beteiligt sein können (Francis & Klein 2011). Zu den genetischen Faktoren, die hauptsächlich durch genomweite Assoziationsstudien (GWAS) identifiziert werden konnten, zählen Mitglieder der Komplementkaskade (*CFH*, *X2*, *CFB*, *C3*, *CFI*) sowie der Locus *ARMS2/HTRA1* und einzelne Nukleotidaustausche (SNPs) ca. 100 kb upstream des ersten Exons des *TIMP3*-Gens (Chen et al. 2010, Francis & Klein 2011). Aufgrund der charakteristischen Überschneidungen zwischen SFD und AMD besteht somit die Hoffnung, durch Aufdeckung des SFD-assozierten Pathomechanismus ebenfalls Rückschlüsse auf bestimmte Merkmale und Eigenschaften der AMD-Pathogenese zu erlangen.

Die Nukleotidveränderungen in SFD-Patienten betreffen ein Gen, das für den Gewebsinhibitor der Metalloproteinase-3 (*TIMP3*) kodiert (Weber et al. 1994). *TIMP3* ist eines der vier

Mitglieder der TIMP-Familie (TIMP1 bis TIMP4) und wird von den Zellen des RPEs in die BM sezerniert (Booij et al. 2010). TIMP3 ist primär ein endogener Regulator der Zink-abhängigen Matrix-Metalloproteinasen (MMPs, Murphy et al. 1994), sowie der nahe verwandten Zink-abhängigen Proteinasen der ADAM („a disintegrine and metalloproteinase“)- und ADAMTS („ADAM with thrombospondin motifs“)-Familien (Loechel et al. 2000, Hashimoto et al. 2001). Diese Enzyme erfüllen vielfältige Aufgaben, unter anderem im Auf- und Umbau der extrazellulären Matrix (EZM) und der Wundheilung. Die Feinabstimmung zwischen TIMPs und den beschriebenen Proteasen ist somit entscheidend an der Aufrechterhaltung der Homöostase im Bereich des RPE und der BM beteiligt (Lin et al. 2006). Störungen dieser Prozesse, die z.B. eine TIMP3-Akkumulation in der BM auslösen, können zu Erkrankungen wie SFD und AMD führen (Fariss et al. 1998, Kamei & Hollyfield 1999, Lin et al. 2006). Als weitere *TIMP3*-assoziierte Krankheiten sind die Tumordinvasion, Arthritis und kardiovaskuläre Fehlfunktionen zu nennen (Malemud 2006).

TIMPs sind relativ kleine Proteinen mit Molekularmassen zwischen 21 und 28 kDa. Sie besitzen mit ca. 40-50% Sequenzidentität einen hohen Grad an Homologie (Lee et al. 2007). TIMPs zeigen die größten Übereinstimmungen im N-terminalen Bereich, der eine Faltstruktur mit fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblattsträngen ausbildet (Lee et al. 2007). Der N-Terminus der TIMP-Proteine besitzt ein konserviertes CXC-Motiv und ist durch eine direkte Bindung an das aktive Zentrum der Matrixmetalloproteinasen für die Inhibierung der proteolytischen Enzymaktivität ausreichend (Bond et al. 2000). Die kleineren C-terminalen Abschnitte der TIMPs mit 50-60 Aminosäuren weisen einen höheren Grad an Variabilität auf (Langton et al. 1998). Der C-Terminus bindet an Pro-MMPs und überführt diese Vorstufen in die enzymatisch aktiven MMP-Formen (Butler et al. 1999, Zhao et al. 2004). Weiterhin vermittelt der C-terminale TIMP3-Bereich, zusammen mit Aminosäuren des N-Terminus, die unter den TIMPs einzigartige kovalente Verankerung in der extrazellulären Matrix (Blenis & Hawkes 1984, Langton et al. 1998, Lee et al. 2007). TIMP3 bindet unter anderem an Glykosaminoglykane der EZM (Yu et al. 2000). Die N.- und C.-terminalen Domänen besitzen jeweils drei Disulfidbrücken, welche aus je sechs hoch konservierten Cysteinresten gebildet werden (Williamson et al. 1990, Douglas et al. 1997). Ein Alleinstellungsmerkmal von TIMP3 bildet dessen Inhibierung des Enzyms ADAM17, das auch als TACE (TNF- $\alpha$  konvertierendes Enzym) bezeichnet wird (Amour et al. 1998). Dadurch beeinflusst TIMP3 die Freisetzung verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren und Rezeptoren, darunter befinden sich TNF- $\alpha$  und der Interleukin-6 Rezeptor (Amour et al. 1998). Neben der Inhibierung verschiedener Klassen von Proteasen erfüllt TIMP3 weitere Funktionen in der VEGF („vascular endothelial

growth factor“-vermittelten Angiogenese (Qi et al. 2003). Hierbei konkurriert TIMP3 *in vitro* mit VEGF um die Bindung an VEGFR2, den VEGF Rezeptor-2 (Qi et al. 2003). Darüber hinaus interagiert TIMP3 mit dem Angiotensin II Typ 2 Rezeptor AGTR2 (Kang et al. 2008). Diese TIMP3-Eigenschaft steht mit der Unterdrückung der VEGF-assoziierten Angiogenese in Verbindung (Anand-Apte et al. 1997, Qi et al. 2009). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mutiertes TIMP3 eine erhöhte Angiogenese induziert (Qi et al. 2009). TIMP3 spielt somit eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Angiogenese.

Nachdem die TIMP3-Aminosäuresubstitutionen S181C und Y168C erstmals mit SFD assoziiert worden waren (Weber et al. 1994), konnte in der Folgezeit weiterer TIMP3-Mutationen gefunden werden. Neben den Punktmutationen E139K (Saihan et al. 2009), S156C (Felbor et al. 1995), H158R (Lin et al. 2006), G166C (Felbor et al. 1997), G167C (Jacobson et al. 1995), Y168C (Felbor et al. 1996), S170C (Barbazetto et al. 2005), Y172C (Jacobson et al. 2002) konnte die Mutation E139X (Langton et al. 2000), die zum vorzeitigen Proteintranslationsstopp führt, sowie die Veränderung der Akzeptor-Spleißstelle des Übergangs von Intron 4 und Exon 5 (Tabata et al. 1998), die durch eine späte Ausprägung der SFD charakterisiert ist, identifiziert werden. Erst kürzlich konnte die weitere Mutation S38C in SFD-Patienten entdeckt werden (Schoenberger & Argawal 2012). Die große Überzahl der mit SFD-assoziierten TIMP3-Punktmutationen kann in Exon 5 und somit im C-terminalen Bereich lokalisiert werden. Die bisher bekannten Mutationen resultierten in den meisten Fällen nicht in einer veränderten Interaktion mit den Proteasen, einer verringerten EZM-Lokalisation oder einer gestörten Wechselwirkung mit VEGF (Langton 1998 et al., Langton et al. 2000, Yeow et al. 2002, Soboleva et al. 2003, Fogarasi et al. 2008, Saihan et al. 2009). Die große Mehrheit der bekannten Mutationen führt zu einem zusätzlichen, ungepaarten Cystein, wodurch die mutierten TIMP3-Proteine unter anderem dazu neigen, intermolekulare Disulfidbrücken auszubilden und unter nicht-reduzierenden Bedingungen die Bildung von dimeren und multimeren Aggregaten während der SDS-PAGE zu vermitteln (Langton et al. 2000, Yeow et al. 2002, Weber et al. 2002, Arris et al. 2003). Die nicht zu einem ungepaarten Cystein führende TIMP3-Mutation E139K resultierte ebenfalls in der Ausbildung von TIMP3-Dimeren in TIMP3-transfizierten ARPE19-Zellen (Saihan et al. 2009). Der zweiten Cystein-unabhängige Mutation H158R konnte bisher keine Multimerisation nachgewiesen werden. Die mit der TIMP3-Mutation H158R assoziierte SFD-Form führt jedoch zu einem außergewöhnlich späten Krankheitsbeginn zwischen der 5. und 7. Lebensdekade, was auf eine mildere Form der Erkrankung hindeuten könnte (Lin et al. 2006). Die H158R-Mutation befindet sich im Bereich einer proMMP-Interaktionsdomäne und könnte durch eine veränderte

Interaktion von TIMP3 und proMMPs zu den beobachteten SFD-Phänotypen führen (Lin et al. 2006). Die prominenteste Hypothese zum SFD-assoziierten Pathomechanismus geht durch die Dimerisierung von mutiertem TIMP3 von einem verringerten Umsatz und damit einer erhöhten Halbwertszeit der EZM-gebundenen TIMP3-Moleküle aus (Langton et al. 2005). Dadurch könnte es zu einer verstärkten bzw. verlängerten Inhibierung der Proteasen durch TIMP3 und zu einer Verminderung des EZM-Abbaus kommen, was die Verdickungen der BM in SFD-Patienten erklären würde. Dies könnte wiederum zur Verringerung des Austausches von Molekülen zwischen Retina und Aderhaut und somit zum SFD-assoziierten Phänotyp führen. Alternative Hypothesen beziehen sich auf die beobachtete Erhöhung der EZM-Adhäsion von mutantem TIMP3 (Yeow et al. 2002) oder die durch S156C-TIMP3 ausgelöste Veränderungen in der Zellmorphologie und dem Energiemetabolismus (Soboleva et al. 2003).

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Defizienz bzw. punktuellen Veränderung von TIMP3 und zur Ermittlung des SFD-Pathomechanismus wurden in der Vergangenheit mehrere, genetisch veränderte Mauslinien erzeugt. Neben verschiedenen Knockout (KO)-Modellen (Leco et al. 2001, Janssen et al. 2008) stehen Knockin (KI)-Linien mit den TIMP3-Mutationen S156C (Weber et al. 2002) und S156M zur Verfügung. Die Charakterisierung der nicht in SFD-Patienten vorkommenden S156M-Mutation sollte dabei die Rolle der Cystein-vermittelten Di- und Multimerisierung von TIMP3-Molekülen ermitteln. Die *Timp3*-Defizienz der KO-Mäuse zeigte eine Vielzahl phänotypischer Konsequenzen. Durch einen unkontrollierten MMP-vermittelten Matrixabbau und eine nicht steuerbare Aktivierung des Zytokins TNF- $\alpha$  durch fehlende Inhibierung von TACE leiden *Timp3*-defiziente Tiere an erweiterten pulmonaren Luftwegen (Leco et al. 2001) und einer verringerten Anzahl von Bronchiolen (Gill et al. 2003). Weiterhin wurden Anzeichen einer Kardiomyopathie und eine Erweiterung des linken Herzventrikels beobachtet (Fedak et al. 2004). Als Folge der TIMP3-Abwesenheit entwickelten sich chronische Leberentzündungen (Mohammed et al. 2004), sowie verstärkten Entzündungsreaktionen durch eine Antigen-induzierte Arthritis (Mahmoodi et al. 2005). Die Rolle von TIMP3 an der Tumorgenese wurde durch eine verstärkte Gefäßneubildung, die zu einer Gefäßerweiterung und zu erhöhtem Tumorwachstum führte, sowie durch eine erhöhte Metastasierung durch Tumorzellen in *Timp3*-defizienten Mäusen bestätigt (Cruz-Muñoz et al. 2006a & 2006b). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Studien, die TIMP3 eine Rolle in der Entwicklung und dem Fortschreiten von Krebs zugeschrieben hatten (Anand-Apte et al. 1996). Die Überexpression von TIMP3 in Krebszellen konnte z.B. mit einer Verringerung des Krebswachstums verknüpft werden (Anand-Apte et al. 1996). Die *Timp3*-Defizienz machte sich im murinen Auge durch die Entwicklung von abnormalen

Blutgefäßen und durch eine Erweiterung der Kapillaren im Bereich der Aderhaut bemerkbar (Janssen 2008). Ein ähnlicher Phänotyp konnte jedoch in der Retina nicht ermittelt werden. Die Charakterisierung der *Timp3*<sup>S156C</sup>-Mäuse eines C57BL/6 Hintergrunds ergab einen milden Phänotyp mit einer BM-Verdickung, sowie Veränderungen des Mikrovillilabyrinths der RPE-Zellen (Weber et al. 2002). Desweiteren zeigten sich in EZMs aus kultivierten S156C-TIMP3 Zellen, sowie in BMs der *Timp3*<sup>S156C</sup>-Genotypen erhöhte TIMP3-Quantitäten (Weber et al. 2002, Soboleva et al. 2003). Die phänotypischen Untersuchungen des *Timp3*<sup>S156C</sup>-KI (CD1) ergaben eine verdickte BM, eine teilweise aufgelöste RPE-Basalmembran mit elektronendichtem Material im RPE, sowie Veränderungen in der Nieren-EZM (Janssen 2008).

### 1.2.3 Retinitis Pigmentosa

#### 1.2.3.1 Überblick

Retinitis Pigmentosa (RP) bezeichnet eine klinisch und genetisch sehr variable Gruppe von erblichen Netzhautdegenerationen. RP besitzt eine Verbreitung von etwa 1:4000 in der weltweiten Bevölkerung und ist dadurch mit geschätzten 1,5 Millionen Erkrankten die häufigste Form der erblichen Retinadegeneration (Ayuso & Millan 2010). Neueste Schätzungen gehen sogar von weltweit bis zu 3 Millionen Betroffenen der verschiedenen RP-Formen und somit von etwa 30.000-40.000 Patienten in Deutschland aus (Zobor & Zrenner 2012). Bezüglich des Vererbungsmusters der Erkrankung können verschiedene Formen beobachtet werden. Neben der isolierten, sporadischen Form, bei der in der jeweiligen Familie keine weiteren Betroffenen auftreten, können, wie bereits angedeutet, die autosomal dominante RP (adRP), die autosomal rezessive RP (arRP), sowie die X-chromosomale (X-linked) RP (XLRP) unterschieden werden (Ayuso & Millan 2010). In seltenen Fällen kommt es auch zu mitochondrialen oder digenischen Erbgängen (Ayuso & Millan 2010). Neben diesen nicht syndromischen Formen, die etwa 70-80% aller RP-Fälle abdecken, beobachtet man eine Vielzahl von syndromischen Ausprägungen der Erkrankung (Ayuso & Millan 2010). Die häufigsten Formen sind hierbei die kongenitale Lebersche Amaurose (LCA, ca. 4%), sowie die Usher- (ca. 10%) und Bardet-Biedl-Syndrome (ca. 5%), welche neben der Netzhautdegeneration zu Taubheit, Übergewicht, Polydaktylie oder Nierenstörungen führen können. Laut RetNet-Datenbank (<https://sph.uth.edu/retnet/>) sind aktuell (Januar 2013) 19 Gene mit adRP assoziiert. Dabei konnte bei 18 bereits das zugehörige Protein identifiziert werden. Zusammen mit den arRP (26 Gene/Loci, 18 identifiziert)- und XLRP (5 Gene/Loci, 2 identifiziert)-Formen ergeben sich somit die 50 verschiedenen Gene, die mit der nicht syndromischen RP assoziiert sind.

### **1.2.3.2 Pathophysiologie, klinisches Bild, Symptome**

Die RP-Erkrankung ist im Allgemeinen durch eine anfängliche Minderung bzw. den Verlust der Stäbchenfunktion und eine sich anschließende Beeinträchtigung der Zapfenfunktion charakterisiert (Ferrari et al. 2011). Ein erstes Zeichen der Erkrankung bei RP-Patienten kann dadurch eine fortschreitende Nachtblindheit aufgrund des Stäbchenfunktionsverlusts sein (Ferrari et al. 2011). Weiterhin kommt es zu einem zunehmenden Gesichtsfeldverlust ausgehend von der mittleren Peripherie der Retina und somit zur Entwicklung eines Tunnelblicks (Ferrari et al. 2011). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kommt es durch die einsetzende Beeinträchtigung des Foveabereichs und der Zapfenfunktion zum Verlust des zentralen Sehens (Ferrari et al. 2011). Nach Erreichen eines bestimmten kritischen Alters kommt es zu einem extrem beschleunigten Fortschreiten der Krankheit, was in vielen Fällen langfristig zur gesetzlich anerkannten Erblindung führt (Zobor & Zrenner 2012). Die RP-Erkrankung ist klinisch sehr heterogen. Der Verlauf kann sich abhängig vom genetischen Hintergrund und dem Erbgang, sogar innerhalb einer Familie, stark unterscheiden (Zobor & Zrenner 2012). Die ersten Beschwerden treten dabei im Allgemeinen in den ersten beiden Dekaden auf, die Diagnose wird durch den anfangs milden Verlauf im Durchschnitt jedoch erst zwischen der 3. und 4. Lebensdekade gestellt (Zobor & Zrenner 2012). Die Prognosen der Patienten, die an adRP leiden sind dabei im Vergleich am günstigsten (Zobor & Zrenner 2012). Neben der arRP-Form, die eine intermediäre Prognose erlaubt, ist die XIRP für die betroffenen männlichen Patienten mit dem schwersten Verlauf verbunden (Zobor & Zrenner 2012).

### **1.2.3.3 Diagnose und Befund**

Die Diagnose Retinitis Pigmentosa kann durch das Zusammenspiel verschiedener subjektiver, objektiver, morphologischer und genetischer Befunde gestellt werden (Zobor & Zrenner 2012). Zu den subjektiven Verfahren werden die Messung der Dunkeladaptationsschwelle und die Gesichtsfeldprüfung des Patienten gezählt (Zobor & Zrenner 2012). Ein objektiveres Verfahren ist die Aufnahme eines Elektretinogramms (ERG) zur Untersuchung der elektrischen Aktivität verschiedener Zelltypen der Netzhaut (Zobor & Zrenner 2012). Durch die Aufnahme von a- und b-Wellen können die Aktivitäten der Photorezeptoren getrennt von denen der nachgeschalteten Neurone (Bipolarzellen, Müllerzellen) gemessen werden (Zobor & Zrenner 2012). Bei RP-Patienten zeigt sich aufgrund der anfänglichen Beeinflussung der Stäbchenfunktion typischerweise eine Veränderung des skotopischen ERGs, wohingegen das photopische ERG zu Beginn relativ unbeeinträchtigt erscheint (Zobor & Zrenner 2012). Im

weiteren Verlauf der Erkrankungen kommt es jedoch ebenfalls zum Verlust einer reproduzierbaren Summenantwort des photopischen ERGs (Zobor & Zrenner 2012). Eine morphologische Diagnose kann aufgrund der RP-assoziierten Fundusveränderungen durch eine Funduskopie erfolgen. Typischerweise treten hierbei beidseits symmetrische Symptome wie Gefäßverengung, sogenannte „wachsgelbe Papillen“ oder Veränderung des RPEs auf (Zobor & Zrenner 2012). Eine Hyperpigmentation führt dabei zu den typischen „Knochenkörperchen“, die namensgebend für die Erkrankung sind (Zobor & Zrenner 2012). Eine zweite Methode zur morphologischen Beobachtung der Patienten bietet die optische Kohärenztomographie (OCT), bei der mit Hilfe von histologischen Schnittbildern die Netzhautdicke und -struktur fortlaufend ermittelt werden kann (Sahel et al. 2010). Typischerweise zeichnen sich RP-Patienten dabei durch den Verlust oder die Beeinträchtigung der äußeren retinalen Schichten, sowie eine Atrophie des RPEs, jedoch aber gut erhaltenen inneren Netzhautschichten aus (Zobor & Zrenner 2012). Die genetische RP-Diagnose ist aufgrund der großen Anzahl bekannter Genveränderungen schwierig und zeitintensiv, kann jedoch für spezifische Behandlungsmethoden, z.B. durch gezielte Gentherapie (Sundaram et al. 2012), von essentieller Bedeutung sein (Zobor & Zrenner 2012).

#### **1.2.3.4 Therapiemöglichkeiten**

Grundsätzlich ist für die Behandlung von RP-Patienten keine geeignete und etablierte Behandlungsmethode vorhanden. Die einzigen Möglichkeiten zur Verbesserung der visuellen Funktion sind optische und elektronische Hilfsmittel zum Ausgleich von Refraktionsfehlern oder zum Schutz vor UV-Strahlen (Zobor & Zrenner 2012). Weitere therapeutische Ansätze werden jedoch in verschiedenen Bereichen erprobt. Diese Ansätze zielen dabei auf den Erhalt bzw. den Schutz noch vorhandener Photorezeptoren durch Gentherapie, Verabreichung pharmakologischer oder neuroprotektiver Substanzen, sowie den Ersatz verlorener Zellen durch stammzellbasierte Verfahren ab (Sundaram et al. 2012, Zobor & Zrenner 2012).

#### **1.2.3.5 Aufklärung des RP28-assoziierten Gendefekts**

Seit Aufklärung der ersten RP-assoziierten Mutation, einem Aminosäureaustausch von Prolin nach Histidin an Position 23 des Rhodopsinproteins im Jahr 1990 (Dryja et al. 1990), erreichte die RP-Genetik durch Identifizierung einer stetig wachsenden Anzahl an Genen und Genorten, eine hohe Komplexität. Im Jahr 2010 gelang es, den RP28-auslösenden Gendefekt aufzuklären (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Der RP28-Locus wurde bereits 1999 in einer indischen Familie (PMK146) durch „Homozygosity Mapping“, das ein gutes Werkzeug



für die Kartierung seltener autosomal rezessiver Erbgänge mit Nachkommen blutsverwandter Familienmitglieder darstellt, kartiert und mit RP assoziiert (Gu et al. 1999). Dazu wurde mittels genomischer Patienten-DNAs und Mikrosatellitenmarkern nach homozygoten Bereichen gesucht. Die Polymorphismen im Bereich des Markers D2S1394 auf dem kurzen Arm von Chromosom 2 zeigten sich dabei in den vier RP-Patienten der Familie PMK146 homozygot (Gu et al. 1999). Durch weitere zielgerichtete Analysen dieses chromosomalen Bereichs ergab sich ein homozygotes Muster in vier verschiedenen Markern (Gu et al. 1999). Somit konnte die mit dem Phänotyp in der Familie PMK146 ko-segregierende, krankheitsauslösende Mutation des arRP-Locus RP28, in einen 16 cM großen Bereich (14 Mb) zwischen dem (telomerischen) Marker D2S1337 und dem (zentromerischen) Marker D2S286 auf Chromosom 2p11-p15 kartiert werden (Gu et al. 1999).

Die beschriebenen Kartierungsergebnisse konnten 2004 in einer weiteren RP-Familie aus Indien (IIS-2) bestätigt und verfeinert werden (Kumar et al. 2004). Von insgesamt 17 Familienmitgliedern aus vier Generationen wurden sieben Personen mit RP diagnostiziert (Kumar et al. 2004). Alle erkrankten Personen waren homozygot für die Allele der Marker D2S2320, D2S2397, D2S380 und D2S380, sowie heterozygot in den Markern D2S2225 (telomerisch) und D2S296 (zentromerisch), wodurch der RP28-Locus auf einen 1,06 cM Bereich bei Chromosom 2p14-p15 verfeinert wurde (Kumar et al. 2004). Darin wurden 15 Genen, von denen 14 entweder im Auge oder der Retina exprimiert sind, gefunden (Kumar et al. 2004). *MDH1*, das Gen für eine zytosolische Malatdehydrogenase, konnte durch Sequenzierung der Intron- und Exonbereiche in Patienten der Familien PMK146 und IIS-2 ausgeschlossen werden (Frio et al. 2009).

In einem kombinierten Ansatz von Hochdurchsatzsequenzierungen („ultra high throughput sequencing“, UHTs) der 1643 Exone (und Introne der unmittelbaren Umgebung) des RP28-Intervals in RP-Patienten der Familie PMK146 und Chromatinimmunpräzipitationen gefolgt von UHTs (ChIP-Seq) zur Ermittlung von direkten Zielgenen des Retina-spezifischen Transkriptionsfaktors CRX konnte schließlich die homozygote „Nonsense“-Mutation c.685C>T (p.Arg229X) in *FAM161A* mit dem RP28-Locus assoziiert werden (Langmann et al. 2010). Diese Mutation war in allen vier erkrankten Individuen der Familie PMK146 homozygot zu finden. Die nicht betroffenen Familienmitglieder sind entweder heterozygote Träger der Mutation oder besitzen zwei wildtypische Allele. Durch zielgerichtete Analysen des *FAM161A*-Gens in 118 Patienten mit rezessiver oder isolierter RP aus Deutschland konnte eine weitere unabhängige, mit der Krankheit in den entsprechenden Familien segregierende,

homozygote „Nonsense“-Mutation c.1309A>T (pArg437X) in drei Patienten entdeckt werden (Langmann et al. 2010). Parallel zu dieser Studie konnten weitere *FAM161A*-Mutationen in Familien aus Israel und den palästinensischen Gebieten entdeckt werden (Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Durch „Homozygosity Mapping“ konnte hier die kartierte Region anfangs auf die Region von Chromosom 2p15 verfeinert werden. Mittels nachfolgender Sequenzanalyse von 12 Kandidatengenen in 20 arRP-Familien wurden die drei homozygoten Nullmutationen c.1355\_6delCA (p.Thr452SerfsX3), c.1567C>T (p.Arg523X) und c.1786C>T (p.Arg596X) entdeckt (Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Somit konnten homozygote *FAM161A*-Mutationen mit hoher Wahrscheinlichkeit als verantwortlich für die RP28-assoziierte, autosomal rezessive Form der RP postuliert werden (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010).

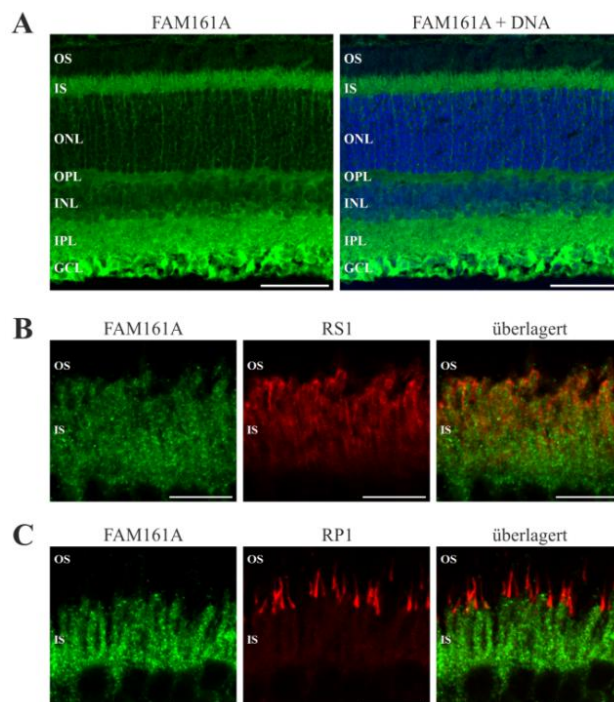
#### **1.2.3.6 Klinische Charakterisierung der Patienten mit *FAM161A*-Mutationen**

Zur Charakterisierung des klinischen Phänotyps der RP28-Patienten mit *FAM161A*-Mutationen wurden ERG, OCT, Autofluoreszenztests sowie Untersuchungen des visuellen Feldes und des Farbsehens durchgeführt (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Hierbei wurden die typischen RP-Phänomene, beispielsweise die Auslöschung des ERG-Signals, eine Verengung retinaler Blutgefäße und das Auftreten der Knochenkörperchen beobachtet. Weiterhin zeigten die RP-Patienten eine große phänotypische Variabilität, was auf bestimmte genetische oder umweltbedingte Modifikatoren hindeuten könnte. Der Beginn der ersten Symptome konnte zwischen der 2. und 3. Dekade beobachtet werden. Im Durchschnitt wurde die Erkrankung zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr der Patienten diagnostiziert.

#### **1.2.3.7 Das Retinitis Pigmentosa Protein FAM161A**

Das humane *FAM161A*-Gen umfasst sieben kodierende Exone, die Teil einer ca. 30 Kb großen genomischen Region des Chromosomenbereichs 2p15 sind (Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Die „kurze“ Isoform mit 6 Exonen und 1983 Basenpaaren kodiert für ein Protein mit 660 Aminosäuren und einer vorhergesagten Molekularmasse von 76 kDa (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Eine seltenere „lange“ Isoform umfasst durch das zusätzliche Exon 3a zwischen Exon 3 und 4 (unter Erhalt des Leserahmens) 56 zusätzliche Aminosäuren (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010). *FAM161A* ist evolutionär konserviert und besitzt ein Paraloges namens *FAM161B*, mit einer Sequenzüberlappung von ca. 30% in der sogenannten UPF0564-Domäne, die charakteristisch für die Proteine der FAM161-Familie ist und sich in den FAM161A-Orthologen verschiedener Säugetiere, sowie in Huhn und Zebrafisch findet (Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Die *FAM161A*-Expression konnte

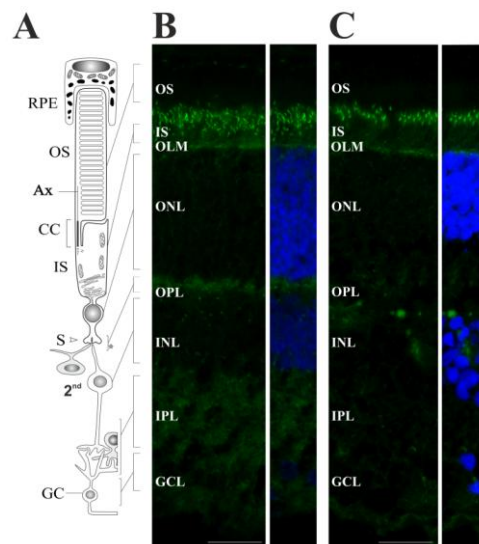
hauptsächlich in der Retina sowie in geringerem Ausmaß in Testis und anderen Geweben, wie z.B. Herz und Leber detektiert werden (Langmann et al. 2010). *In situ* Hybridisierungsexperimente und quantitative RT-PCR-Analysen mit murinen Geweben bzw. RNAs ergaben eine CRX-abhängige *Fam161a*-Expression beginnend etwa zwischen den postnatalen Tagen P5 und P6 (Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Erste Lokalisierungsexperimente in adulter muriner Retina zeigten eine Expression des FAM161A-Proteins im Bereich der Innensegmente der Photorezeptoren und in geringerem Umfang in der äußeren plexiformen Schicht (Langmann et al. 2010). Kürzlich durchgeführte Experimente mit Retinaschnitten aus Paraformaldehyd (PFA)-fixierten Augen adulter Mäuse bestätigten die mFAM161A-Lokalisierung in den Innensegmenten der Photorezeptoren, in der äußeren plexiformen Schicht, sowie in der Ganglienzellschicht durch verschiedene Doppelfärbungen unter Verwendung von Antikörpern gegen murines FAM161A (mFAM161A) und Markerproteine der Photorezeptorzellschicht (Abb. 5A-C, Zach et al. 2012).



**Abb. 5: Lokalisierung von mFAM161A in PFA-fixierten murinen Retinaschnitten.** (A) Fluoreszenzaufnahme eines murinen Retinaschnitts, der mit anti-mFAM161A und DAPI gefärbt wurde. Maßstabsbalken 50 µm. (B-C) Fluoreszenzaufnahme der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren von Doppelfärbungen mit anti-mFAM161A plus Antikörper gegen die Markerproteine RS1 (B) bzw. RP1 (C). Maßstabsbalken 10 µm. OS, outer segments (Außensegmente); IS, inner segments (Innensegmente); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL, inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglienzellschicht). Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

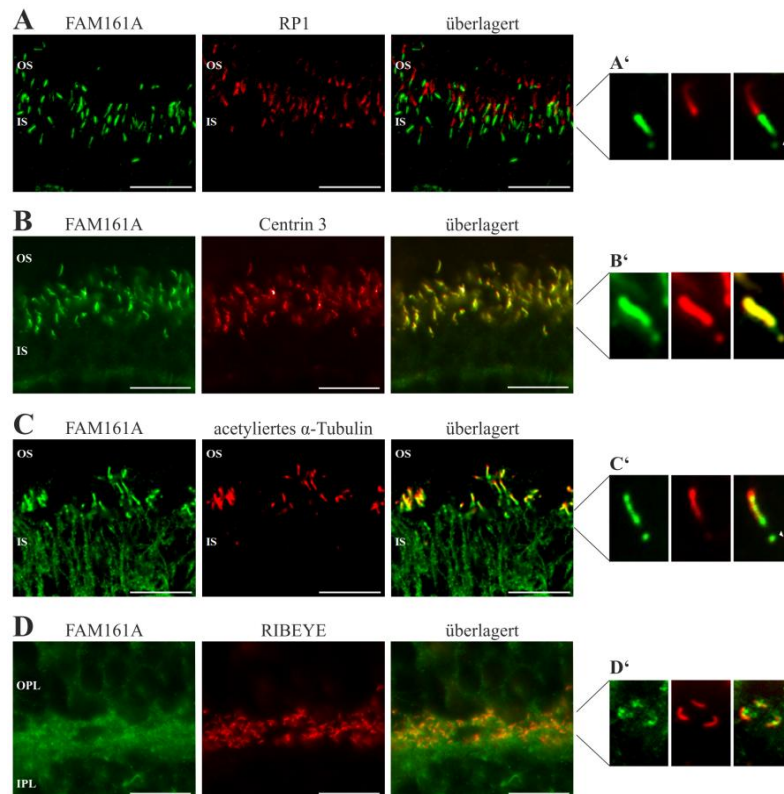
Die Ko-Lokalisierungsexperimente im Bereich der Übergangszone zwischen Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren mit den Markerproteinen RS1 (sekretorisches Membranprotein in Innensegmenten von Zapfen und Stäbchen) sowie RP1 (Außensegment,

Axonem) deuteten auf eine Verteilung des FAM161A-Proteins im Zytoplasma der Innensegmente hin (Zach et al. 2012). Aufgrund mehrerer Studien, die eine Interferenz der PFA-Fixierung mit verschiedenen Antikörpern im Bereich des Verbindungsziliums (CC, „connecting cilium“) zeigten (Horst et al. 1990, Hong et al. 2003), wurden weitere retinale Kryoschnitte von unfixierten murinen und humanen Augen zum immunhistologischen Nachweis der FAM161A-Lokalisation verwendet (Abb. 6, Zach et al. 2012).



**Abb. 6: Lokalisierung von FAM161A in murinen und humanen Retinaschnitten.** (A) Schematische Darstellung der retinalen Schichten. (B) Immunfluoreszenzdarstellung von murinen Retinaschnitten markiert mit anti-mFAM161A-Antikörpern und gegengefärbt mit DAPI. Maßstabsbalken 25  $\mu$ m. (C) Immunfluoreszenzdarstellung von humanem Retinaschnitt gefärbt mit Antikörpern gegen hFAM161A und DAPI. Maßstabsbalken 25  $\mu$ m. OS, outer segments (Außensegmente); IS, inner segments (Innensegmente); OLM, outer limiting membrane (äußere limitierende Membran); ONL, outer nuclear layer (äußere Körnerschicht); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); INL, inner nuclear layer (innere Körnerschicht); IPL inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht); GCL, ganglion cell layer (Ganglienzellschicht); CC, connecting cilium (Verbindungszilium); GC, ganglion cell (Ganglienzelle) Ax, Axonem; RPE, retinales Pigmentepithel. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

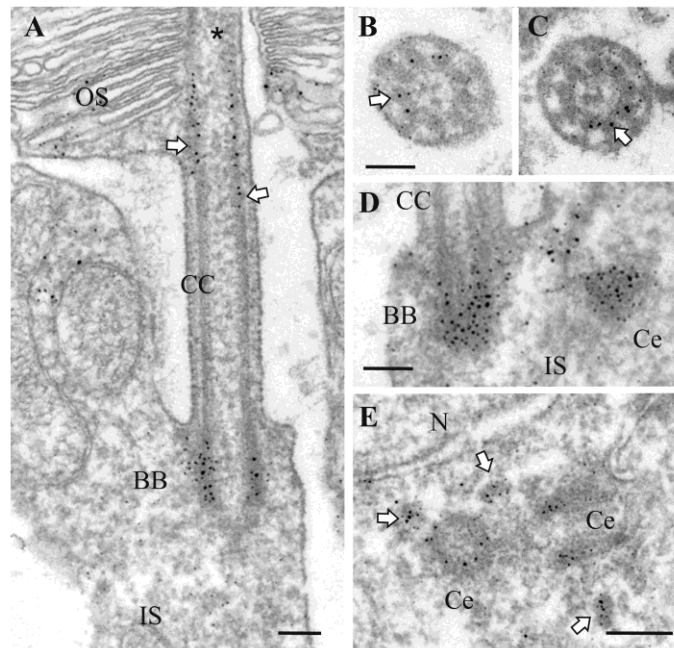
In murinen Retinaschnitten konnte eine FAM161A-Anreicherung in länglichen Strukturen zwischen Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren, im Bereich des Verbindungszilium, gefunden werden (Abb. 6A und B, Zach et al. 2012). Diese Beobachtungen konnten in Experimenten mit Schnitten aus humanem Ursprung bestätigt werden (Abb. 6C, Zach et al. 2012). Detailliertere Aussagen zur sub-zellulären FAM161A-Lokalisation in Photorezeptoren wurden durch Ko-Lokalisierungsexperimente mit Antikörpern gegen Markerproteine verschiedener Photorezeptorteilbereiche und immunelektronenmikroskopische Aufnahmen möglich (Abb. 7-8, Zach et al. 2012). FAM161A besitzt keinerlei Überlappung mit RP1 (Abb. 7A, A'), was auf eine Begrenzung der FAM161A-Verteilung auf den proximalen Teilbereich des Verbindungsziliums hindeutet (Zach et al. 2012). Desweiteren konnte FAM161A durch die nahezu komplette Überlappung mit Centrin-3 dem Verbindungszilium, dem Basalkörper, sowie der anliegenden Zentriole zugeordnet werden (Abb. 7B, B', Zach et al. 2012).



**Abb. 7: Sub-zelluläre FAM161A-Lokalisation in murinen Retinaschnitten im Vergleich zu verschiedenen Markerproteinen.** (A-C) Fluoreszenzaufnahmen des Übergangsbereich zwischen Innen- und Außensegmenten der Photorezeptoren in murinen Netzhäuten, zustande gekommen durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen mFAM161A sowie (A) RP1, (B) RS1 oder (C) acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin. (D) Immunfluoreszenzbilder aus dem Bereich zwischen der äußeren und inneren plexiformen Schicht, erhalten durch Doppelfärbungen mit Antikörpern gegen FAM161A und RIBEYE. Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. (A'-D') Ausschnitte der Abbildungen A-D mit erhöhter Vergrößerung. Die weißen Pfeile deuten auf den Basalkörper- bzw. Zentriolenbereich. OS, outer segments (Außensegmente); IS, inner segments (Innensegmente); OPL, outer plexiform layer (äußere plexiforme Schicht); IPL inner plexiform layer (innere plexiforme Schicht). Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Durch eine teilweise Überlappung mit Fluoreszenzsignalen durch Antikörper gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin konnte auf eine Verbindung von FAM161A mit stabilisierten Mikrotubulistrukturen im Bereich des Axonems geschlossen werden (Abb. 7C, C', Zach et al. 2012). Die FAM161A-Lokalisierung im Bereich der äußeren plexiformen Schicht der Retina wurde mit der Färbung durch Antikörper gegen RIBEYE (CtBP2), einem Protein der Photorezeptor „Ribbon-Synapse“ verglichen (Abb. 7D, D', Zach et al. 2012). Durch eine fehlende Überlappung der Färbungen zeigte sich, dass FAM161A-Proteine keine Komponenten der Photorezeptorsynapse, sondern Bestandteile der postsynaptischen Enden von Neuronen zweiter Ordnung darstellen (Zach et al. 2012). Die immunelektronenmikroskopische FAM161A-Lokalisierung in Photorezeptoren resultierte in der Detektion von FAM161A-Signalen im Bereich der Mikrotubulistrukturen des Verbindungsziliums, des Basalkörpers, sowie in der anliegenden Zentriole (Abb. 8A-D, Zach et al. 2012). Im zentralen Bereich des Verbindungsziliums waren, womöglich aufgrund einer verminderten Epitopzugänglichkeit des Antikörpers, keine Anzeichen auf die Präsenz von FAM161A zu

finden (Abb. 8A, Zach et al. 2012). FAM161A konnte konzentriert an Mikrotubulistrukturen, sowie an Basalkörper und Zentriole detektiert werden (Zach et al. 2012). Im Zytoplasma der Photorezeptorinnensegmente fand sich eine schwache anti-mFAM161A-Immunoreaktivität (Zach et al. 2012). In nicht-zilierten Zellen der Retina konnte FAM161A in Zentrosomen, sowohl an dessen Zentriolen als auch in der perizentriolaren Matrix der Zentriolensatelliten, detektiert werden (Zach et al. 2012).



**Abb. 8: Immunelektronenmikroskopische FAM161A-Lokalisierung in retinalen Photorezeptorzellen.** Elektronenmikroskopische Aufnahmen der anti-mFAM161A-Färbungen in (A) Längsschnitten, (B-C) Vertikalschnitten durch das Verbindungszilium, (D) Schnitten durch die Basis des Ziliums, sowie (E) in Zentrosomen in der äußeren Körnerschicht muriner Photorezeptoren. Maßstabsbalken: A, 200 nm; B und C, 150 nm; D, 100 nm; E, 250 nm. Die weißen Pfeile zeigen auf die Mikrotubulidupletts der Photorezeptoren (A-C), bzw. auf die Zentriolensatelliten von Zellen der äußeren Körnerschicht (E). OS, outer segments (Außensegmente); CC, connecting cilium (Verbindungszilium); BB, basal body (Basalkörper); IS, inner segments (Innensegmente); Ce, centriole (Zentriole). Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Mittels proteomischen Analysen wurde FAM161A in der Zytoskelettfraction des murinen Photorezeptor-Ziliumkomplexes detektiert (Liu et al. 2007). Proteomische Untersuchungen konnten FAM161A als Bestandteil humaner Zentrosomen in der Lymphoblastenzelllinie KE37 identifizieren (Jakobsen et al. 2011). Darüber hinaus wurde FAM161B als physikalischer Interaktionspartner des TACC3-Proteins („transforming acidic coiled-coil“), das im Komplex mit TSC2 („tuberous sclerosis complex 2“) wichtige Aufgaben u.a. im Zentrosom-abhängigen Mikrotubuliumaufbau, in der Kinetochorenanlagerung, oder in der Chromosomenausrichtung spielt, ermittelt (Gómez-Baldó et al. 2010). Die Ergebnisse aus bisher durchgeführten Experimenten deuten zusammenfassend auf eine Beteiligung der FAM161-Proteine an der Mikrotubuliorganisation und an der Zentrosomenbiologie hin und könnten die *FAM161A*-assoziierte Retinitis Pigmentosa als Ziliopathie definieren.

## 2 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Dissertation war es, einen Einblick in die molekularen Pathomechanismen von zwei erblichen Netzhautdegenerationen, der autosomal dominanten Sorsby Fundusdystrophie (SFD) und der autosomal rezessiven Retinitis Pigmentosa-28 (RP28), zu erlangen. Aus der fortgeführten Charakterisierung des seit 1994 mit SFD-assoziierten Proteins TIMP3 und durch die einleitende funktionelle Beschreibung des 2010 erstmals mit RP in Verbindung gebrachten Proteins FAM161A, sowie der entsprechenden zu Grunde liegenden molekularen Veränderungen der jeweiligen Mutationen sollten sich neue Erkenntnisse ergeben, die einen Teil zur zukünftigen Entwicklung neuer Therapieansätze für die bisher nicht heilbaren Erkrankungen beitragen könnten.

### Projekt 1: Sorsby Fundusdystrophie (SFD)

Aufgrund des dominanten Vererbungsmusters der SFD-assoziierten *TIMP3*-Mutationen und den bisher erzielten Erkenntnissen handelt es sich vermutlich eher um eine Zugewinnmutationen („gain of function“), die zu einer bisher unbekannten neuen Funktion der mutierten Proteine führt, als um einen Verlust der wildtypischen TIMP3-Proteinfunktion oder eine Haploinsuffizienz aufgrund der fehlenden funktionellen Kopie des *TIMP3*-Gens. Um diese Annahmen und die Effekte der endogenen S156C-Mutation in TIMP3 zu untersuchen, sollten verschiedene Zell-basierte Experimente mit Fibroblasten- bzw. primären RPE-Kulturen, sowie histologische Untersuchungen des Mausmodells eines S156C-TIMP3-Knockins durchgeführt werden. Zur Untersuchungen der molekularen Konsequenzen verschiedener TIMP3-Punktmutationen wurde darauf abgezielt, sowohl endogenes TIMP3 aus Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>, als auch heterolog in HEK293-EBNA-Zellen exprimierte TIMP3-Mutationsvarianten in verschiedenen Protein-Interaktionsstudien mit möglichen und bekannten EZM-gebundenen TIMP3-Interaktionspartnern einzusetzen.

### Projekt 2: RP28-assoziierte Retinitis Pigmentosa (RP28)

Der autosomal rezessiven, RP28-assoziierten Erkrankung der peripheren Netzhaut liegt sehr wahrscheinlich ein Verlust der Proteinfunktion („loss of function“) zu Grunde. Die vorliegende Arbeit zielte auf eine anfängliche funktionelle Charakterisierung des erst kürzlich entdeckten RP-assoziierten Proteins FAM161A. Dazu wurden Versuche zur Ermittlung der Lokalisation und der Eigenschaften von heterolog exprimiertem FAM161A geplant. Aus der ermittelten Lokalisation und den beobachteten Eigenschaften des Proteins sollten sich

Erkenntnisse zur Funktion des FAM161A-Proteins ergeben. Ein zentrales Ziel zur Beschreibung der FAM161A-Proteinfunktionen stellte die Bestimmung von bisher unbekannten Interaktionspartnern dar. Zur Beantwortung dieser Problemstellung sollte, neben der Durchführung und Validierung eines Hefe-2-Hybrid Ansatzes, den im Vorfeld der vorliegenden Arbeit erhaltenen Hinweisen auf eine mögliche homotypische FAM161A-Interaktion, sowie auf die direkte physikalische Bindung von FAM161A an Mikrotubulistrukturen und das paraloge Protein FAM161B nachgegangen werden.



### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Chemikalie	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
Agarose (Biozym LE)	Biozym, 840004	Agarosegele
Ammoniak-Lösung (25%)	Applichem, A2128	NH <sub>4</sub> OH-Lösung
Ampicillin Natriumsalz	Roth, K029	Antibiotikum
APS (Ammoniumpersulfat)	Applichem, A0834	Acrylamidgele
Bacto™ Agar	BD Biosciences, 214010	LB-Platten
Bacto™ Yeast Extract (Hefextrakt)	BD Biosciences, 212750	LB-Medium, LB-Platten
Borsäure	Merck, 100165	10x TBE
Bromphenolblau Natriumsalz	Sigma-Aldrich, B6131	10x DNA-Auftragspuffer
BSA	Sigma-Aldrich, A2153	RPE-Isolierung
BSA für Restriktionsverdau (10 mg/ml)	NEB, B9001S	DNA-Restriktionsverdau
CaCl <sub>2</sub> (Calciumchlorid)	Roth, A119	verschieden
Coomassie Brilliant Blue G250	Sigma-Aldrich, 27815	Färbelösung
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich, C9008	ECL-Lösung 2
L-Cystein Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, 30120	RPE-Isolierung
DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol)	Invitrogen, D1306	DNA-Färbung
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, 102931	Lösungsmittel
DMSO für die Zellkultur	VWR, A3672	Einfriermedium
dNTP-Set, Natriumsalze (100 mM)	Genaxxon, M3015	PCR, cDNA-Synthese
DTT (Dithiothreitol)	Roth, 6908	Proteinstabilisierung
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, EDS	verschieden
EGTA (Ethylen glycol-bis[2-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma-Aldrich, 03777	verschieden
Entwicklerlösung WB	AGFA, G153	Entwicklung WB
Essigsäure (100%)	Merck, 100063	verschieden
Ethanolamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich, E6133	Antikörperreinigung
Ethanol vergällt	Lager Universität Regensburg	Waschalkohol
Ethanol p.a.	Roth, 9065	verschieden
Ethidiumbromid-Lösung	Applichem, A2273	DNA-Färbung
Fixierlösung WB	AGFA, G354	Fixierung WB
Glucose (D,+, Monohydrat)	Merck, 108342	SOC-Medium
Glutathion (L, reduziert)	Roth, 6382	GST-Elutionspuffer
Glycerin (99,5%)	Lager Universität Regensburg	FRENCH® Press
Glycerin p.a. (87%)	Applichem, A3561	verschieden
Glycin	Merck, 104201	verschiedene Puffer
GTP (Guanosintriphosphat, Natriumsalz)	Sigma-Aldrich, G8877	Mikrotubuliassays
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid, 30%)	Merck, 107209	ECL-Lösung 3
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Schwefelsäure, 96%)	Roth, 4623	ELISA
Hi-Di™ Formamid	AB, 4311320	DNA-Sequenzierung
HCl (37%)	Merck, 100317	verschieden
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Applichem, A1069	verschiedene Puffer
IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)	Applichem, A1008	Expressionsinduktion
Isopropanol p.a.	Merck, 109634	verschieden
Kaliumacetat	Merck, 104820	Puffer
Kanamycin-Sulfat	Sigma-Aldrich, K4000	Antibiotikum
KCl (Kaliumchlorid)	Merck, 104936	verschieden
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, 104873	10x PBS
Luminol Natriumsalz (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich, A4685	ECL-Lösung 1
Lysin (Poly-L, Hydrobromid)	Sigma-Aldrich; P7890	Deckgläschenbeschichtung
Maltose (D, +)	Applichem, A3891	MBP-Elutionspuffer
Methanol	Merck, 106009	WB

Chemikalie	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
MG132	VWR, 474790	Proteasominhibitor
MgCl <sub>2</sub> p.a. (Magnesiumchlorid-Hexahydrat)	Merck, 105833	verschieden
Milchpulver	Roth, T145	WB, ELISA
MnCl <sub>2</sub> (Mangan[II]-Chlorid-Tetrahydrat)	Sigma-Aldrich, M3634	verschieden
MOPS (3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure)	Roth, 6979	Puffer
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat)	Merck, 106580	Puffer
NaCl (Natriumchlorid)	VWR, 27810.364	verschieden
NaN <sub>3</sub> (Natriumazid)	Sigma, S2002	Bakterienwachstumshemmer
Natriumacetat-Trihydrat	Merck, 106267	Puffer
Nocodazol	Applichem, A1999	Mikrotubulidestabilisierung
Nonidet® P-40	Applichem, A1694	TNBN-Puffer
PEG (Polyethylenglycol)	Sigma-Aldrich, P3640	MT-Stabilisierungspuffer
Pepton aus Casein	Roth, 8986	LB-Medium, LB-Platten
PFA (Paraformaldehyd)	Applichem, A3813	Fixierung
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich, P7626	Proteaseinhibitor
PicoGreen® Quant-iT™ dsDNA Reagent	Invitrogen, P7581	DNA-Quantifizierung
PIPES (Piperazin-1,4-bis-[2-ethansulfonsäure])	Applichem, A1079	verschiedene Puffer
L-[2,3,4,5- <sup>3</sup> H]-Prolin, 1 mCi (37 MBq)	Perkin Elmer, NET483001MC	Radioaktives Substrat
Proteasomsubstrate		Proteasomaktivitätstests
Boc-LRR-AMC	Biomol, S-300	
Suc-LLVY-AMC	Biomol, S-280	
Z-LLE-AMC	Biomol, S-230	
Rotiphorese® Gel 40 (37,5:1)	Roth, T802	Acrylamidgele
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, CN30	Detergenz
Sucrose (Saccharose)	Merck, 107651	verschieden
Szintillationsflüssigkeit Unisafe-1	Zinsser Analytic	Cpm-Messungen
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck, 110732	Acrylamidgele
Thymidin	Sigma, T1895	Thymidinblock
Tris (Tris[hydroxymethyl]aminomethan)	Affymetrix, 75825	Puffer
Triton® X-100	VWR, A4975	Detergenz
TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin)	Sigma, T4319	Peroxidasesubstrat
Tween® 20	Applichem, A1389	Detergenz
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid)	Applichem, A1007	Blau-Weiß-Screening
Xylencyanol	Sigma, X4126	DNA-Standard
Zeocin	Invitrogen, 46-0509	Antibiotikum
Ziegenserum	Abcam, ab7481	Blockreagenz
β-Mercaptoethanol	Merck, 805740	Laemmli Probenpuffer

Tab. 1: Chemikalien: Bezugsquellen und Verwendung.

### 3.2 Kit- und Reaktionssysteme

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der eingesetzten Kit- und Reaktionssysteme.

Kit- bzw. Reaktionssystem	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	AB, 4337451	DNA-Sequenzierung
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Komplexinhibitor)	Roche, 11697498001	Proteaseinhibitor
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Promega, E2691	Transfektion
Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, 11668-019	Transfektion
Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit	Cytoskeleton Inc., BK029	Mikrotubulibindung

Kit- bzw. Reaktionssystem	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
NucleoBond® Xtra Midi	Macherey-Nagel, 740410	Isolierung Plasmid-DNA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, 740609	DNA-Reinigung
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, 740588	Isolierung Plasmid-DNA
pGEM®-T Vector System I	Promega, A3600	Klonierung von PCR-Produkten
QIAshredder	Qiagen, 79654	Zellaufschluss, RNA-Isolierung
RNase-Free DNase Set	Qiagen, 79254	RNA-Isolierung
RNeasy Mini Kit	Qiagen, 74104	RNA-Isolierung
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo SCIENTIFIC, 34095	Western Blot
TransIT®-LT1 Transfektionsreagenz	VWR, 731-0028	Transfektion
Tubulin Polymerization Assay Kit	Cytoskeleton Inc., BK011P	Tubulinpolymerisation

Tab. 2: Kit- und Reaktionssysteme: Bezugsquellen und Verwendung.

### 3.3 Beads

Zur Reinigung von Fusionsproteinen (GST, MBP) und zur Durchführung von Immunpräzipitationen (IP) wurden verschiedene Bead-Systeme verwendet (Tab. 3).

Bead	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
Amylose Resin	NEB, E8021	MBP-Fusionsproteine
Anti-Flag® M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich, A2220	Immunpräzipitation
Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow	GE Healthcare, 17-5132-01	GST-Fusionsproteine
Protein A-Sepharose® 4B Fast Flow	Sigma-Aldrich, P9424	Immunpräzipitation

Tab. 3: Beads: Bezugsquellen und Verwendung.

### 3.4 Enzyme

Tabelle 4 zeigt die wichtigsten in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme.

Enzym	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
2x TaqMan Gene Expression MM	AB, 4370074	qRT-PCR
DNA-Endonukleasen	NEB	Restriktionsverdau
EZM-Verdauenzyme		EZM-Verdau
Chondroitinase ABC	Sigma-Aldrich, C2905	
Elastase	Sigma-Aldrich, 45124	
Heparinase III	Sigma-Aldrich, H8891	
Kollagenase A	Roche, 10103586001	
Trypsin	Sigma-Aldrich, T1426	
Papain	Sigma-Aldrich, P3125	RPE-Isolierung
<i>Pfu</i> -Polymerase	Hergestellt von Dr. Ulrike Friedrich (Institut für Humangenetik, Regensburg)	PCR
<i>PfuUltra</i> II Fusion HS DNA Polymerase	Agilent, 600670	<i>in vitro</i> Mutagenese
Protease	Applichem, A3459	Verdau Mausschwänze
RevertAid™ Reverse Transcriptase	Fermentas, EP0442	cDNA-Synthese
T4 DNA-Ligase	NEB, M0202	DNA-Ligation
<i>Taq</i> -Polymerase	Hergestellt von Dr. Ulrike Friedrich (Institut für Humangenetik, Regensburg)	verschieden
Trypsin/EDTA (10x)	PAA, L11-003	Zellkultur

Tab. 4: Enzyme: Bezugsquellen und Verwendung.

### 3.5 Vektoren

Zur molekularen Klonierung wurden verschiedene DNA-Vektoren gebraucht (Tab. 5). Die erhaltenen Klonierungsprodukte konnten für vielfältige Anwendungen, beispielsweise zur Expression von Fusionsproteinen oder zur Überexpression und Lokalisierung von Proteinen in Säugetierzellen, benutzt werden.

DNA-Vektor	Verwendung
pBudCE4.1	Expression (Säugetierzellen)
pcDNA3.1	Klonierung
pCEP4.1	Expression (Säugetierzellen)
pCEP4.1-1D4	Expression (Säugetierzellen)
pCEP4.1-His	Expression (Säugetierzellen)
pEGFP-C1	Expression (Säugetierzellen)
pEGFP-N1	Expression (Säugetierzellen)
pFLAG-CMV-4	Expression (Säugetierzellen)
pGEM-T	Klonierung
pGEX-4T1	Expression (Bakterienzellen)
pGEX-4T3	Expression (Bakterienzellen)
pMAL-c2x	Expression (Bakterienzellen)
pMAL-cxh	Expression (Bakterienzellen)

Tab. 5: DNA-Vektoren und Verwendung.

### 3.6 cDNA-Klone und Plasmide

Zur Vereinfachung der Klonierung von schwer zu amplifizierenden Genen, insbesondere bei Verwendung von sehr langen cDNA-Sequenzen, wurde auf kommerziell erhältliche cDNA-Klone und Plasmide als Ausgangs-DNA für die PCR zurückgegriffen (Tab. 6).

cDNA	Bezeichnung	IMAGE ID	Vektor	Bezugsquelle
<i>FAM161A</i>	DKFZp686O21143Q	6501484	pSPORT1-Sfi	Source BioScience
<i>FAM161B</i>	IRATp970A0180D		pCMV-SPORT6	Source BioScience
<i>HDAC6</i>	pEGFP.N1-HDAC6	40037561	pEGFP.N1	Addgene, #36188
<i>KIF1A</i>	IRAM17L4		pCR-BluntII-TOPO	Source BioScience
<i>MAPK8IP3</i>	IRCBp5005D2110Q	9021121	pCR-XL-TOPO	Source BioScience

Tab. 6: cDNA-Klone: Bezeichnungen und Bezugsquellen.

### 3.7 Antikörper

Primäre Antikörper wurden für diverse immunologische Anwendungen (IP, IHC, ICC, ELISA, WB) genutzt (Tab. 7). Fluoreszenz- bzw. Enzym-gekoppelte, sekundäre Antikörper sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Primärantikörper	Typ	Spezies	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
anti-acetyliertes $\alpha$ -Tubulin	mAK	M	Sigma-Aldrich, T6793	WB, ICC, IHC
anti-F4/80	mAK	R	Acris Antibodies, BM4007S	IHC
anti-Flag® M2	mAK	M	Sigma-Aldrich, F3165	WB
anti-GFAP	pAK	K	Sigma-Aldrich, G9269	IHC

Primärantikörper	Typ	Spezies	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
anti-GFP	pAK	K	Santa Cruz, sc-8334	WB
anti-HA	pAK	K	Invitrogen, 71-5500	WB, ICC
anti-hFAM161A	pAK	K	Sigma-Aldrich, HPA032119	WB, ICC, IHC
anti-hFAM161B	pAK	K	Sigma-Aldrich, HPA019125	WB, ICC, IP
anti-His-Penta	mAK	M	Qiagen, 34660	WB
anti-IBA1	pAK	K	Wako, 019-19741	IHC
anti-Kollagen VI	pAK	K	Abcam, ab6588	IHC
anti-MBP	mAK	M	NEB, E8032	WB
anti-mFAM161A	pAK	K	Eigenproduktion	WB, ICC, IHC
anti-mTIMP3	pAK	K	Eigenproduktion	WB, ELISA
anti-Myc (9E10)	mAK	M	Eigenproduktion	WB, IP
anti-Rho1D4	mAK	M	Geschenk, Robert S. Molday	WB
anti-RIBEYE (CtBP2)	mAK	M	BD Biosciences, 612044	IHC
anti-RP1	pAK	Hu	Geschenk, Eric Pierce	IHC
anti-RPE65	mAK	M	Abcam, ab13826	IHC
anti-RS1	mAK	M	Geschenk, Robert S. Molday	IHC
anti-sFAM161A	pAK	K	Eigenproduktion	WB
anti-V5-Tag	mAK	M	Invitrogen, R960-25	WB, IP
anti- $\alpha$ -Tubulin	mAK	M	Sigma-Aldrich, T9026	ICC
anti- $\beta$ -Aktin	mAK	M	Sigma-Aldrich, A5441	WB
anti- $\gamma$ -Tubulin	mAK	M	Sigma-Aldrich, T6557	ICC, IHC

**Tab. 7: Primärantikörper: Typ, Spezies, Bezugsquellen und Verwendung.** Abkürzungen: mAK, monoklonaler Antikörper; pAK, polyklonaler Antikörper; M, Maus; R, Rat; K, Kaninchen; Hu, Huhn; WB, Western Blot; ICC, Immunzytochemie; IHC, Immunhistochemie; IP, Immunpräzipitation; ELISA, „Enzym Linked Immunosorbent Assay“.

Sekundärantikörper	Spezies	Bezugsquelle	Verwendung
Alexa Fluor® 488	verschieden	Invitrogen	ICC, IHC
Alexa Fluor® 586	verschieden	Invitrogen	ICC, IHC
Alexa Fluor® 594	verschieden	Invitrogen	ICC, IHC
Alexa Fluor® 647	verschieden	Invitrogen	ICC, IHC
Goat Anti-Mouse IgG, Peroxidase Conjugate	M	Calbiochem, 401215	WB
Goat Anti-Rabbit IgG, Peroxidase Conjugate	K	Calbiochem, 401315	WB

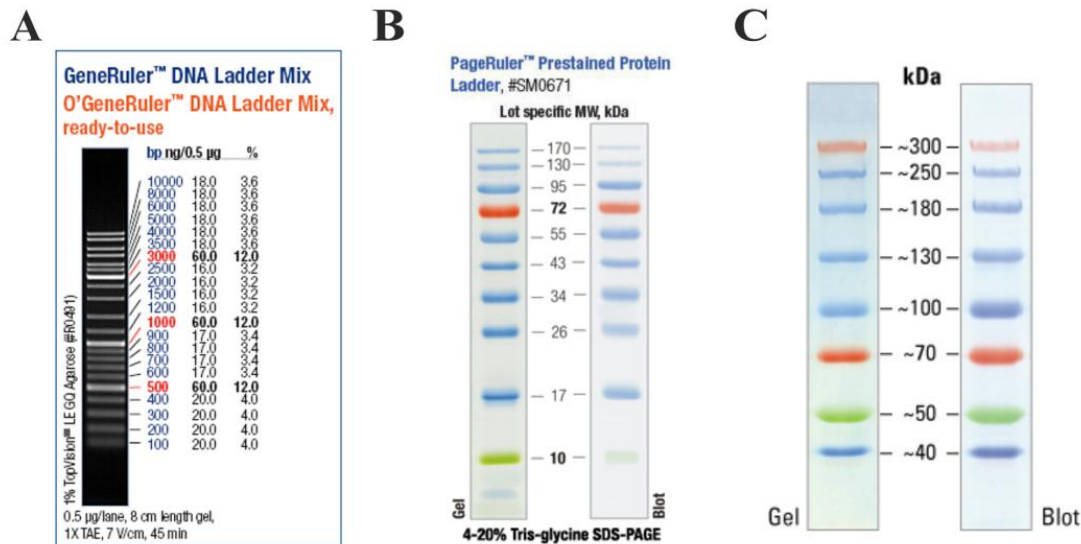
**Tab. 8: Sekundärantikörper: Spezies, Bezugsquellen und Verwendung.** Abkürzungen: M, Maus; K, Kaninchen; ICC, Immunzytochemie; IHC, Immunhistochemie; WB, Western Blot.

### 3.8 Molekularmassenstandards

Zur Abschätzung der ungefähren Größe von DNA- und Proteinmolekülen wurden Molekularmassenstandards (Tab 9) mit charakteristischen Bandenmustern (Abb. 9) verwendet. Zur Herstellung des GeneRuler™ DNA Ladder Mix Gebrauchslösung wurden 100  $\mu$ l des Standards mit 100  $\mu$ l Bromphenolblaulösung, 100  $\mu$ l Xylencyanollösung und 200  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> versetzt.

Molekularmassenstandard	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, SM0332	Größenstandard DNA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Fermentas, SM0671	Größenstandard Protein
Spectra Multicolor High Range Protein Ladder	Fermentas, SM1851	Größenstandard Protein

**Tab. 9: Molekularmassenstandards: Bezugsquellen und Verwendung.**



**Abb. 9: Bandenmuster der verwendeten Molekularmassenstandards.** (A) GeneRuler™ DNA Ladder Mix. (B) PageRuler™ Prestained Protein Ladder. (C) Spectra Multicolor High Range Protein Ladder.

### 3.9 Oligonukleotide

Die benutzten Oligonukleotid-Primer wurden, falls nicht anders angeben, in Konzentrationen von 100 µM von der Firma Metabion (Martinsried) bezogen.

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
Genotypisierung (TIMP3)	
pGKneoR	ATGTGGAATGTGTGCGAGG
timp3ex3F	TTCAGTAAGATGCCCCACG
timp3-KI-F2	CAGTAGACACTCAATGGGAGC
timp3-KI-R	CAACTCCATAGACAGCACAGAC
timpex4R	TACATCTTGCCTTCATACACG
Klonierung (FAM161A/B)	
FAM161A_Ex3a_EcoRI_F	ggtGAATTTCGAAATCCCTTGAGGAAAAGA
FAM161A_Ex3a_SalI_R	ggtGTCGACCTGAGCTCCTTACCCTGG
Fam161a_F_BamHI	GGATCCAGCCTTCTCCTGTCTGCAAAT
Fam161a_R_SalI	GTCGACGAGGCACAGGTTTGGCTTTA
FAM161A-F10_EcoRI	tctGAATTCTAGAGCCCAGGAGCATTTACA
FAM161A-F12_EcoRI	tctGAATTCTAAGAAATTCGAGCCAATCC
FAM161A-F12_NotI	tctGCGGCCGCATGGCCACCTCCCACCGAGT
FAM161A-F2a_EcoRI	tctGAATTCTATGGCCACCTCCCACCGAGT
FAM161A-F3_KpnI	tctGGTACCgCTCGGAGGCGGGGCGATG
FAM161A-F4_XhoI	CTCGAGGCTGTAAAGATACTGGCTTCC
FAM161A-F8_EcoRI	tctGAATTCTAAAGAATGGGTGCCACAA
FAM161A-R3_XhoI	tctCTCGAGCAGTGTGATTCTTCAACAGAT
FAM161A-R4_EcoRI	GAATTCTCAGTGTGATTCTTCAACAGAT
FAM161A-R5_KpnI	tctGGTACCTCAGTGTGATTCTTCAACAGA
FAM161A-R6_XhoI	tctCTCGAGTTTCGTTTCTTCTTCTTTTTCAG
FAM161A-R7_XhoI	tctCTCGAGTCTAGTTCTCGTTGGTATTCTCTCA
FAM161A-R8_XhoI	tctCTCGAGAGCTGTGTCCTAAGGTTTCGAT
FAM161A-R9_XhoI	tctCTCGAGTGTTCAAGACACCTGGGGT
FAM161B_KpnI_F	GGTACCGAAATGACCGTGGGGAGGCC
FAM161B_XhoI_R	CTCGAGGCAAGTGATACGAGATTTTCTG
mFAM161A_F3_SalI	attgGTCGACAAATCCTTGACACCCAAGAT
mFAM161A_R2_NotI	gattGCGGCCGCTCATTCTCCAGAATTTTCTTC
sFAM161A_F_EcoRI	GAATTTCGGAAGAGAGCAAGCCACAAG
sFAM161A_R_XhoI	CTCGAGCCTGCCAATGGATTCTGTTT

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
Klonierung (TIMP3)	
mTimp3-NotI-F	GCGGCCGCATGACTCCCTGGCTTGGGCT
mTimp3-NotI-R	GCGGCCGCTGGGATCTGTGGCGTTGCTGA
Mutagenese (FAM161A)	
FAM161A_mutP239A_F	GCCCACAATTACAGTAGCGGAGCCTTTTCAAATG
FAM161A_mutP239A_R	CATTTGAAAAGGCTCCGCTACTGTAATTGTGGGC
FAM161A_mutP241A_F	CCACAATTACAGTACCGGAGGCTTTTCAAATGATGATAAG
FAM161A_mutP241A_R	CTTATCATCATTTGAAAAGCCTCCGGTACTGTAATTGTGG
FAM161A_mutP288A_F	GAGCCAATCCAGTTGCTGCATCTGTCTTTC
FAM161A_mutP288A_R	GAAAGACAGATGCAGCAACTGGATTGGCTC
FAM161A_mutP324A_F	CTCTTTTGGCCTCACAAAAGGCCTTTAAATTTATAGCAAGGGAG
FAM161A_mutP324A_R	CTCCCTTGCTATAAATTTAAAGGCCTTTGTGAGGCCAAAAGAG
FAM161A_mutP327A_F	CTCACAAAAGCCATTTAAAGTTATAGCAAGGGAGGAACAG
FAM161A_mutP327A_R	CTGTTCCCTCCCTTGCTATAAATTTAAATGGCTTTTGTGAG
FAM161A_mutP361A_F	GATTTAAAGCCAGACCCATTGCTCGATCTACTTATGGTTC
FAM161A_mutP361A_R	GAACCATAAGTAGATCGAGCAATGGGTCTGGCTTTAAATC
FAM161A_mutP399A_F	GAACTCATCTCCTCTGCTTGTAGGTCAGCTTG
FAM161A_mutP399A_R	CAAGCTGACCTACAAGCCAGAGGAGATGAGTTC
Mutagenese (TIMP3)	
mTIMP3-G166C_F	TGCATCCGGCAGAAGTGTGGCTACTGCAGCT
mTIMP3-G166C_R	AGCTGCAGTAGCCACACTTCTGCCGGATGCA
mTIMP3-G167C_F	ATCCGGCAGAAGGGTTGCTACTGCAGCTGGT
mTIMP3-G167C_R	ACCAGCTGCAGTAGCAACCCTTCTGCCGGAT
mTIMP3-Y168C_F	GGCAGAAGGGTGGCTGCTGCAGCTGGTACCG
mTIMP3-Y168C_R	CGGTACCAGCTGCAGCAGCCACCCTTCTGCC
mTIMP3-S170C_F	AAGGGTGGCTACTGCTGCTGGTACCGAGGAT
mTIMP3-S170C_R	ATCCTCGGTACCAGCAGCAGTAGCCACCCTT
mTIMP3-S183C_F	CCAGACAAGAGCATCTGCAACGCCACAGACC
mTIMP3-S183C_R	GGTCTGTGGCGTTGCAGATGCTCTTGTCTGG
qRT-PCR	
Timp3-Exon5-RT-F	CACGGAAGCCTCTGAAAGTC
Timp3-Exon5-RT-R	TCCCACCTCTCCACAAAGTT
ATPase_F	GGCACAATGCAGGAAAGG
ATPase_R	TCAGCAGGCACATAGATAGCC
RT-PCR	
GUSB3	ACTATCGCCATCAACAACACACTCACC
GUSB5	GTGACGGTGATGTCATCGAT
Sequenzierung (FAM161A/B)	
FAM161A-F4	GAAGGCTGCCCACATAGAAA
FAM161A-F5	AAGAAATTCCGAGCCAATCC
FAM161A-F6	GCAGACATCGAAGCAGATGA
FAM161A-F7	AGGTTAGGTGCCCAACTCCT
FAM161B_F	TGAGGTGTGGCTCCACAAGG
FAM161B_F2	GCCAAGATCTCCAAGCAGAA
FAM161B_F3	CCCTCTCTGCCAACACTCTC
Sonstige	
Random Hexamer	(Fermentas, SO142)
Vektorprimer	
M13F	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC
M13R	TCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCT
pBud_R	ACCACAAC TAGAATGCAGTGA
pCEP4_new-F	GGACTTTCCAAAATGTCGTAATAA
pCEP4_new-R	CAAATAAAGCAATAGCATCACAAAT
pcDNA3-F2	CACTGCTTACTGGCTTATCG
pcDNA3-R	CGATAAGCCAGTAAGCAGTG
pEGFP-F	CATGGTCCTGCTGGAGTTCGTG
pFLAG-F	CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
pFLAG-R	TTATTAGGACAAGGCTGGTG
pGEX_F	GGGCTGGCAAGCCACGTTTG
pGEX_R	CCTCTGACACATGCAGCTCCCG
pMalE	GGTCGTACAGCTGTCGATGAAGCC

Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'
RT-pCAG-GFP-EGFP_R	AAGTCGTGCTGCTTCATGTG
T7	AATACGACTCACTATAG
Y2H-Validierung	
C12Orf41_F_EcoRI	gggGAATTCGGAAAAAGATGTCCCAATGC
C12Orf41_K_EcoRI_F	tctGAATTCGGTTTTGTTATGAACAGGA
C12Orf41_K_SalI_R	tctGTCGACGTTCCCCAACTATCAACTA
C12Orf41_R_XhoI	gggCTCGAGCTGAAGCTCAGCAGCACTCA
DCTN1_F_EcoRI	gggGAATTCGACAAGGAGATGGCTGAAGA
DCTN1_R_XhoI	gggCTCGAGGTACACCAGTCCAGCAGCAA
IFT20_EcoRI_F	cccGAATTCATGGCCAAGGACATCCTG
IFT20_XhoI_R	cccCTCGAGTCAACCCGATACCTTTCTAGC
KIF1A_EcoRI_F_Neu	cccGAATTCGCAGACACCTACGTCAATGGC
KIF1A_F_EcoRI	GAAATTCGTGGACTGGGCCTTCGCC
KIF1A_F_SalI	GTCGACCACAGAGATGGCCGGGGCTT
KIF1A_F_Seq1	GGAGGACCTCTCCAAGCTG
KIF1A_F_Seq2	GCTGCAATGCTGTCATCAA
KIF1A_F_Seq3	TTCATCAAGGAGGAGCACTG
KIF1A_F_Seq4	AGTGTGAGCTGGCGCTCT
KIF1A_F_Seq5	GCAATCGTCAGCGAGAAGG
KIF1A_F_Seq6	GGAGGTGACCAAGTCCTTCA
KIF1A_F_Seq7	CCGGACCTTTTACCAATTTGA
KIF1A_F_Seq8	TGCAGGAGGTGGAGAAGACT
KIF1A_F_Seq9	ACTCCAAGAAGCTCCCTTCC
KIF1A_R_BamHI	GGATCCGACCCGCATCTGGGCAGACC
KIF1A_R_EcoRI	GAAATTCCTTTGGGAGAGAATACGCC
KIF1A_R_Seq	CGTTGATCCGAGAGAAGAGG
KIF1A_XhoI_R_Neu	cccCTCGAGCAGCAGGTCTGGGTGGCAG
KIF21B_BamHI_F	cccGGATCCATGTCTGAGCGGGTGGCA
KIF21B_EcoRI_R	cccGAATTCGCGGGGCCGAGTGGGAGG
KIF3A_EcoRI_F	cccGAATTCACCATGATGTGTGCAAATATT
KIF3A_FL_F_EcoRI	GAAATTCATGCCGATCAATAAATCAGAGAA
KIF3A_FL_R_KpnI	GGTACCGATTACTGCAGTAAAGAGTCAATTACAGT
KIF3A_XhoI_R	cccCTCGAGTTACTGCAGTAAAGAGTCAATTACAGT
KIF3A_Seq1_F	CTGCAAGACCTATTATTGATTCTG
KIF3A_Seq2_F	TGGGGAAGCTCCATCTTGTA
KIF3A_Seq3_F	TCCCCAGACAAGATGATTGA
KIF3A_Seq4_F	GGGAGCTTCGACTTCAGATG
KLC2_BamHI_F	cccGGATCCATGGCCATGATGGTGTTC
KLC2_EcoRI_R	cccGAATTCCTTGTACCAGCTGCCGT
MAPK8IP3_BglII_F	cccAGATCTGATGATGGAGATCCAGATGGA
MAPK8IP3_F_EcoRI	gggGAATTCGCGATGATGGAGATCCAGATG
MAPK8IP3_KpnI_R	cccGGTACCCTTCACTCGGGGGTGTAGG
MAPK8IP3_R_XhoI	gggCTCGAGTCGACAGCTCATGGTACAGG
MAPK8IP3_Seq1_F	TGAACGTGCTGGAGAACCTA
MAPK8IP3_Seq2_F	ACCACTGGCACCTGAGTGAC
MAPK8IP3_Seq3_F	GACCTCCTAGGGGAGTTCTCA
MAPK8IP3_Seq4_F	TCCGTCCAGGAGAAGAAGAA
MAPK8IP3_Seq5_F	GCTGGGAATGGAGTCAAGC
MAPK8IP3_Seq6_F	ACAGAGGAGGCCACAGAGG
MAPK8IP3_Seq7_F	GGTGTGGCTACAAGAACAAGG
MAPK8IP3_Seq8_F	GCGATGCCGTGAAGTTCT
SPATA13_EcoRI_F	cccGAATTCGGGGTCAGCTTGTATGGGACC
SPATA13_XhoI_R_2	cccCTCGAGTCATTTCCGGAAGGGGGTG
SPATA13_XhoI_R_Neu	cccCTCGAGCAGCTTGCGCTTGCGCTC

**Tab. 10: Oligonukleotide: Name und Sequenz.** Kursiv geschriebene Nukleotide entsprechen den jeweiligen Erkennungssequenzen der angegebenen Restriktionsenzyme. Klein dargestellte Nukleotide stellen zusätzliche Überhänge zur verbesserten Bindungsfähigkeit der Restriktionsenzyme an die Erkennungssequenzen dar. Unterstrichene Nukleotide der Mutageneseprimer heben die jeweiligen Nukleotidaustausche hervor. F, Forward (Vorwärts); R, Reverse (Rückwärts).



### 3.10 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge (c)	Bezugsqu., Art.-Nr.
1x Laemmli Probenpuffer pH 6,8 (reduzierend)	Tris Glycin Bromphenolblau SDS $\beta$ -Mercaptoethanol	40 mM 8% 0,08% 1,6% 2%	
10x PBS pH 7,4 (1 l)	NaCl KCl $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	80 g 2 g 14,4 g 2,4 g ad 1 l	
10x PCR-Puffer (15 mM $\text{MgCl}_2$ )			
10x SDS-PAGE-Laufpuffer (5 l)	Glycin Tris SDS $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	720 g 150 g 50 g ad 5 l	
10x Towbin-Puffer pH 8,7 (500 ml)	Tris Glycin	15,2 g (250 mM) 72 g (1,9 M)	
5x BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Buffer			AB, 4336697
5x Laemmli-Probenpuffer pH 6,8 (reduzierend, 30 ml)	Tris (1 M) Glycerin (87%) Bromphenolblau SDS $\beta$ -Mercaptoethanol $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	6 ml (200 mM) 13,8 ml (40%) 120 mg (0,4%) 2,4 g (8%) 3 ml (10%) ad 30 ml	
5x TBE pH 8,0 (4 l)	Tris Borsäure EDTA-Lösung (0,5 M) $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	216 g 110 g 80 ml (10 mM) ad 4 l	
Antikörperlösung ELISA	PBS Milchpulver Tween 20	1x 0,3% 0,005%	
Antikörperlösung ICC/IHC	PBS Ziegenserum TritonX-100 (20%) $\text{NaN}_3$ (1. Antikörper) DAPI (2. Antikörper)	1x 2,5% 0,1% 0,02% 1:800	
Antikörperlösung WB	PBS Milchpulver $\text{NaN}_3$ (1. Antikörper)	1x 3% 0,02%	
Blocklösung ELISA	PBS Milchpulver Tween 20	1x 3% 0,05%	
Blocklösung ICC/IHC	PBS Ziegenserum Triton X-100	1x 10% 0,3%	
Blocklösung WB	PBS Milchpulver	1x 3%	
Bromphenolblaulösung	Bromphenolblau Glycerin 87% $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	0,05 g 20 ml ad 50 ml	
Coomassie-Entfärbelösung (1 l)	Essigsäure Ethanol (p.a.) $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$	100 ml (10%) 300 ml (30%) 600 ml	

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge (c)	Bezugsqu., Art.-Nr.
Coomassie-Färbelösung (1 l)	Coomassie Essigsäure Ethanol (p.a.) H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2,5 g (0,25%) 100 ml (10%) 300 ml (30%) 600 ml	
CP-Puffer pH 7,5 (Lysepuffer) (12,5 ml)	Tris (1 M) NaCl (5 M) EDTA (0,5 M) Komplexinhibitor H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	250 µl (20 mM) 500 µl (200 mM) 25 µl (1 mM) 500 µl (1:25) ad 12,5 ml	
DAPI-Lösung		0,2 mg/ml	
Dialysepuffer MT-Bindungstests			
	A HEPES pH 7,0 MgCl <sub>2</sub>	80 mM 5 mM	
	B PIPES pH 6,8 EGTA MgCl <sub>2</sub>	80 mM 1 mM 1 mM	
	C PIPES pH 6,8 EGTA MgCl <sub>2</sub> DTT H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	24,2 g (80 mM) 0,38 g (1 mM) 0,2 g (1 mM) 0,154 g (1 mM) ad 1 l	
ECL-Lösung 1 (200 ml)	Luminol 0,1 M Tris/HCl pH 8,6	50 mg (0,25 mg/ml) 200 ml	
ECL-Lösung 2 (10 ml)	<i>p</i> -Coumarinsäure DMSO	11 mg (1,1 mg/ml) ad 10 ml	
ECL-Lösung 3	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	35%	
Fluorescent Mounting Medium			Dako, S3023
G-PEM-Puffer pH 6,9	PIPES EGTA MgCl <sub>2</sub> GTP	80 mM 1 mM 1 mM 1 mM	
GST-Elutionspuffer pH 8,0 (5 ml)	Tris Glutathion (L, red.) H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	50 mM 30,7 mg (20 mM) ad 5 ml	
GST-Lysepuffer (20 ml)	10x PBS Triton X-100 (20%) Komplexinhibitor H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2 ml 1 ml (1%) 400 µl (1:25) 16,6 ml	
Laird's Puffer (50 ml)	NaCl (1 M) Tris (1 M, pH 8,3) EDTA (0,5 M, pH 8,0) H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	10 ml (200 µM) 5 ml (100 µM) 0,5 ml (5 mM) 34,5 ml	
Lysepuffer für Sonifikation pH 7,0	HEPES MgCl <sub>2</sub> EGTA GTP PMSF (10 mg/ml) Komplexinhibitor	20 mM 2 mM 1 mM 0,5 mM 1:100 1:100	
MBP-Elutionspuffer pH 7,5	Tris Maltose NaCl EDTA	20 mM 10 mM 200 mM 1 mM	
Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer	HEPES (1 M) PFA (4%) Triton X-100 (20%) Sucrose (18%) EGTA (0,1 M) MgCl <sub>2</sub> (1 M) PEG (50 %) H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	5 ml (100 mM) 25 ml (2%) 1,25 ml (0,5%) 11 ml (4%) 2 ml (4 mM) 50 µl (1 mM) 4 ml (4%) 1,7 ml	
NEB Reaktionspuffer 1-4			NEB, B7001-7004S

Puffer/Lösung	Zusammensetzung	Menge (c)	Bezugsqu., Art.-Nr.
PEM-Puffer pH 6,9	PIPES	80 mM	
	EGTA	1 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
Roti®-Liquid Barrier Marker			Roth, AN92.1
Roti®-Quant			Roth, K015
Sammelgelpuffer pH 6,8 (200 ml)	Tris	12,1 g (0,5 M)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 200 ml	
TFB1-Puffer (200 ml)	Kaliumacetat	0,59 g (30 mM)	
	MnCl <sub>2</sub>	1,98 g (50 mM)	
	CaCl <sub>2</sub>	2,22 g (100 mM)	
	Glycerin (100%)	34,5 ml (15%)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 200 ml	
TFB2-Puffer (50 ml)	MOPS	0,1 g (10 mM)	
	CaCl <sub>2</sub>	0,42 g (75 mM)	
	KCl	0,04 g (10 mM)	
	Glycerin (100%)	8,62 ml (15%)	
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound			Hartenstein, TTEK
TNBN-Puffer pH 8,0	Tris	50 mM	
	NaCl	200 mM	
	β-Mercaptoethanol	15 mM	
	Nonidet P-40	0,1% (v/v)	
Trenngelpuffer pH 8,8 (500 ml)	Tris	90,855 g (1,5 M)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 500 ml	
Tubulin-Glycerin-Puffer pH 7,0	PIPES	80 mM	
	EGTA	1 mM	
	MgCl <sub>2</sub>	1 mM	
	Glycerin	60%	
Xylencyanollösung	Xylencyanol	0,05 g	
	Glycerin (87%)	20 ml	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 50 ml	

**Tab. 11: Puffer und Lösungen: Zusammensetzungen, Mengen, Endkonzentrationen und Bezugsquellen.**

### 3.11 Kultur- und Einfriermedien

Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der Medien zur Kultivierung, Transfektion bzw. Kryokonservierung der in dieser Arbeit kultivierten Zelllinien, sowie die Kultur- und Transformationsmedien der benutzten Bakterienstämme.

Medium	Zusammensetzung	Menge (c)	Hersteller, Art.-Nr.
COS-7-Kulturmedium (500 ml)	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	445 ml	PAA, A15-151
	FBS	50 ml (10% v/v)	
	Penicillin/Streptomycin	5 ml (1% v/v)	
Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen (500 ml)	Kulturmedium (10% FCS)	400 ml	PAA, A15-151
	FBS	50 ml (20% v/v)	
	DMSO	50 ml (10% v/v)	
HEK-Kulturmedium (500 ml)	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	440 ml	PAA, E15-810
	FBS	50 ml (10% v/v)	PAA, A15-151
	Penicillin/Streptomycin	5 ml (1% v/v)	PAA, P11-010
	Geneticindisulfat (G418)-Lösung	5 ml (500 µg/ml)	PAA, P11-012
LB-Medium (1 l)	Pepton	10 g (1% w/v)	
	Hefeextrakt	5 g (0,5% w/v)	
	NaCl	10 g (1% w/v)	
	Agar (nur für Platten)	15 g (1,5% w/v)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> autoklavieren	ad 1 l	
Antibiotika	Ampicilin (100 mg/ml)	1 ml (100 µg/ml)	

Medium	Zusammensetzung	Menge (c)	Hersteller, Art.-Nr.
	Zeocin (100 mg/ml)	300 µl (30 µg/ml)	
	Kanamycin (10 mg/ml)	3 ml (30 µg/ml)	
RPE-Kulturmedium (500 ml)	DMEM/Ham's 12	437,25 ml	PAA, E15-813
	FBS	50 ml (10% v/v)	PAA, A15-151
	Penicillin/Streptomycin	5 ml (1% v/v)	PAA, P11-010
	Insulin/Transferin	250 µl (0,05% v/v)	Invitrogen, 41400
	nicht essentielle Aminosäuren	5 ml (1% v/v)	PAA, M11-003
	HEPES (1 M)	2,5 ml (0,5% v/v)	PAA, S11-001
SOC-Medium (1 l)	Pepton	20 g (2%)	
	Hefeextrakt	5 g (0,5%)	
	NaCl	0,5 g (10 mM)	
	KCl	0,186 g (2,5 mM)	
	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	ad 1 l	
	pH 7,0; autoklavieren		
	Glukose (1 M, steril filtriert)	20 ml (20 mM)	
Transfektionsmedium Lipofectamin™ (500 ml)	Opti-MEM® Reduced Serum	500 ml	Invitrogen, 11058021
Transfektionsmedium TransIT®, FuGene® (500 ml)	DMEM High Glucose (4,5 g/l)	500 ml	PAA, E15-810

Tab. 12: Medien: Zusammensetzungen, Mengen und Endkonzentrationen.

### 3.12 Zelllinien und Bakterienstämme

Tabelle 13 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien, sowie prokaryotischen Bakterienstämme (*Escherichia coli*).

Zelllinie/Bakterienstamm	Eigenschaften/Herkunft	Verwendung
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) DH5α	Nuklease-defizient	Klonierung
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) BL21 (DE3)	Protease-defizient	Proteinexpression
HEK293-EBNA	embryonale Nierenzellen	Proteinexpression
COS-7	Nierenfibroblasten	Proteinlokalisierung
LLC-PK1	Nierenepithelzellen	Proteinlokalisierung
Fibroblasten	murines Lungengewebe	zellbasierte Assays
Primäre RPE-Zellen	murines RPE	zellbasierte Assays

Tab. 13: Zelllinien und Bakterienstämme: Eigenschaften, Herkunft und Verwendung.

### 3.13 Mauslinien

Unter anderem für fluoreszenzmikroskopische Lokalisierungsstudien retinaler Proteine wurden Wildtypmäuse der Linien CD1 (Albino) und C57BL/6 verwendet. Zusätzlich standen verschiedene *Timp3*-Knockin (KI)-Mäuse mit der heterozygoten bzw. homozygoten Punktmutation S156C (Weber et al. 2002), sowie *Timp3*-Knockout (KO)-Tiere (Janssen et al. 2008) für Lokalisierungsexperimente und zellbasierte Assays zur Verfügung.

Mauslinie	Genotyp	Verwendung
C57BL/6-Wildtyp	WT	Lokalisierung
CD1-Wildtyp	WT	Lokalisierung
<i>Timp3</i> -Knockin (S156C)	<i>Timp3</i> <sup>S156C/+</sup>	Fibroblasten-Isolierung, IHC, EM

Mauslinie	Genotyp	Verwendung
<i>Timp3</i> -Knockin (S156C)	<i>Timp3</i> <sup>S156C/S156C</sup>	Fibroblasten-Isolierung, IHC, EM
<i>Timp3</i> -Knockout	<i>Timp3</i> <sup>-/-</sup>	Fibroblasten-Isolierung, IHC, EM

**Tab. 14: Mauslinien: Genotypen und Verwendung.** IHC, Immunohistochemie; EM, Elektronenmikroskopie.

### 3.14 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15 zeigt einen Überblick der verbrauchten Materialien.

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle, Art.-Nr.	Verwendung
0,5 ml Cups	Sarstedt, 72.699	verschieden
1,5 ml Cups	Sarstedt, 72.706.400	verschieden
10 µl Filterspitzen	Biozym, 770020	verschieden
10 µl Pipettenspitzen	VWR, 613-1068	verschieden
100 µl Filterspitzen	Biozym, 770100	verschieden
100 µl Pipettenspitzen	VWR, 613-1066	verschieden
1000 µl Filterspitzen	Biozym, 770600	verschieden
1000 µl Pipettenspitzen	VWR, 613-1062	verschieden
12-Well Zellkulturplatten	Corning, 3512	Zellkultur
2 ml Cups	Sarstedt, 72.695.400	verschieden
24-Well Zellkulturplatten	BD Bioscience, 353047	Zellkultur
6-Well Zellkulturplatten	Corning, 3506	Zellkultur
96-Well Mikroplatte (schwarz)	VWR, 736-2033	Fluoreszenzmessung
96-Well Zellkulturplatten	Sarstedt, 83.1835	Zellkultur
Combitips® 0,5 ml	VWR, 613-3519	verschieden
Combitips® 1 ml	VWR, 613-3520	verschieden
Combitips® 5 ml	VWR, 613-3522	ELISA
Deckgläschen (12 mm Ø)	VWR, 631-1577	ICC
Deckgläschen (24 x 50 mm)	VWR, 631-1574	IHC
Dialysemembran (MWCO 10 kDa)	Roth, E868.1	Dialyse
Einmalhandschuhe Green Nitrile	KIMTECH, 99853	verschieden
Einmalhandschuhe Nitrile	VWR, 112-2373	Agarosegelelektrophorese
Einmalküvetten	Sarstedt, REF 67.742	Bradford, OD-Messung
Einmalskalpelle No. 11/22	Feather, No. 11/22	Agarosegel, RPE-Isolierung
Falcon Tube 15 ml	Sarstedt, 62.554.502	verschieden
Falcon Tube 50 ml	Sarstedt, 62.547.254	verschieden
Fotofilme AGFA CRONEX 5 (13 x 18 cm)	BW Plus, 11000	Western Blot
HiTrap NHS-activated HP	GE Healthcare, 17-0716-01	Antikörperreinigung
Kryoröhrchen	Sarstedt, 72.380.007	Kryokonservierung
Matrixpipettenspitzen	Thermo Scientific, 7431	Taq-Man
MicroAmp® Optical 384-Well Platte	AB, 4326270	Taq-Man
MicroAmp® Optical adhesive films	AB, 4311971	Taq-Man
Objektträger	VWR, 631-1349	ICC, IHC
Pasteurpipetten	Uni Regensburg, 6121720	Zellkultur
PCR Cups	Biozym, 710970	PCR, Sequenzierung
Petrischalen	Greiner bio, 633180	LB-Platten
PVDF-Membran Immobilon-P	Roth, T831.1	Western Blot
Serologische Pipetten	Sarstedt, 86.1254.001	Zellkultur, Bakterienkultur
SigmaPrep™ Spin Column	Sigma-Aldrich, SC1000	Zentrifugationssäulchen
Sterilfilter (Porengröße: 0,22 µm)	Thermo Scientific, 190-2520	Sterilfiltration
Whatman® 3MM	Roth, 4926.1	Western Blot
Zellkulturschalen 6 x 2 cm	Sarstedt, 83.1801	Zellkultur
Zellkulturschalen 10 x 2 cm	Sarstedt, 83.1802	Zellkultur
Zellschaber	Neolab, C-8021	Zellernte, EZM-Ernte

**Tab. 15: Verbrauchsmaterialien: Bezugsquellen und Verwendung.**

### 3.15 Glaswaren

Die verwendeten Glaswaren wurden von der Firma Schott (Mainz) bezogen.

### 3.16 Geräte und Software

Verwendete Geräte und Softwareprogramme sind in Tabelle 16 bzw. 17 aufgeführt.

Gerät	Hersteller, Serien-Nr.	Verwendung
7900 HT Fast real time PCR System	AB, 279001451	Taq Man
Abi3130xl Genetic Analyser	AB, 17211-015	DNA-Sequenzierung
Autoklav V-150	Systec, 0512	Autoklavieren
BMG Fluostar Optima	BMG Labtech, 413-1118	Fluoreszenzmessung, ELISA
Brutschrank Hera Cell, CO <sub>2</sub>	Kendro Heraeus, 40231356	Zellkultur
Brutschrank Modell 400	Memmert, e402.0148	Anzucht <i>E. coli</i> (Platten)
Dark Hood DH 30/32	Biostep, 320-19-00/0512-50	Dokumentation Agarosegele
Eismaschine AF 100	Scotsman, DA 23861 31	Eis
Elektrophoresekammer Blue Marine 200	Serva, 5030	Agarosegelelektrophorese
Elektrophoresekammer Mini-Protean® 3 Cell	Biorad, 67S/26715	SDS-PAGE (klein)
French Pressure Cell Press	Thermo Spectronic, 21PD339001	Zelllyse <i>E. coli</i>
Kältemikrotom Leica CM1850	Leica, 6679	Kryoschnitte
Leuchtplatte Rex Gr.2	Rex Meßinstrumentebau	Visualisierung SDS-Gelen
Magnetrührer VMS-A S40	VWR, 01.447717	verschieden
Mikroskope		
Axioskop 2 MOT Plus	Zeiss, 3305000291	Fluoreszenzmikroskopie
Mikroskop Leica DM IL	Leica, 521227/269219	Lichtmikroskopie
Stereomikroskop Nikon SMZ745	Nikon, 1517854/1083827	Präparationsplatz
Mikrowelle Daewoo KOR-6D07	Daewoo, DJ05Y00597	Agarosegele
Milli-Q-Synthesis	Millipore, F5EN74758E	H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>
Reinstwasseranlage		
ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop®)	NanoDrop, 2754	DNA- und RNA-Messung
Netzgerät Blue Power 500	Serva, BP500-2005	SDS-PAGE, Western Blot
Netzgerät Blue Power Plus	Serva, BPP-1179	Agarosegelelektrophorese
Peristaltikpumpe P1	Pharmacia Fine Chemicals, 231363	Antikörperreinigung
pH-Meter FE20	Mettler Toledo, 1229405024	Messung pH-Wert
Pipettierhilfe accu-jet	Brand, 11 Y 1459	Pipettieren
Scepter™ Handheld Automated Cell Counter	Millipore, A20037t3	Zellzahlbestimmung
Schüttelinkubator Certomat R	B.Braun Biotech, 886302/4	Anzucht <i>E. coli</i> -Kulturen
Schüttler Duomax 1030	Heidolph, 031135794	SDS-Gele, Western Blot
Sicherheitswerkbank Heraguard	Heraeus, 0025900443	Sterilbank <i>E. coli</i>
Sicherheitswerkbank Herasafe	Heraeus, 40234089	Sterilbank Zellkultur
Spektralphotometer Ultraspec 2100 pro	Amersham Biosciences, 80211222	Bradford-, OD-Messung
Szintillationszähler	Biochemie I, Universität Regensburg	Szintillationsmessung
Thermomixer compact	Eppendorf, 535025741	Inkubation Cups
Thermocycler T3000 combi	Biometra, 2712332	PCR
Tissue Lyser II	Qiagen, 1211140709	RNA-Isolierung
Transblot SU Semidry Transfer Cell	Biorad, 221BR 30293	Western Blot
Trockenschrank	Binder, 02-32424	Sterilisation
Ultraschallgerät VibraCell VCX 400	Sonics, 30497F	Zelllyse
Vakuumpumpe MZ 2 C	Vacuubrand GmbH, F1666580054F	Zellkultur
Vertical Electrophoresis Unit 2001	Hofer, 0035	SDS-PAGE (groß)
Vortex Genie 2	Scientific Industries, 2-104414	Mischen von Proben
Waage Adventurer	Ohaus, 1125360845	Waage
Waage Explorer 2	Ohaus, 1121280245	Analysenwaage

Gerät	Hersteller, Serien-Nr.	Verwendung
Wasserbad W12	Medingen, 10046	Zellkultur
Zentrifugen		
Ultrazentrifuge OPTIMA TLX	Beckman Coulter, CTX00L05	Ultrazentrifugation
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf, 542601259	Tischzentrifuge
Zentrifuge J2 - H5	Beckman Coulter, CJA02A05	Standzentrifuge
Zentrifuge Megafuge 1.0 R, groß	Heraeus, 40165978	Standzentrifuge
Zentrifuge Microspin FV 2400	Hartenstein, 033680	Mikrospin
Zentrifuge Sigma 2-5, groß	Sigma-Aldrich, 119107	Zellkultur

Tab. 16: Geräte: Hersteller und Verwendung.

Software	Hersteller/Entwickler	Verwendung
AxioVision LE 4.8	Zeiss	Fluoreszenzmikroskopie
Chromas 2	Technelysium Pty Ltd.	Sequenzdatenanalyse
Corel Draw X5	Corel	Anfertigung von Abbildungen
ImageJ	National Institutes of Health	Bearbeitung Mikroskopieaufnahmen
ImageSP Viewer	TRS & SysProg	Quantifizierung EM-Aufnahmen
IrfanView	Irfan Škiljan	Datenkonvertierung
Microsoft Office	Microsoft	verschieden
RQ Manager 1.2	AB	TaqMan
Scepter™ Software	Millipore	Zellzahlbestimmung
SDS 2.3	AB	TaqMan
TotalLab TL100 (v2006)	Nonlinear Dynamics Ltd.	Quantifizierung Western Blots

Tab. 17: Software: Hersteller/Entwickler und Verwendung.

## 4 Methoden

### 4.1 Sterilisation von Medien und Materialien

Bakterienmedien, Puffer und Lösungen, sowie Plastikwaren (z.B. Pipettenspitzen) wurden für 15 min bei 121°C und feuchter Hitze autoklaviert. Glas- und Pasteurpipetten, sowie alle Glaswaren (z.B. Bechergläser) wurden bei 180°C für 6 h gebacken. Hitzeempfindliche Lösungen wurden durch Sterilfiltration (Porengröße: 0,22 µm) keimfrei gemacht.

### 4.2 Kultivierung und Manipulation von Säugetierzellen

#### 4.2.1 Verwendete Zelllinien

Die während dieser Arbeit kultivierten Säugetierzelllinien HEK293-EBNA-, COS-7- und LLC-PK1-Zellen wurden für diverse Anwendung (z.B. Expression und Lokalisierung von heterologen Proteinen) verwendet. Zusätzlich wurden murine Fibroblasten aus Lungengewebe und primäre RPE-Zellen isoliert, kultiviert und in verschiedenen Experimenten eingesetzt.

HEK293-Zellen waren ursprünglich aus humanem embryonalem Nierengewebe (HEK: „Human Embryonic Kidney“) isoliert und mit Teilen des menschlichen Adenovirus 5 transformiert worden (Graham et al. 1977). Dies führt zur Expression des Proteins E1a, welches wiederum die Expression von CMV-basierten Plasmiden verstärkt. HEK293-EBNA-Zellen besitzen zusätzlich eine stabile, CMV-kontrollierte Expression des Gens EBNA-1 aus dem Epstein-Barr-Virus (Young et al. 1988). Dadurch wird eine episomale Replikation von Plasmiden, welche einen EBV-Replikationsursprung besitzen (*oriP*), ermöglicht. Aufgrund dieser Eigenschaften kann die HEK293-EBNA-Zelllinie unter anderem zur effiziente Expression von CMV-basierten Plasmiden und damit zur Gewinnung großer Mengen an heterolog exprimierten Proteinen verwendet werden.

Zur Ko-Lokalisierung heterolog exprimierter Proteine wurde aufgrund des größeren Zelldurchmessers standardmäßig auf die Zelllinie COS-7 zurückgegriffen. COS-7 (COS: „CV1 Origine, SV40“) Zellen wurden ursprünglich aus CV-1-Nierenfibroblasten der Grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), einer afrikanischen Affengattung, entwickelt. Dazu wurden die Zellen mit einer SV40-Mutante mit fehlerhaftem Ursprung transformiert, welche für das wildtypische „große T-Antigen“ codiert (Gluzman 1981). Das „große T-Antigen“ führt in den Zellen zur effizienten Replikation von Plasmiden mit dem „SV40 großen T-Promoter“.



Bei LLC-PK1-Zellen handelt es sich um kultivierte Epithelzellen, die aus proximalem Tubulusgewebe der Schweineniere gewonnen wurden. Durch die Ausbildung eines primären Zilioms eignet sich diese Zelllinie als Modellsystem zur Untersuchung der Lokalisierung und Funktion von endogenen oder heterolog exprimierten ziliären Proteinen.

Primäre Fibroblasten wurden aus Lungengewebe von Mäusen gewonnen (4.2.9) und in verschiedenen Zell-basierten Assays, z.B. zur Ermittlung von Proteasomaktivitäten (4.6.11) oder für die Isolierung der extrazellulären Matrix (EZM) eingesetzt (4.6.12). Hierbei wurde darauf geachtet, Zellen mit niedriger und vergleichbarer Passagennummer zu verwenden.

Ein System zur Untersuchung von pathologischen Veränderungen des RPE/EZM-Komplexes stellen die primären RPE-Zellen dar. Obwohl die kultivierten RPE-Zellen im Vergleich zu Fibroblasten näher am *in vivo* System des lebenden Organismus sind, ist deren Verwendung für Zell-basierte Versuche jedoch durch eine geringere Zellzahl und ein weitaus langsames Wachstum limitiert. Darüber hinaus lassen sich primäre RPE-Zellen nur etwa ein- bis zweimal passagieren und können somit nicht über einen längeren Zeitraum kultiviert werden. Die starke Pigmentierung der Zellen kann weiterhin mit diversen Methoden, z.B. der DNA-Quantifizierung mittels PicoGreen®, interferieren. Durch die Kombination der spezifischen Eigenschaften von Fibroblasten- und RPE-Zellkulturen wurde versucht, ein Modellsystem zu verwenden, das sich möglichst nahe an der *in vivo* Situation befindet.

#### **4.2.2 Allgemeine Wachstumsbedingungen**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in einem offenen Feuchtinkubator unter Wasserdampfsättigung bei 37°C in einer 5-prozentigen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre kultiviert. Kulturen der COS-7-, LLC-PK1- und Fibroblasten-Zellen wurden dabei in „COS-7-Kulturmedium“ gehalten. Zur Kultivierung von HEK293-EBNA-Zellen wurde zusätzlich G-418 Sulfat zugesetzt („HEK-Kulturmedium“). RPE-Zellen benötigten für optimale Wachstumsbedingungen spezielles „RPE-Kulturmedium“. Die Zellen, die allesamt in einem Monolayer wachsen, wurden in sterilen poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen inkubiert und nach ca. 3-5 Tagen und Erreichen der Konfluenz (mikroskopische Kontrolle) durch Trypsinieren und Ausbringen auf frische Kulturschalen weitergezogen.

#### **4.2.3 Weiterzucht konfluenter Zellen**

Zur Weiterzucht von konfluenten Zellen (10 cm Schalen) wurden die jeweiligen Kulturmedien abgesaugt und die Zellen mittels 5 ml EDTA-Lösung (1 mM in 1x PBS) für 5 min bei 37°C

gewaschen und von Medienresten befreit. Nach Absaugen der EDTA-Lösung wurden 1,5 ml Trypsin/EDTA (0,05/0,02% in 1x PBS) zugegeben und die Zellen 2 min bei 37°C von der Plattenoberfläche gelöst. Zur Inaktivierung des Trypsins wurden nun 3,5 ml frisches Medium zugegeben. Die gelösten Zellen wurden von der Platte gespült und in Falcon-Gefäße überführt. Nach Ernte bei 350 x g konnten die Zellen vom Überstand befreit und je nach gewünschter Verdünnung in 5-7 ml frischem Medium resuspendiert werden. Abschließend wurden je 1 ml Zellsuspension zu 9 ml frischem Medium in eine vorbereitete Kulturschale (10 cm) gegeben.

#### **4.2.4 Ermittlung der Zellzahl von Zellsuspensionen**

Die genaue Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe des tragbaren Scepter<sup>TM</sup>-Zellzählgeräts der Firma Millipore bestimmt. Dabei wird durch die Messung von Änderungen des elektrischen Widerstands bzw. der Spannung einer Zellsuspension auf deren Zellzahl und die Verteilung verschiedener Zelldurchmesser geschlossen. Zur Messung wurden 200 µl einer frisch resuspendierten und trypsinierten Zellsuspension in einem Zellzahlbereich von 10000 - 500000 Zellen pro ml benötigt. Das Auswerten und Speichern der erhaltenen Histogramme erfolgte durch Anwendung der mitgelieferten Scepter<sup>TM</sup>-Software.

#### **4.2.5 Kryokonservierung und Auftauen von Säugetierzellen**

Zur längerfristigen Lagerung und Konservierung von Säugetierzellen wurde ein DMSO-basiertes Einfriermedium verwendet, das Eiskristallbildung und Beschädigungen der Zellen vermeidet. Trypsinierte Zellen einer konfluent bewachsenen Zellkulturplatte wurden dazu nach erfolgreicher Ernte mit 2 ml Einfriermedium resuspendiert, in spezielle Kryoröhrchen gegeben und über Nacht in Einfrierboxen bei -80°C gelagert. In der mit Isopropanol gefüllten Box verringert sich die Temperatur langsam um etwa 1°C pro Minute. Anschließend konnten die gefrorenen Zellsuspensionen in Türmen mit flüssigem Stickstoff bei -196°C langfristig gelagert und konserviert werden. Zur erneuten Reaktivierung der Zellen wurden diese aus den Stickstofftürmen genommen und in einem Wasserbad bei 37°C kurz angetaut. Die 2 ml Zellsuspension wurden zusammen mit 3 ml frischem Medium in Falcon-Röhrchen überführt und wie gewohnt geerntet. Das Zellpellet wurde mit 1 ml frischem Medium resuspendiert und konnte abschließend auf eine vorbereitete Zellkulturschale mit 9 ml frischem Medium ausplattiert und wie bereits beschrieben (4.2.3) weiter kultiviert werden.

#### 4.2.6 Transiente Transfektion

Zur Expression von Proteinen in den verschiedenen Säugetierzellen konnten je nach eingesetzter Zelllinie und erforderlicher Effizienz unterschiedliche Methoden bzw. Reagenzien für die transiente Transfektion von Plasmiden verwendet werden. Als Standardverfahren, vor allem zur relativ unproblematischen Transfektion von HEK293-EBNA-Zellen, eignete sich dabei die Verwendung des Transfektionreagenz Mirus *TransIT*®-LT1. Dabei wurden, im Falle einer 10 cm Zellkulturschale, 500 µl DMEM-Medium ohne Antibiotika- und Serumzusätze mit ca. 7,5-10 µg Plasmid-DNA (Tab. 18) versetzt und mittels Vortex gemischt. Anschließend wurde das Reagenz 2:1 bis 3:1 im Verhältnis zur verwendeten DNA zugegeben und nach erneutem Mischen für 15 min bei RT inkubiert. Die transfektionskompetente DNA konnte nun in achterförmigen Bewegungen zu den etwa 70% konfluenten Zellen gegeben werden. Nach etwa 24-48 h Inkubation konnten die Zellen für die unterschiedlichen Anwendungen, z.B. zur Herstellung von Zelllysaten oder zur Anfertigung von Immunfärbungen, verwendet werden.

Art der Platte	Wachstumsbereich/cm <sup>2</sup>	Transfizierte DNA-Menge
10 cm	55	7,5-10 µg
6 cm	21	3 µg
6-Well	9,4	2 µg

**Tab. 18: DNA-Mengen zur Transfektion verschiedener Zellkulturplatten.**

Zur Transfektion von Plasmid-DNA in HEK293-EBNA-Zellen konnte alternativ zum Mirus-Reagenz auch das Transfektionsreagenz FuGene® HD der Firma Promega verwendet werden. Dazu wurden 500 µl DMEM-Medium ohne Zusätze mit dem Transfektionsreagenz (3:1 im Verhältnis zur DNA-Menge) gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe der Plasmid-DNA und 15-minütiger Inkubation konnte der DNA-Komplex in achterförmigen Bewegungen zu den Zellen gegeben werden. Bei Verwendung von Zelllinien (z.B. LLC-PK1) oder Plasmiden mit bekanntermaßen geringeren Transfektionseffizienzen wurde auf das Reagenz Lipofectamin<sup>™</sup> 2000 von Life Technologies zurückgegriffen. Dabei wurden 250 µl Opti-MEM®-Medium mit den entsprechenden DNA-Mengen (Tab. 18) versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel dazu wurde das Transfektionsreagenz in einem Verhältnis von 2:1 bis 3:1 zur DNA in einem weiteren Reaktionsgefäß erneut mit 250 µl Opti-MEM®-Medium gemischt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Nach Vereinigung beider Ansätze und einem weiteren Inkubationsschritt für 30 min bei RT konnte der entstandene DNA-Lipid-Komplex zu den Zellen pipettiert werden. Die transfizierten Zellen mussten nach Inkubation über Nacht bei 37°C zur Weiterzucht mit frischem Kulturmedium versehen werden.

#### 4.2.7 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von überexprimierten Proteinen wurden Zelllysate aus transient transfizierten HEK293-EBNA- bzw. COS-7-Zellen hergestellt. Nach Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen dazu mit 5 ml 1x PBS von den Zellkulturplatten abgespült und bei 350 x g für 5 min geerntet. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen zur Entfernung von Mediumsresten in 500 µl 1x PBS resuspendiert, in 2 ml Cups überführt und erneut zentrifugiert (1 min, 4500 x g). Zur Zelllyse wurde das Pellet nun in 500 µl kaltem 1x PBS resuspendiert, mit 10 µl KI-Proteaseinhibitor (1:100) zur Verhinderung der Proteindegradation versetzt und für 15 min unter Rühren mit 500 µl 2% Triton X-100 (in 1x PBS) auf Eis behandelt. Die Klärung des Lysats erfolgte durch eine abschließende Zentrifugation für 10 min bei 16.100 x g und 4°C.

#### 4.2.8 Nocodazolbehandlung von COS-7-Zellen

Zur Ermittlung von MT-stabilisierenden Effekten bestimmter rekombinanter Proteine wurden transfizierte COS-7-Zellen einer Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks mit 2,5 µM bzw. 10 µM Nocodazol für 2 h bei 37°C unterworfen und anschließend mittels ICC-Behandlung analysiert (4.7.5).

#### 4.2.9 Kultivierung von Fibroblastenzelllinien aus murinem Lungengewebe

Fibroblastenzellen wurden aus Lungengewebe verschiedener Mauslinien (*Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>, *Timp3*<sup>-/-</sup>) gewonnen. Dazu wurden die Organe aus getöteten Mäusen präpariert und in etwa 2 x 2 mm große Stücke aufgeteilt. Diese wurden auf 10 cm Zellkulturschalen verteilt und für 10 min getrocknet. Anschließend wurden die Kulturschalen mit 10 ml Kulturmedium aufgefüllt und bei 37°C inkubiert. Die aus dem Gewebestück auswachsenden Zellen wurden regelmäßig mikroskopisch kontrolliert. Das Lungenstückchen wurde im Falle eines erfolgreichen Fibroblastenwachstums nach etwa 10 Tagen aus den Platten entfernt. Die Zellen wurden nach ca. zwei Wochen und dem Erreichen der Konfluenz erstmals gesplittet und konnten anschließend analog zu COS-7-Zellen weitergezogen werden.

#### 4.2.10 Isolierung und Kultivierung von primären RPE-Zellen

Zur Isolierung von primären RPE-Zellen wurden die entsprechenden Tiere durch Begasung mit CO<sub>2</sub> getötet. Beide Augen eines Tieres wurden mit einer Pinzette entfernt und parallel der Ora serrata mit einem Skalpell angeritzt. Die Augen wurden nun zur Entfernung von Linse und Glaskörper entlang des ersten Skalpellschnitts aufgetrennt. Anschließend wurden die

Augenbecher entfernt und für 20 min bei 37°C in 1x PBS inkubiert. Die Augen wurden nun in 1 mM EDTA-Lösung (in 1x PBS) umgesetzt und weitere 25 min bei 37°C inkubiert. Währenddessen wurden 1 ml Dissoziationspuffer (Tab. 19) hergestellt und in 900 und 100 µl Aliquots aufgeteilt. Aus dem 100 µl Aliquot wurde durch Zugabe von 2 µl Papainsuspension (16-40 U/mg) eine Enzymlösung hergestellt.

Komponente	Volumen
1 mM EDTA in 1x PBS	875 µl
L-Cystein (26 mM)	115 µl
BSA (100 mg/ml in 1x PBS)	10 µl

**Tab. 19: Zusammensetzung des RPE-Dissoziationspuffers.**

Die Augen wurden erneut in 1x PBS gegeben und mit einer Pinzette von der Retina befreit. Anschließend wurden die Augenbecher in 12-Well Zellkulturschalen mit 900 µl Dissoziationspuffer gegeben, mit 100 µl der Enzymlösung versetzt und für etwa 23 min bei 37°C inkubiert. Nachdem beide Augen nun in eine 10 cm Zellkulturschale mit 1 ml RPE-Medium gegeben worden waren, wurden die RPE-Zellen mit Hilfe einer Pipette und weiteren 6 ml RPE-Medium aus den Augenbechern gespült. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 5 min bei 350 x g geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden mit 200 µl frischem RPE-Medium aufgenommen und in einem Tropfen auf 6-Well Platten gegeben. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurden vorsichtig 2,5 ml frisches RPE-Medium auf die Zellen pipettiert. Diese mussten nun unter täglicher Beobachtung und regelmäßigem Mediumswechsel für mindestens 8 Tage weitergezogen werden.

### **4.3 Kultivierung und Manipulation von bakteriellen Zellen (*E. coli*)**

#### **4.3.1 Verwendete Bakterienstämme**

##### **4.3.1.1 *E. coli* DH5α**

Bei *E. coli* DH5α handelt es sich um einen Bakterienstamm, der besonders für die Klonierung und Isolierung von Plasmid-DNA geeignet ist. Die Defizienz mehrerer Nukleasogene begünstigt dabei die Einschleusung und Vermehrung von Fremd-DNA ohne Degradation der Plasmide durch endogene Nukleasen.

##### **4.3.1.2 *E. coli* BL21 (DE3)**

Im Gegensatz zu DH5α eignen sich *E. coli*-Zellen des Stamms BL21 (DE3) besonders zur effizienten Expression von rekombinanten Fusionsproteinen (GST, MBP), da hierbei

verschiedene Proteasen, die normalerweise zum Abbau fremdartiger Proteine vorgesehen sind, ausgeschaltet wurden. Der Stamm ist darüber hinaus ein Wirt des  $\lambda$ -Bakteriophagen DE, wodurch er eine chromosomale Kopie der RNA-Polymerase T7, die unter der Kontrolle des lacUV5-Promotors steht, besitzt. Dadurch besteht die Möglichkeit einer, durch IPTG induzierbaren, effizienten Proteinexpression von unter der Kontrolle der *tac*- oder T7-Promotoren liegenden Plasmid-kodierten Zielgenen (Studier & Moffatt 1986).

#### 4.3.2 Allgemeine Wachstumsbedingungen

*E. coli*-Zellen wurden je nach Fragestellung in LB-Flüssigkulturen im Bakterienschüttler oder nach Ausplattieren auf LB-Agarplatten in einem Bakterienbrutschrank bei 37°C angezogen. Durch vorherige Zugabe der entsprechenden Antibiotika zu autoklaviertem LB-Medium bzw. zu sterilen LB-Agarplatten erfolgte die Selektion der Zellen mit den entsprechenden Resistenz-kodierenden Plasmiden.

#### 4.3.3 Glycerinstocks

Zur dauerhaften Lagerung und Konservierung von Bakterienstämmen, z.B. nach erfolgreicher Klonierung von Plasmid-DNAs, wurden Glycerinstocks angelegt. Dazu mussten 825  $\mu$ l einer stationär bewachsenen Kultur entnommen und mit 175  $\mu$ l sterilem Glycerin (85%) versetzt werden. Nach sorgfältigem Mischen konnte die Glycerinkultur bei -80°C gelagert werden. Zur Dokumentation der Klonierungsbedingungen und -ergebnisse wurden Datenblätter angelegt.

#### 4.3.4 Quantifizierung von Bakterienkulturen

Die quantitative Charakterisierung von Bakterienkulturen wurde durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 600 nm ( $OD_{600}$ ) durchgeführt. Dabei wurde 1 ml der entsprechenden Kultur in Küvetten gefüllt und im Vergleich zum Nullwert des frischen, nicht bewachsenen LB-Mediums gemessen.

#### 4.3.5 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Die Herstellung von chemisch kompetenten Zellen war für die nachfolgende Transformation der *E. coli*-Zellen mit Plasmiden notwendig. Dazu wurden 3 ml einer mit *E. coli* DH5 $\alpha$  bzw. BL21 (DE3) bewachsenen ü.N.-Kultur auf 600 ml mit LB-Medium verdünnt und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600}$  von ca. 0,6 angezogen. Die Zellen wurden nach Aufteilung auf 50 ml Falcon-Gefäße durch Zentrifugation für 10 min bei 3500 x g und 4°C geerntet. Die Pellets wurden in je 15 ml Puffer TFB1 resuspendiert und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter

Zentrifugation für 10 min bei 2500 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Zellpellet mit je 2 ml Puffer TFB2 resuspendiert. Die Zellsuspensionen konnten nun nach Aliquotierung zu je 100 µl mit flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert werden.

#### **4.3.6 Transformation von chemisch kompetenten *E. coli* Zellen mittels Hitzeschock**

Für die Transformation eines Ligationsansatzes bzw. von reiner Plasmid-DNA in *E. coli* DH5α oder BL21(DE3) wurden bei -80°C gelagerte, chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit ca. 50% des Ligationsansatzes, bzw. mit maximal 100 ng Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der nun folgende Hitzeschritt bei 42°C für 45 Sekunden verleiht den Zellen eine kurzfristige Aufnahmefähigkeit für Plasmid-DNAs. Nach Abkühlung der Zellen für 2 min auf Eis wurden 500 µl SOC-Medium zugegeben. Zur Ausbildung der jeweiligen, durch das Plasmid kodierten Antibiotikumsresistenzen mussten die Zellen bei 37°C für 30-60 min inkubiert werden. Abschließend wurden 100-200 µl des Transformationsansatzes auf vorgewärmte LB-Selektionsplatten gegeben und mit Hilfe eines Drigalski-Spatels homogen verteilt. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C im Bakterienbrutschrank konnten Einzelkolonien für die weiteren Analysen verwendet werden.

#### **4.3.7 Zellyse mittels der „FRENCH® Press“ Zellpresse**

Die Lyse von *E. coli*-Zellen, z.B. zur Isolierung von rekombinanten Fusionsproteinen, erfolgte mittels mechanischem Zellaufschluss durch Behandlung mit einer „FRENCH® Press“ Zellpresse. Dazu wurden die Zellen im jeweiligen Lysepuffer (3.10) aufgenommen und durch mindestens drei Durchläufe in der Zellpresse bei einem angelegten Druck von 1000 Psi lysiert. Alle Schritte mussten dabei zur Vermeidung von unspezifischen Proteaseaktivitäten bei 4°C und unter Zugabe von KI-Proteaseinhibitor (1:100) durchgeführt werden. Die Komponenten der Zellpresse waren bei Beginn der Prozedur ebenfalls bei 4°C gelagert worden und mussten bei der Zusammensetzung mit kaltem Glycerin (100%) geschmiert werden.

### **4.4 DNA-basierte molekularbiologische Methoden**

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

Die Isolierung und Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Zellen wurde mittels Anionenaustauschchromatographie mit den Kit-Systemen der Firma Macherey-Nagel gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Zur DNA-Elution wurde jedoch H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> anstatt des

mitgelieferten Elutionspuffers verwendet. Tabelle 20 zeigt die Spezifikationen beider Systeme („Mini“- oder „Midi-Präp“), die je nach benötigter DNA-Menge alternativ verwendet wurden.

Eigenschaften	„Mini-Präp“	„Midi-Präp“
Volumen Vorkultur	5 ml	200 ml
Volumen Elution	20 µl	200 µl

Tab. 20: Plasmidisolierung aus *E. coli*-Zellen.

## 4.4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### 4.4.2.1 Durchführung einer PCR

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) mit den charakteristischen Reaktionsschritten Denaturierung, Primerbindung und Verlängerung verwendet. Die Reaktionen wurden in 0,2 ml PCR-Cups im Thermozykler durchgeführt. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten unterschiedlichen Varianten der PCR-Reaktion werden nachfolgend detaillierter behandelt.

### 4.4.2.2 PCR-basierte Amplifikation von Genen bzw. Genstücken zur Klonierung

Zur Klonierung verschiedener Gene oder Teilbereiche von Genen wurde eine 1+6 Mischung der Polymerasen *Pfu* und „Haus“-*Taq* verwendet. Die *Pfu*-Polymerase besitzt dabei eine 3'-5' Exonukleaseaktivität welche die Fehlerrate bei der PCR stark minimiert. Als Ausgangs-DNA wurden hier verschiedene cDNAs, DNA aus gekauften cDNA-Klonen oder bereits vorhandene Plasmid-DNAs in einem Konzentrationsbereich von 10-100 ng/µl verwendet. In Tabellen 21 und 22 sind der Ansatz sowie das Programm einer Standard-PCR zusammengefasst. Zur Klonierung der amplifizierten DNA waren bei der Primerkonstruktion die Erkennungs- bzw. Verdasequenzen der jeweiligen Restriktionsendonukleasen eingefügt worden.

Komponente	Volumen
Puffer 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
dNTPs (1,25 mM)	1 µl
Primer F (10 µM)	1,6 µl
Primer R (10 µM)	1,6 µl
Polymerase ( <i>Pfu/Taq</i> 1+6)	0,8 µl
DNA (10-100 ng/µl)	2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	38 µl

Tab. 21: Ansatz einer Standard-PCR. F, Forward (Vorwärts); R, Reverse (Rückwärts).

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	3 min	1
Denaturierung	95°C	30 sek	25-33
Annealing	55-65°C	30 sek	
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	1



**Tab. 22: Programm einer Standard-PCR.****4.4.2.3 Kolonie-PCR zur Identifizierung positiver Transformanden**

Zur Identifizierung von positiven Transformanden einer Klonierung wurde die Kolonie-PCR verwendet. Dazu wurden etwa 16-32 Einzelkolonien pro Transformationsansatz von der entsprechenden LB-Selektionsplatte gepickt, in jeweils 20 µl des geeigneten LB-Selektionsmediums in PCR-Cups überimpft und für 3 h bei 37°C inkubiert. Daraus wurden je 3 µl Bakterienmedium für die Kolonie-PCR (Tab. 23) eingesetzt. In dieser PCR konnte die *Taq*-Polymerase verwendet werden, da die Fragmentgrößen der PCR durch gelegentliche Fehler (1 pro 1000 bp) in der Basensequenz nicht entscheidend verändert werden.

Komponente	Volumen
Puffer 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
dNTPs (1,25 mM)	0,5 µl
Primer F (10 µM)	0,8 µl
Primer R (10 µM)	0,8 µl
Polymerase („Haus“- <i>Taq</i> )	0,4 µl
Bakterienmedium	3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	17 µl

**Tab. 23: Ansatz der Kolonie-PCR.** F, Forward (Vorwärts); R, Reverse (Rückwärts).

Im Vergleich zur Standard-PCR sind bei der Kolonie-PCR mehrere Änderungen im PCR-Programm (Tab. 24) zu beachten. Die initiale Denaturierung muss zur Zelllyse auf 10 min verlängert werden, da als Template keine reinen DNAs sondern intakte Zellen verwendet werden. Durch die somit vergleichsweise geringe Menge an Template-DNA wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht und die Länge der Elongationsschritte der PCR auf 4 min verlängert.

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	30 sek	35
Annealing	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	4 min	
Finale Elongation	72°C	5 min	1

**Tab. 24: Programm der Kolonie-PCR.**

Nach vollendeter PCR-Reaktion wurden je 5 µl Ladepuffer zugegeben und je 15 µl der DNA-Lösung zur Analyse der PCR-Fragmentgröße auf ein Agarosegel (4.4.4) aufgetragen. Klone, die durch korrekte Fragmentgröße des PCR-Produkts als positiv identifiziert worden waren, konnten durch Überimpfung von 5 µl der restlichen Bakteriensuspension in 5 ml frisches LB-Selektionsmedium vermehrt werden. In weiteren Schritten wurden die jeweiligen Plasmid-DNAs isoliert (4.4.1) und mittels Sequenzierung (4.4.9) analysiert.

#### 4.4.2.4 Semi-quantitative Reverse Transkriptions (RT)-PCR

Um einen semi-quantitativen Nachweis der Genexpression in verschiedenen Geweben machen zu können, wurde das „Human Total RNA Master Panel II“ von BD Biosciences Clontech (Palo Alto, CA, USA) verwendet. Daraus konnte, zusammen mit RNA aus humaner Retina, die durch RNA-Extraktion (4.5.1) gewonnen wurde, mittels Reverser Transkription cDNA erstellt werden. Diese wurde in einen standardmäßigen PCR-Ansatz (Tab. 21-22) als Template eingesetzt. Als Negativkontrolle diente  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$ . Die PCR mit spezifischen Primern für das „Housekeeper“-Gen *GUSB* diente dabei zur Kontrolle der cDNA-Integrität bzw. zum Vergleich der DNA-Quantitäten der PCR-Produkte.

#### 4.4.2.5 PCR zur Genotypisierung der *Timp3*-KI und -KO Mauslinien und Fibroblasten

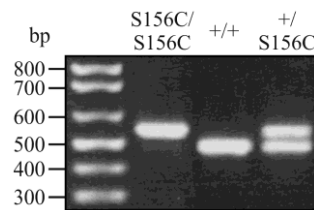
Der erste Schritt zur Genotypisierung der *Timp3*-Mauslinien bzw. der aus Lungengewebe isolierten Fibroblasten war die Isolierung von genomischer DNA aus Mäuseschwänzen bzw. Fibroblasten-Zellmaterial. Mäuseschwänze (2-4 mm) bzw. isolierte Zellpellets (aus 10 cm Schale) wurden dazu durch Behandlung mit Verdaupuffer (Tab. 25) über Nacht bei 37°C behandelt.

Komponente	Volumen	Konzentration
Laird's Puffer	500 µl	
SDS (20%)	50 µl	1,66%
Protease (10 mg/ml)	50 µl	0,83 mg/ml

**Tab. 25: Zusammensetzung des Verdaupuffers zur Isolierung genomischer DNA.**

Nach Abtrennung von Zellresten mittels Zentrifugation (15 min, RT, 16.200 x g), wurde der Überstand in ein frisches 2 ml Cup überführt, mit 500 µl Isopropanol zur Ausfällung der DNA versetzt (DNA-Wolke wird sichtbar) und etwa achtmal invertiert. Die gefällte DNA musste nun pelletiert (15 min, RT, 16.200 x g) und nach Verwerfen des Überstandes mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen werden. Erneutem Zentrifugieren (10 min, RT, 16.200 x g) folgte die kurze Trocknung der Pellets. Die getrockneten DNAs wurde in 200 µl  $\text{H}_2\text{O}_{\text{Millipore}}$  aufgenommen und ü.N. unter Schüttel gelöst. Die Konzentration der DNA wurde mittels NanoDrop®-Messung bestimmt. Zur Durchführung der PCR wurden 50-100 ng DNA in einem Standardansatz (Tab. 21) unter Standardbedingungen (Tab. 22) eingesetzt. Die PCR (Annealingtemperatur 55°C, 33 Zyklen) mit den Primern *timp3*-KI-F2 und *timp3*-KI-R lieferte Produktgrößen von 470 (Wildtypallel) bzw. 550 Basenpaaren (mutiertes Allel). Abbildung 10 zeigt das Ergebnis einer exemplarischen Genotypisierungs-PCR des S156C-TIMP3-KI Mausmodells. Zur Bestimmung der *Timp3*-Defizienz mussten zwei PCRs mit den

Primerkombinationen timp3ex3F und timpex4R (Wildtypallel: 634 bp) bzw. timp3ex3F und pGKneoR (KO-Allel: 209 bp) durchgeführt werden (Janssen 2008).



**Abb. 10: Genotypisierung von *Timp3*-KI-Mäusen und -Fibroblasten.** Wildtypallel: 470 bp, mutiertes Allel: 550 bp.

#### 4.4.2.6 Quantitative Real Time (qRT)-PCR

Zur quantitativen Ermittlung der *Timp3*-Genexpression wurde auf die TaqMan-PCR-Technologie zurückgegriffen. Hierbei wird eine PCR-Reaktion unter Zugabe einer speziellen, mit einem Reporter und Quencher versehen DNA-Sonde durchgeführt. Im Verlauf der PCR-Elongationsphase kommt es zur Spaltung der Sonde, wodurch der Effekt des Quenchers auf den Reporter verloren geht. Die abschließende Signalstärke des Reporters am Ende der PCR steht in direktem Zusammenhang mit der Konzentration der Ausgangs-DNA. Die Ansätze für die qRT-PCR, exemplarisch in Tabelle 26 zusammengefasst, wurden in Triplikaten mit je 50 ng Ausgangs-DNA in 384-Well Platten pipettiert. Für die *Timp3*-PCR wurden die Primer Timp3-Exon5-RT-F und Timp3-Exon5-RT-R mit der Roche-Sonde 62 verwendet. Die Amplifizierung des „Housekeepers“ *ATPase* wurde mit den Primern *ATPase\_F* und *ATPase\_R* sowie der Roche-Sonde 77 erzielt. Das PCR-Programm umfasste 40 Zyklen Denaturierung (95°C, 40 sek), Annealing (60°C, 60 sek) und Elongation (72°C, 120 sek). Die gesammelten Daten wurden nach vollendetem PCR-Lauf mit Hilfe der Software „RQ-Manager 1.2“ ausgewertet. Hierzu wurde die relativen Genexpressionen (RQ) der einzelnen Proben bezogen auf ein Referenzgen und einen Kalibratorwert durch die Formel  $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_T}$  berechnet. Der Wert  $C_T$  („Cycle Threshold“) wurde durch Mittelwertbildung der einzelnen Triplikatmesswerte erhalten und bezeichnet die Zyklenzahl, die während der TaqMan-Reaktion benötigt wird, um einen Schwellenwert zu erreichen. Je niedriger der  $C_T$ -Wert einer Probe ist, desto höher ist somit die Ausgangs-DNA der entsprechenden amplifizierten cDNA.

Komponente	Volumen
TaqMan-Mastermix (2x)	5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10 µM)	1 µl
Sonde	0,125 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	0,375 µl
cDNA (20 ng/µl)	2,5 µl

**Tab. 26: Zusammensetzung der qRT-PCR-Reaktion.** F, Forward (Vorwärts); R, Reverse (Rückwärts).

#### 4.4.3 *In vitro* Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen in den kodierenden Bereich eines Gens konnte die ortspezifische *in vitro* Mutagenese von Plasmiden verwendet werden. Dabei wurden die Primer komplementär zueinander, mit dem jeweiligen Basenaustausch im Zentralbereich der etwa 30-40 Basen langen Oligonukleotide benötigt. Durch eine Thermozyklerreaktion (Tab. 27-28) mit der qualitativ hochwertigeren DNA-Polymerase PfuUltra™ II Fusion Hot Start wird mit Hilfe der Primer das gesamte Plasmid linear amplifiziert, wodurch sogenannte „nicked“ DNA, zirkuläre Plasmid-DNA mit einem geschlossenen und einem offenen Strang, entsteht.

Komponente	Volumen
Puffer 10x (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	5 µl
dNTPs (10 mM)	10 µl
Primer F (5 µM)	2 µl
Primer R (5 µM)	2 µl
PfuUltra II Fusion HS	1 µl
DNA (40 ng/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	29 µl

**Tab. 27: Ansatz der *in vitro* Mutagenese.** F, Forward (Vorwärts); R, Reverse (Rückwärts).

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	25 sek	
Annealing	55°C	1 min	22
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	1

**Tab. 28: Thermozyklerprogramm der *in vitro* Mutagenese.**

Zur Qualitätskontrolle der Reaktion wurden 10 µl des Reaktionsansatzes mit 5 µl Ladepuffer versehen und mittels Agarosegelelektrophorese (4.4.4) gemeinsam mit vergleichbaren Mengen an Ausgangs-DNA (8 ng) aufgetrennt. Es sollte sich nun im Vergleich mit der Template-DNA (8 ng unterhalb der Nachweisgrenze) bei erfolgreicher Mutagenese eine prominente Bande mit entsprechender Plasmidgröße gezeigt haben. Die verbleibenden 40 µl des Reaktionsansatzes wurden zur selektiven Entfernung von nicht mutierter, methylierter Ausgangs-DNA mit dem Restriktionsenzym *DpnI*, welches spezifisch an methylierter DNA agiert, für 2 h bei 37°C behandelt (Tab. 29).

Komponente	Volumen
Mutagenese-Reaktionsansatz	40 µl
NEB Puffer 4 (10x)	5 µl
<i>DpnI</i> (20 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	4 µl

**Tab. 29: *DpnI*-Verdau methylierter Plasmid-DNA.**

Anschließend wurden je 5 bzw. 20 µl der *DpnI*-verdauten Mutageneseansätze in *E. coli*-Zellen (DH5α) transformiert und auf den entsprechenden LB-Selektionsplatten ü.N. bei 37°C

inkubiert. Die erhaltenen Einzelkolonien wurden mittels Kolonie-PCR (4.4.2.3) und DNA-Sequenzierung (4.4.9) charakterisiert.

#### **4.4.4 Agarosegelelektrophorese zur DNA-Analyse**

Um DNA-Fragmente aufgrund ihrer Größe auftrennen zu können, wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Dazu wurden je nach gewünschtem Trennbereich 1-1,5%ige Gele gegossen. Die entsprechende Agarosemenge wurde eingewogen und in 1x TBE-Puffer für 2 min in einer Mikrowelle aufgeköcht und dadurch gelöst. Nach kurzem Abkühlen der Lösung (Eisbad) konnten 1-2 Tropfen Ethidiumbromid zur Detektion der DNA-Banden im Gel zugegeben werden. Die Lösung wurde in Gelkammern gegossen und mit entsprechenden Kämmen versehen. Nach Abkühlung (ca. 30 min) konnte das Gel zur Elektrophorese bei 180-200 V für ca. 30 min in einer mit 1x TBE-Puffer gefüllten Elektrophoreseapparatur verwendet werden. Die DNA-Proben mussten dazu mit Bromphenolblauprobeppuffer versetzt werden. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer negativen Ladung von der Kathode zur Anode und können mit dem ebenfalls aufgetragenen Größenstandard verglichen werden.

#### **4.4.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA Fragmente aus Agarosegelen**

Die Isolierung und Aufreinigung von DNA-Fragmenten, wie z.B. PCR-Produkten oder Restriktionsverdauansätzen, erfolgte mit Hilfe des „NucleoSpin® PCR Clean-up Kits“ der Firma Macherey-Nagel. Die jeweiligen Banden wurden dabei mit einem Skalpell möglichst exakt aus dem Agarosegel ausgeschnitten und unter Beachtung der Herstellerangaben aufgereinigt. Die DNAs wurden abschließend mit je 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> wieder von den Säulchen eluiert und konnten nun für weitere Analysen verwendet werden.

#### **4.4.6 DNA-Konzentrationsbestimmung**

Die Konzentration von DNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch mittels NanoDrop®-Messung bestimmt. Die Reinheit der DNA wurde dabei durch das Verhältnis der Messwerte bei 260 und 280 nm ausgedrückt und liegt im Falle von reiner DNA bei 1,8. Alternativ dazu konnten DNA-Konzentrationen, z.B. von Zelllysaten, mit Hilfe des PicoGreen® Farbstoffs ermittelt werden. Dabei handelt es sich um ein Fluorochrom, welches durch spezifische Bindung an doppelsträngige DNA (dsDNA) deren Quantifizierung ermöglicht. Hierzu wurden 100 µl Zelllysate in NH<sub>4</sub>OH (25 mM) mit 100 µl PicoGreen® Gebrauchslösung (Reagenz 1:200 in NH<sub>4</sub>OH [25 mM]) gemischt und unter Lichtabschluss für 5 min inkubiert. Durch Messung der Absorption bei 530 nm (Anregung 500 nm) und Korrektur mit dem Leerwert

(100 µl NH<sub>4</sub>OH [25 mM]) konnten verschiedene DNA-Mengen relativ zueinander quantifiziert werden. Alle Messwerte wurden in Duplikaten ermittelt.

#### 4.4.7 Sequenzspezifischer Restriktionsverdau von DNA

Der sequenzspezifische Restriktionsverdau von Vektoren und PCR-Produkten wurde mit Enzymen und Pufferlösungen der Firma NEB durchgeführt. Tabelle 30 zeigt die Zusammenfassung einer typischen Doppelverdaureaktion von 3-4 µg Plasmid-DNA mit 10-20 U pro Enzym in einem Gesamtreaktionsvolumen von 50 µl.

Komponente	Volumen
DNA	x µl (3-4 µg)
NEB Puffer 1-4 (10x)	5 µl
BSA (100x)	0,5 µl
Enzyme	je 1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	42,5 µl - x µl

**Tab. 30: Restriktionsverdauansatz.**

Der Restriktionsverdau wurde standardmäßig bei 37°C über Nacht, zumindest aber für 3 h durchgeführt und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (4.4.4) aufgetrennt. Die Verdauprodukte konnten nun aus dem Agarosegel ausgeschnitten, mittels „NucleoSpin® PCR Clean-up Kit“ aufgereinigt und in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>Millipore</sub> wieder eluiert werden.

#### 4.4.8 Ligation

Zur Ligation von Insert-DNA mit linearisierter Vektor-DNA wurde die T4 DNA-Ligase von NEB verwendet. Entsprechende Mengen an Insert- sowie Vektor-DNA ließen sich dabei aus dem Agarosegel abschätzen und wurden in einem Verhältnis Insert/Vektor von etwa 3:1 für die Ligationsreaktion eingesetzt (Tab. 31). Der Ligationsansatz wurde alternativ bei RT für 1 h oder bei 16°C über Nacht inkubiert und anschließend in einem Volumen von 10 µl für die Transformation in *E. coli*-Zellen verwendet.

Komponente	Volumen
Insert-DNA	ca. 6 µl
Vektor-DNA	ca. 2 µl
Ligase-Puffer (10x)	0,5 µl
T4 DNA-Ligase (400 U/µl)	1 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	ad 20 µl

**Tab. 31: Ligationsansatz.**

Bei Anwendung des Vektorsystems pGEM®-T, das vor allem zur Zwischenklonierung von PCR-Produkten mit Template-DNAs aus Geweben benötigt wurde, setzte sich der Ligationsansatz laut Herstellerfirma, wie in Tabelle 32 gezeigt, zusammen.

Komponente	Volumen
Insert-DNA (PCR-Produkt)	3 µl
pGEM®-T Vektor (50 ng/µl)	1 µl
Ligase-Puffer (2x)	5 µl
T4 DNA-Ligase (3 Weiss U/µl)	1 µl

**Tab. 32: Ligationsansatz bei Verwendung des Vektorsystems pGEM®-T.**

Die Ligationsansätze wurden für 1 h bei RT oder alternativ ü.N. bei 4°C inkubiert. Zur Transformation in *E. coli*-Zellen wurden je 2 µl Ligationsansatz verwendet. Zusätzlich zur Kolonie-PCR bietet dieses Vektorsystem die Möglichkeit des „Blau-Weiß-Screenings“. Durch Zugabe von je 10 µl IPTG (0,1 M) und 50 µl X-Gal (40 mg/ml) zu den LB<sub>Amp</sub>-Platten konnten nach ü.N.-Inkubation blaue Klone mit Leervektor von weißen Klonen mit Vektor- und Insert-DNA unterschieden werden.

#### 4.4.9 DNA-Sequenzierung und Sequenzdatenanalyse

Zur Ermittlung von DNA-Basenabfolgen wurde die Sequenziermethode nach Sanger verwendet. Dabei handelt es sich um eine PCR-ähnliche Kettenabbruchreaktion. Die zu sequenzierende Template-DNA wird dabei durch Zugabe nur eines Primers, der DNA-Polymerase und einem Reaktionsmix mit allen vier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) gemischt (Tab. 33), einer Thermozyklerreaktion (Tab. 34) unterzogen und linear amplifiziert.

Komponente	Volumen
DNA	1 µl (100-200 ng/µl)
5x Puffer	2 µl
BigDye® Reaktionsmix	0,3 µl
H <sub>2</sub> O <sub>Millipore</sub>	1,7 µl
Primer (10 µM)	1 µl

**Tab. 33: Reaktionsansatz der Sequenzierungsreaktion.**

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	
Annealing	58°C	30 sek	27
Elongation	60°C	3 min	
Finale Elongation	60°C	5 min	1

**Tab. 34: Thermozyklerprogramm der Sequenzierungsreaktion.**

Zusätzlich befinden sich im Reaktionsmix kleinere Mengen der vier Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs), die bei Einbau in den wachsenden DNA-Strang aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe zum Kettenabbruch führen. Durch die unterschiedliche Fluoreszenzmarkierung der vier ddNTPs kann die Sequenz der Template-DNA durch eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsprodukte ermittelt werden. Nach Vollendung der Thermozykler-Reaktion konnte die amplifizierte DNA präzipitiert werden. Dazu wurden zum

Reaktionsansatz 3 µl Natriumacetat (3 M), sowie 25 µl Ethanol (100%) pipettiert. Die Lösung wurde kräftig gemischt und für 20 min bei 4000 x g und 15°C zentrifugiert. Das (nicht sichtbare) Pellet wurde vorsichtig vom Überstand befreit und zur Entfernung von Salzresten mit 100 µl Ethanol (70%, frisch hergestellt) versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (15 min, 4000 x g, 15°C) und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet durch kurzes Zentrifugieren über Kopf vollständig getrocknet und mit 15 µl „HiDi-Formamid“ wieder in Lösung gebracht. Die Basenabfolge wurde nun durch Chromatographie mittels „Abi3130xl Genetic Analyser“ ermittelt und mit Hilfe der Software Chromas 2 analysiert.

#### **4.4.10 Ablauf einer Klonierung**

Der Ablauf einer Klonierung setzt sich aus verschiedenen, bereits beschriebenen Schritten zusammen und wird nun kurz zusammengefasst. Zur Klonierung bestimmter Gene oder Genbereiche in verschiedene Vektoren musste anfangs die entsprechende kodierende Sequenz mittels PCR (4.4.2.2) amplifiziert werden. Als Template DNA dienten hierbei cDNAs, kommerziell erworbene cDNA-Klone oder bereits vorhandene Plasmid-DNAs. Die PCR-Fragmente wurden nach elektrophoretischer Auftrennung (4.4.4) aus dem Agarosegel geschnitten und gereinigt (4.4.5). Die gereinigten Fragmente und Zielvektoren wurden nun mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (4.4.7) behandelt und nach erneuter Reinigung aus einem Agarosegel mittels Ligation (4.4.8) zusammengefügt. Die Ligationsansätze mussten in *E. coli*-DH5α-Zellen transformiert (4.3.6) werden. Nach Ermittlung positiver Transformanten mittels Kolonie-PCR (4.4.2.3), wurden die klonierten Plasmide mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid Kits (4.4.1) isoliert und in Teilbereichen zu je 800 bp sequenziert (4.4.9). Nach Auswertung der Basensequenzen konnten positive Klone in größere Kulturen überimpft und Plasmid-DNAs in größeren Mengen gewonnen werden (4.4.1). Dienten die erzeugten Plasmide der bakteriellen Expression von Fusionsproteinen (GST, MBP), so mussten die Plasmide abschließend in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transformiert werden (4.3.6).

### **4.5 RNA-spezifische Methoden**

#### **4.5.1 Isolierung von RNA aus Zellen und Geweben**

Die RNA-Isolierung aus Geweben und Säugetierzellen (HEK293-EBNA) wurde mit Hilfe einer Silica-basierten Membran durch den „RNeasy® Kit“ (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Vor Beginn der RNA-Isolierung aus Geweben wurde dieses unter Verwendung des „TissueLyser“ 2 min bei 30 Hz homogenisiert und aufgeschlossen. Der Aufschluss von Säugetierzellen erfolgte mit Hilfe des „QIAshredder Kits“ (Qiagen). Zur Quantifizierung der



isolierten RNA wurde eine photometrische Messung mittels NanoDrop® durchgeführt. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm reiner RNA liegt idealerweise bei 2,0.

#### 4.5.2 cDNA-Synthese aus RNA mittels Reverser Transkription

Zur Durchführung einer RT-PCR (4.4.2.4) oder zur Amplifikation von Genen für die Klonierung musste isolierte RNA in cDNA revers transkribiert werden. Dies erfolgte unter Verwendung der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reversen Transkriptase des „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit“ der Firma Fermentas. Der Ablauf der Reaktion mit 1 µg RNA ist in Tabelle 35 dargestellt.

Reaktionsschritt #	Zugabe Komponente	Temperatur	Zeit
1	x µl RNA (1 µg)	70°C	5 min
	1 µl Random Hexamer Primer (100 µM)		
	10 - x µl H <sub>2</sub> O (RNase frei)		
2	4 µl Reaktionspuffer (5x)	25°C	5 min
	1 µl H <sub>2</sub> O (RNase frei)		
	2 µl dNTPs (10 mM)		
3	1 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl)	25°C	10 min
4		42°C	60 min
5		70°C	10 min

Tab. 35: Reaktionsablauf der cDNA-Synthese aus RNA.

## 4.6 Protein-basierte biochemische Analysen

### 4.6.1 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Zur Quantifizierung von Proteinlösungen wurde die Methode nach Bradford verwendet. Dazu wurden pro Probe 800 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> mit 200 µl Roti®-Quant Lösung gemischt, mit je 5 µl Messprobe versetzt. Nach 15 min Inkubation wurde nun die Absorption der Lösungen bei 595 nm photometrisch bestimmt. Die Absorptionsänderungen der Messproben im Vergleich zur Nullprobe (Puffer) sind dabei in einem weiten Bereich proportional zu den Proteinkonzentrationen. Zur zusätzlichen absoluten Quantifizierung der Proteinlösungen wurden Eichgeraden mit verschiedenen BSA-Verdünnungen (0,1; 0,2; 0,25; 0,5; 0,75; 1 mg/ml) im jeweiligen Puffer erstellt.

### 4.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit 10 bzw. 12,5%igen Gelen nach dem System von Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt (Tab. 36). Die zu analysierenden Proteinproben wurden dabei durch Zugabe von 1x Laemmli-Probenpuffer denaturiert, reduziert und durch SDS mit einer von der Proteinbeschaffenheit unabhängigen

negativen Ladung versehen. Die Proteine werden im Sammelgel konzentriert und anschließend ausschließlich aufgrund ihres Größenunterschiedes im Trenngel aufgetrennt. Zur Visualisierung der Proteine wurde je nach Fragestellung auf eine Coomassie-Färbung (alle Proteine) bzw. eine Analyse durch Western Blot (Antikörper-spezifisch) zurückgegriffen. Die theoretischen Molekularmassen konnten dabei durch die zusätzliche Auftragung von Proteingrößenstandards (3.8) aufgrund ihrer relativen Laufstrecke abgeschätzt werden.

Eigenschaften	„kleines“ Gel	„großes“ Gel
Spuren	10	15
Max. Probenvolumen	50 µl	80 µl
Abmessungen Trenngel	8,3 x 5,3 cm	14,3 x 5,5 cm

**Tab. 36: Eigenschaften der verwendeten SDS-Polyacrylamidgеле.**

Zur Herstellung der Gele wurden zu Anfang die einzelnen Komponenten des Trenngels (Tab. 37) vermischt, in vorbereitete, auf Dichtigkeit geprüfte Gießapparaturen gegossen und mit einer Schicht Isopropanol (ca. 500 µl) überlagert.

Trenngel	10%	12,5%
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	8,1 ml	7,35 ml
Acrylamidlösung (40%)	4,5 ml	5,625 ml
Trenngelpuffer (pH 8,8)	4,5 ml	4,5 ml
SDS-Lösung (20%)	90 µl	90 µl
APS (40%)	120 µl	120 µl
TEMED	12 µl	12 µl

**Tab. 37: Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE.**

Nach Auspolymerisierung des Trenngels (ca. 20-30 min) konnte die Isopropanolschicht verworfen und das Sammelgel vorbereitet werden (Tab. 38). Die zweite Gelschicht wurde nun zwischen die Glasplatten gegossen und mit dem entsprechenden Probenkamm versehen. Nach weiteren 10 min konnte das fertige Gel für die Elektrophorese verwendet werden. Diese wurde durch Einstellung von 1000 mA und 150 V für 60-90 min in einem Tris-Glycin basierten SDS-PAGE-Laufpuffer (3.10) durchgeführt.

Sammelgel	5%
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	3,6 ml
Acrylamidlösung (40%)	750 µl
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,5 ml
SDS-Lösung (20%)	30 µl
APS (40%)	60 µl
TEMED	12 µl

**Tab. 38: Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE.**

#### 4.6.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Die unspezifische Detektion der aufgetrennten Proteine eines SDS-Gels wurde mittels ü.N.-Inkubation mit einer Coomassie-Färbelösung bewerkstelligt. Coomassie Brilliant Blue G 250 bindet an basische Aminosäureseitenketten und besitzt eine Nachweisgrenze von ca. 100 ng. Zur Entfärbung wurde das SDS-Gel dreimal für je 1 h in Coomassie-Entfärbelösung inkubiert.

#### 4.6.4 Blotting von Proteinen nach Towbin

Zur Immundetektion von Proteinen wurde standardmäßig die Methode des Western Blots nach Towbin angewendet (Towbin et al. 1979). Die aufgetrennten, negativ geladenen Proteine der SDS-PAGE wandern dabei im elektrischen Feld einer Semi-Dry Transferapparatur Richtung Kathode und werden somit auf eine PVDF-Membran übertragen. Das Blot-Sandwich musste dazu von unten nach oben betrachtet in der Reihenfolge Anode, Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel, Whatman-Papier und Kathode blasenfrei aufgebaut werden. Die Whatman-Papiere sowie das SDS-Gel wurden zuvor 5 min in Towbin-Blotpuffer (Tab. 39) inkubiert. Die Membran wurde für 5 min in Methanol aktiviert.

Komponente	Volumen
10x Towbin-Puffer	10 ml
Methanol	10 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	80 ml

Tab. 39: Towbin-Puffer für Proteinblot auf PVDF-Membran.

Die Blotprozedur erfolgte für 40 min mit den Einstellungen 1000 mA und 24 V. Nach erfolgreicher Übertragung der Proteine auf die Membranen konnten diese für den Immunblot verwendet werden (4.7.4).

#### 4.6.5 Coomassie-Färbung von PVDF-Membranen

Die unspezifische Anfärbung der Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte analog zu SDS-Gelen, jedoch musste hier die Inkubationszeit mit der Coomassie-Färbelösung zur Verringerung der unspezifischen Hintergrundfärbung auf 10 min reduziert werden.

#### 4.6.6 Expression und Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine

Für die Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen wurden *E. coli* BL21(DE3) mit den jeweiligen pGEX4T1- bzw. pGEX4T3-Konstrukten transformiert (4.3.6) und auf LB-Selektionsplatten ausgebracht. Aus Einzelkolonien wurden nun je 50 ml LB<sub>Amp</sub>-Bakterienmedium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 180 Umdrehungen

pro Minute inkubiert. Die Vorkultur wurde am folgenden Tag mit 150 ml frischem LB-Selektionsmedium verdünnt. Bei einer  $OD_{600} > 0,5$  wurde die Expression des Plasmids durch Zugabe von 600  $\mu$ l IPTG (0,1 M) für 3 h bei 37°C induziert. Nach Ernte der Zellen bei 4000 x g für 15 min folgte ein Waschschriff mit 10 ml kaltem 1x PBS. Die erneut pelletierten Zellen (4000 x g, 10 min) wurden nun in 10 ml GST-Lysepuffer aufgenommen und durch eine FRENCH® Press Behandlung mechanisch aufgeschlossen. Das Zelllysate wurde nach Klärung bei 7000 x g für 10 min und 4°C zu 250  $\mu$ l Glutathion Sepharose 4B Beads (GS4B) gegeben und bei langsamen Rotieren für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Beads waren zuvor dreimal mit jeweils 5 ml kaltem 1x PBS gewaschen worden (500 x g, 5 min). Nach Entfernung unspezifisch gebundener Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 5 ml 1x PBS konnten die GST-Fusionsproteine durch Zugabe von 500  $\mu$ l Glutathionelutionslösung eluiert oder alternativ mit 250  $\mu$ l 1x PBS sowie 0,02% Na-Azid versetzt und bei 4°C gelagert werden. In Lösung gebrachte GST-Fusionsproteine wurden gegen 1x PBS dialysiert. Dazu wurden die 500  $\mu$ l Elutionsfraktion in Dialyseschläuche (Ausschlussgröße 10 kDa) gefüllt und bei 4°C dreimal gegen jeweils 500 ml 1x PBS dialysiert. Der Puffer musste dabei nach je 2 h gewechselt werden; der abschließende Dialyseschriff wurde über Nacht durchgeführt.

#### **4.6.7 Expression und Aufreinigung rekombinanter MBP-Fusionsproteine**

Analog zu den GST-Fusionsproteinen wurden MBP-Fusionsproteine durch IPTG-Induktion (0,1 M) von pMalcxh-Konstrukten in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Die Zelllyse wurde durch FRENCH® Press Behandlung und einem speziellen Lysepuffer (CP-Puffer, 3.10) bewerkstelligt. Die MBP-Fusionsproteine wurden durch die Zugabe von 250  $\mu$ l Amylose Resin (NEB) angereichert und mit je 500  $\mu$ l MBP-Elutionspuffer von den Beads gelöst.

#### **4.6.8 Protein-Protein Bindungsexperimente**

##### **4.6.8.1 GST-Pulldown Experimente mit Proteinen aus Säugetierzelllysaten**

Zur Untersuchung physikalischer Interaktionen zwischen Proteinen *in vitro* wurden standardmäßig GST-Pulldown Experimente durchgeführt. Dazu wurden Zelllysate aus HEK293-EBNA-Zellen alternativ mit a) eluierten GST-Fusionsproteinen und zugefügten GS4B Beads oder b) mit bereits an GS4B Beads gebundenen GST-Fusionsproteinen versetzt und für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Nach drei Waschschriffen mit 1x PBS wurden an die Beads gebundene Proteine durch Zugabe von 1x Laemmli-Probenpuffer eluiert, bei 90°C für 5 min denaturiert, durch SDS-PAGE (4.6.2) aufgetrennt und mittels Immunblot (4.6.4, 4.7.4) analysiert.

#### 4.6.8.2 GST-Pulldown mit MBP-Fusionsproteinen

Der GST-Pulldown von MBP-Fusionsproteinen stellt eine alternative Methode zur Untersuchung direkter Protein-Protein Interaktionen dar. Dazu wurden je 7,5 µg der jeweiligen GST-Fusionsproteine mit identischen Mengen an MBP-Fusionsproteinen gemeinsam mit vorher gewaschenen GS4B Beads in einem Gesamtvolumen von 300 µl TNBN-Puffer inkubiert. Nach 1 h bei 4°C unter langsamem Rotieren wurden unspezifisch gebundene Proteine durch dreimaliges Waschen mit je 300 µl TNBN-Puffer entfernt. Die verbleibenden spezifisch gebundenen Proteine wurden durch Zugabe von 1x Laemmli-Probenpuffer gelöst. Die bei 90°C für 5 min denaturierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE (4.6.2) aufgetrennt und durch Immunblot (4.6.4, 4.7.4) mit anti-MBP-Antikörpern analysiert.

#### 4.6.9 „Microtubule Binding Protein Spin-down Assay“

Zur Untersuchung der *in vitro* Bindekapazität von Proteinen an Mikrotubuli wurde der kommerziell erhältliche „Microtubule Binding Protein Spin-down Assay Kit“ der Firma Cytoskeleton (Denver, CO, USA) verwendet. Das Grundprinzip dieses Kits beruht auf der Eigenschaft von auspolymerisierten Mikrotubuli mittels Ultrazentrifugation bei 100.000 x g pelletieren zu werden. Hierbei wurde nun geprüft, ob sich das zu untersuchende Testprotein nach Inkubation mit den vorher polymerisierten und stabilisierten Mikrotubulistrukturen und nachfolgender Ultrazentrifugation in der Pelletfraktion, was auf eine Interaktion hindeutet, oder in der Überstandfraktion, was auf eine fehlende Interaktion *in vitro* schließen lässt, befand. Der Ablauf des Assays wurde gemäß den Angaben der Herstellerfirma gestaltet. Polymerisierte Mikrotubuli wurden dabei durch die Zugabe von 2 µl Tubulin-Glycerol-Puffer zu 20 µl Tubulin (aus Rindergehirn, 5 mg/ml in G-PEM-Puffer) und Inkubation bei 35°C für exakt 20 min erhalten und nachfolgend durch die Zugabe von 200 µl einer 20 µM Taxollösung in PEM-Puffer stabilisiert. Die polymerisierten und stabilisierten Mikrotubuli wurden bei Raumtemperatur gelagert und wie in folgendem Reaktionsschema (Tab. 40) aufgezeigt mit PEM-Puffer + Taxol (300 µl PEM-Puffer + 3 µl Taxol [2 mM]) in den Assay eingesetzt.

Ansatz #	Protein	Mikrotubuli	PEM-Puffer + Taxol
1	-	20 µl	30 µl
2	1,5 µl BSA	20 µl	28,5 µl
3	16 µl MAPF	-	34 µl
4	16 µl MAPF	20 µl	14 µl
5	2-6 µg Testprotein	-	ad 50 µl
6	2-6 µg Testprotein	20 µl	ad 50 µl

Tab. 40: Reaktionsschema des „Microtubule Binding Protein Spin-down Assay“.

Die eingesetzten Volumina der Negativkontrolle BSA (5 mg/ml) bzw. der Positivkontrolle MAPF (MAP2, 1 mg/ml) resultieren in 7,5 µg respektive 16 µg Protein. Die Ansätze wurden für 30 min bei RT inkubiert und anschließend zu je 100 µl Tubulin-Glycerol-Puffer mit 20 µM Taxol gegeben. Der Puffer fungierte hierbei als eine Art Kissen bei der folgenden Ultrazentrifugation der Proben bei 100.000 x g und RT für 40 min. Aus der obersten Schicht wurden nun 50 µl des Überstandes abgenommen und mit 10 µl 5x Laemmli Puffer versetzt. Nach sorgfältiger Entfernung des restlichen Überstandes wurde das nicht sichtbare Pellet mit 50 µl 1x Laemmli aufgenommen. Nach Denaturierung der Proben für 5 min bei 90°C wurden jeweils 20 µl der Pellet- und Überstandfraktionen mittels SDS-PAGE (4.6.2) aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung (4.6.3) bzw. Western Blot (4.6.4, 4.7.4) visualisiert. Als Testproteine wurden hierbei zum einen Zelllysate aus transfizierten HEK293-EBNA-Zellen und zum anderen isolierte und aufgereinigte GST-Fusionsproteine verwendet. Die HEK293-EBNA-Zellen wurden dabei durch Sonifikation (5 x 15 sek, 30%) in Sonifikations-Lysepuffer aufgeschlossen. Die verwendeten GST-Fusionsproteine wurden nach Aufreinigung und Elution von den Beads gegen verschiedene HEPES- bzw. PIPES-basierte Puffersysteme (Dialysepuffer A-C, 3.10) dialysiert und mittels Bradford-Quantifizierungsassay vermessen.

#### 4.6.10 „Tubulin Polymerization Assay“

Zur Analyse eines möglichen Effekts von Proteinen auf die Tubulin Polymerisation *in vitro* wurde der fluoreszenzbasierte „Tubulin Polymerization Assay“ Kit der Firma Cytoskeleton (Denver, CO, USA) angewendet. Das Grundprinzip basiert hierbei auf der Erhöhung der Fluoreszenzemission bei 460 nm (Anregung 355 nm) aufgrund des Einbaus eines Fluoreszenzreporters in die auspolymerisierenden Mikrotubuli. Durch Auftragung der Messwerte als Funktion der Zeit konnte der Polymerisierungsprozess sichtbar gemacht werden. Je nach gewünschter Fragestellung konnte dabei durch Unterschiede in der Pufferzusammensetzung der sogenannte „Enhancer-Modus“ bzw. der „Inhibitor-Modus“ gewählt werden. Mit dem „Enhancer“-Modus, bei dem grundsätzlich schlechte Bedingungen für die Polymerisierung vorhanden sind, können polymerisierungsfördernde Komponenten detektiert werden. Der „Inhibitor“-Modus, bei dem durch Zusatz von Glycerol generell gute Bedingungen herrschen, werden folglich Inhibitoren der Polymerisierung gut sichtbar. Es konnte nun der Einfluss von Testproteinen auf die charakteristischen Phasen der Polymerisierung, namens Keimbildung, Wachstum und Gleichgewicht getestet werden. Die unterschiedlichen Reaktionspuffer wurden wie in Tab. 41 beschrieben pipettiert. Anschließend wurden je 5 µl der Testkomponenten (Tab. 42) in ein 96-Well pipettiert und für 1 min bei 37°C vorgewärmt. Nun wurden je 50 µl des jeweiligen Reaktionspuffers in die einzelnen

Wells gegeben. Die Tubulin-Polymerisierung der Positiv- (MAP2, Paclitaxel) und Negativkontrollen (Nocodazol) sowie der Testproteine wurde mittels FLUOstar OPTIMA Spektrophotometer bei 460 nm und 37°C für 60 min alle 60 sek verfolgt.

Komponente	„Inhibitor-Modus“	„Enhancer-Modus“
Puffer 1	205 µl	355 µl
Tubulin-Glycerol-Puffer	150 µl	-
GTP-Lösung (100 mM)	4,4 µl	4,4 µl
Tubulin-Lösung (10 mg/ml)	85 µl	85 µl

**Tab. 41: Ansatz der Reaktionspuffers des Tubulin Polymerisations Assays.** Puffer 1: 80 mM PIPES pH 6,9; 0,5 mM EGTA; 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 µM Fluoreszenzreporter. Tubulin-Glycerol-Puffer: 80 mM PIPES 7,0; 1 mM EGTA; 1 mM MgCl<sub>2</sub>; 60% Glycerol.

Komponente	Stammlösung	End-Konzentration
Paclitaxel	30 µM	2,7 µM
MAP2	1 mg/ml	0,09 mg/ml
Nocodazol	30 µM	2,7 µM
Testprotein	1 mg/ml	0,09 mg/ml

**Tab. 42: Testkomponenten für den Tubulin Polymerisations Assay.**

#### 4.6.11 Proteasomaktivitätsassay

Zur Ermittlung der proteasomalen Aktivität verschiedener Zellen wurden die fluoreszenzmarkierten Peptidsubstrate Z-LLE-AMC (Z-Leu-Leu-Glu-7-Amino-4-methylcumarin, Chymotrypsin-ähnlich), Boc-LRR-AMC (Boc-Leu-Arg-Arg-7-Amino-4-methylcumarin, Trypsin-ähnlich) sowie Suc-LLVY-AMC (Auc-Leu-Leu-Val-Tyr-7-Amino-4-methylcumarin, Caspase-ähnlich) verwendet. Je nach Stärke der jeweiligen Aktivität wird AMC (7-Amino-4-methylcumarin) aus den Peptiden freigesetzt. AMC kann mittels Fluoreszenzspektrometrie bei 460 nm (Anregung 355 nm) quantifiziert werden. Zur Messung wurden Zelllysate aus Fibroblastenzelllinien bzw. aus primären RPE-Kulturen benötigt. Die Zellen wurden wie bereits beschrieben trypsiniert (Abschnitt 4.2.3) und durch Zugabe von 500 µl Lysepuffer (Tab. 43) sowie mechanischer Behandlung mit einem Rührspatel aufgeschlossen.

Komponente	Konzentration
Tris pH 7,5	50 mM
NaCl	100 mM
EDTA	5 mM
NP-40	0,05 %
SDS	0,001 %

**Tab. 43: Lysepuffer für Proteasomaktivitätstests.**

Die Zelllysate wurden durch Zentrifugation bei 16.200 x g und 4°C für 10 min geklärt. Die Überstände wurden durch den Bradford Assay quantifiziert und in Gesamtproteinmengen im Bereich von 10-40 µg in die Proteasomaktivitätstests (Tab. 44) eingesetzt.

Ansatz	Protein	Substrat (250 µM)	Inhibitor (200 µM)	Puffer
Leerwert Puffer	-	-	-	100 µl
Leerwert Substrat 1	-	10 µl	-	90 µl
Probe + Substrat 1	X µl	10 µl	-	90 - X µl
Probe + Substrat 1 + Inhibitor	X µl	10 µl	10 µl	80 - X µl
Leerwert Substrat 2	-	10 µl	-	90 µl
Probe + Substrat 2	X µl	10 µl	-	90 - X µl
Probe + Substrat 2 + Inhibitor	X µl	10 µl	10 µl	80 - X µl
Leerwert Substrat 3	-	10 µl	-	90 µl
Probe + Substrat 3	X µl	10 µl	-	90 - X µl
Probe + Substrat 3 + Inhibitor	X µl	10 µl	10 µl	80 - X µl

**Tab. 44: Exemplarisches Reaktionsschema des Proteasomaktivitätstests.**

Die Ansätze wurden in Triplikaten für 1 h bei 37°C inkubiert, bei t = 0, 15, 30, 45 und 60 min vermessen und durch Subtraktion des Substratleerwerts korrigiert. Die Werte wurden nun gegen die Zeit aufgetragen, wodurch die AMC-Freisetzung bzw. die Aktivität pro min ermittelt werden konnte. Durch anschließende Normierung auf die eingesetzte Proteinmenge wurde die Aktivität pro min und mg ermittelt. Durch Zusatz des Proteasominhibitors MG132 wurde die Spezifität der erhaltenen Messwerte gewährleistet.

#### 4.6.12 Isolierung und Enzymverdau von EZMs aus Fibroblasten und RPE-Zellen

Zur Isolierung von extrazellulärer Matrix (EZM) aus Fibroblasten- und RPE-Zellkulturen wurden konfluente bewachsene Zellkulturschalen (10 cm) verwendet. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen mit je 10 ml 1x PBS von Mediumsresten befreit und durch Zugabe von 5 ml NH<sub>4</sub>OH-Lösung (25 mM) und Inkubation für 10 min bei 37°C von den Platten gelöst. Die verbleibende EZM wurde kurz luftgetrocknet und konnte durch Zugabe von 130 µl 1x Laemmli-Probenpuffer mit Hilfe eines Zellspatels abgekratzt werden. Die Proben mussten bei 90°C für 5 min denaturiert werden und konnten anschließend durch SDS-PAGE (4.6.2) und Western Blot analysiert werden (4.6.4, 4.7.4). Alternativ dazu konnten die getrockneten EZMs vor der Elution mit 1x Laemmli-Probenpuffer verschiedenen Enzymverdauansätzen unterzogen werden. Dazu wurden die EZMs mit den in unterschiedlichen Reaktionspuffern (Tab. 45) gelösten Enzymen Trypsin, Elastase, Kollagenase, Heparinase III und Chondroitinase ABC versetzt und bei 37°C inkubiert.

Enzym	Verdaupuffer #	Verdünnung
Trypsin (5 mg/ml)	1	1:200
Kollagenase (5 mg/ml)	1	1:200
Elastase (5 mg/ml)	1	1:200
Heparinase III (5 mg/ml)	1	1:200
Chondroitinase ABC (2 mg/ml)	2	1:200

**Tab. 45: Reaktionspuffer und Enzymlösungen für EZM-Verdau.** Verdaupuffer 1: 50 mM Tris pH 8,0; 5 mM CaCl<sub>2</sub>. Verdaupuffer 2: 100 mM Tris pH 8,0; 30 mM Natriumacetat.



Zum Stopp der Reaktionen wurde Wachstumsmedium mit FBS zugesetzt. Die Lösung wurde abgesaugt und die EZM wurden mit 1x PBS gewaschen. Nach Trocknen der EZM konnten diese wie bereits beschrieben isoliert und für weitere Analysen vorbereitet werden. Die EZM-Verdauansätze konnten alternativ im 96-Well Maßstab mit anschließender ELISA-basierter Messung (4.7.9) durchgeführt werden.

#### **4.6.13 Radioaktive Markierung von Fibroblasten- bzw. RPE-EZMs**

Zur Quantifizierung der *de novo* EZM-Synthese von Fibroblasten und RPE-Zellen wurden subkonfluente Zellen in 6-Well Platten oder 3 cm Schalen mit radioaktiv markiertem L-[2,3,4,5-<sup>3</sup>H]-Prolin (1 µCi/ml), gelöst im jeweiligen Wachstumsmedium, versorgt und bis zum Erreichen der Konfluenz bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen für 1 min mit 1 ml 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von 1 ml NH<sub>4</sub>OH (25 mM) für 5 min von den Platten gelöst (Zelllysate). Einem weiteren Waschschriff mit 1 ml 1x PBS folgte die Ablösung der radioaktiv markierten EZM durch 5 min Inkubation mit 500 µl NaOH (2 M). Die EZM-Proben wurden durch Zugabe von 500 µl HCl (2 M) neutralisiert. Die Radioaktivitätsmessung von 100 µl Probe in 10 ml Szintillationsflüssigkeit erfolgte unter Anleitung von Dr. Stephan Wenzl am Lehrstuhl für Biochemie I der Universität Regensburg. Die erhaltenen cpm-Werte („counts per minute“) wurden durch Subtraktion des Nullwerts (10 ml Szintillationsflüssigkeit) korrigiert und relativ zu den eingesetzten Protein- (RPE-Zellen, Bradfordmessung) bzw. DNA-Mengen (Fibroblasten, PicoGreen®-Messung) der Zelllysate berechnet.

### **4.7 Immunologische Methoden**

#### **4.7.1 Herstellung polyklonaler Antikörperseren**

Die Herstellung von polyklonalen Antikörperseren erfolgte durch die Firma Davids Biotechnology (Regensburg). Dazu mussten GST-Fusionsproteine als Antigene durch Klonierung erzeugt, mit GST-Beads aufgereinigt und mit Elutionspuffer in Lösung gebracht werden. Die eluierten Proteinlösungen wurden gegen 1x PBS dialysiert und mittels Bradford-Assay quantifiziert. Die Fusionsproteine wurden nachfolgend in einem Gesamtvolumen von 1 ml für die Erzeugung der polyklonalen Antikörperseren an die Firma Davids Biotechnology gegeben. Dort wurden Kaninchen durch mehrmalige Immunisierung mit den Antigenen zur Produktion von Antikörpern angeregt. Die Tiere wurden abschließend zur Gewinnung der Antikörperseren ausgeblutet.

#### 4.7.2 Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren

Die nach Immunisierung erhaltenen Antikörperseren mussten nun zur Erhöhung der Spezifität gegenüber den Antigenen von den endogenen Kaninchenantikörpern sowie von Antikörpern gegen GST befreit werden. Dazu wurde eine Affinitätschromatographie unter Verwendung der HiTrap NHS-aktivierten Sepharose HP Säulchen durchgeführt. Die entsprechenden MBP-Fusionsproteine der Antigene wurden dazu wie folgt kovalent an die Säulen gekoppelt. Zu Anfang wurden die Säulchen mit 100 µl kaltem Waschpuffer A versehen und an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Durch Spülen mit 6 ml Waschpuffer A wurden die Säulchen von Isopropanolresten befreit. Anschließend wurde je 1 ml der MBP-Fusionsproteinlösungen auf die Säulchen gepumpt und dort für 35 min bei RT inkubiert. Durch abwechselndes, dreimaliges Waschen mit je 6 ml der Puffer A und B wurden die Fusionsproteine kovalent an die Säulen gebunden. Die Säulen wurden nun mit je 2 ml der neutralen Waschpuffer B und C gewaschen und waren somit für die Affinitätsreinigung der Seren bereit. Je 20 ml Testserum wurden mit 20 ml Waschpuffer C verdünnt und mehrmals über die Affinitätssäulchen geschickt. Nach erneutem Waschen mit 6 ml Waschpuffer C konnten die an die Säulchen assoziierten Antikörper durch Zugabe von Elutionspuffer gelöst werden. Die Elutionsfraktion wurden in 500 µl Aliquots aufgefangen und unmittelbar durch Zugabe von je 35 µl Neutralisationspuffer neutralisiert. Die Elutionsfraktionen wurden über Nacht gegen 1x PBS dialysiert und mittels Bradford-Assay quantifiziert. Zur Lagerung wurden Aliquots zu je 20 µl hergestellt und mit Natriumazid (0,02%) dauerhaft haltbar gemacht. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 46 zusammengefasst.

Puffer	Komponente	Konzentration
Puffer A (pH 8,3)	Ethanolamin	0,5 M
	NaCl	0,5 M
Puffer B (pH 4,0)	Natriumacetat	0,1 M
	NaCl	0,5 M
Waschpuffer A	HCl-Lösung	1 mM
Waschpuffer B (pH 7,0)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M
Waschpuffer C (pH 7,4)	Tris	0,05 M
Elutionspuffer (pH 2,3)	Glycin	0,1 M
Neutralisationspuffer	Tris	1 M

**Tab. 46: Puffer für die Aufreinigung von polyklonalen Antikörperseren.**

#### 4.7.3 Blocken von polyklonalen Antikörperseren

Um die Spezifität der aufgereinigten Antikörper zu testen, konnte die Seren unter anderem durch Zugabe eines Überschusses des jeweiligen Antigens spezifisch geblockt werden. Dazu wurden 100 µl verdünntes und gereinigtes Antikörperserum für 4 h mit 100 µg des MBP-Fusionsproteins und Amylose Resin vorinkubiert und anschließend bei 1000 x g für 3 min

pelletiert. Der Überstand wurde nun im Vergleich zu unbehandeltem Antikörperserum in immunhistochemischen Analysen verwendet.

#### 4.7.4 Immunblot

Zur Immundetektion von auf PVDF-Membranen übertragenen Proteinen wurden zu Anfang unspezifische Signale durch Schütteln der Membranen (alternativ für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C) in 3% Milchpulverlösung (in 1x PBS) abgesättigt. Anschließend wurden die Membranen mit primären Antikörperlösungen für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C inkubiert. Die Antikörperlösungen wurden abgekippt und zur Wiederverwendung bei 4°C gelagert. Die Blots wurden nun dreimal für je 10 min mit 1x PBS gewaschen und nachfolgend mit sekundärer Antikörperlösung (Meerrettichperoxidase [HRP]-gekoppelt, 1:10.000) versehen. Nach Inkubation für 1 h bei RT wurde erneut dreimal für je 10 min mit 1x PBS gewaschen. Während des letzten Waschschruttes wurden die Lumineszenzlösungen hergestellt (Tab. 47).

Lösung	Komponente	Volumen
ECL	ECL-Puffer 1	4 ml
	ECL-Puffer 2	400 µl
	ECL-Puffer 3	1,2 µl
„SuperSignal West Fento Maximum“	Lösung 1	1 ml
	Lösung 2	1 ml

Tab. 47: Lumineszenzlösungen für den Western Blot.

Die gewaschenen Blots wurden für 2 min Lumineszenzlösung geschwenkt und zwischen zwei Lagen einer Plastikfolie trocken und blasenfrei platziert. Durch Auflegen von Fotofilmen (AGFA CRONEX 5), die anschließend mit Entwickler-, Stopp (H<sub>2</sub>O)- und Fixiererlösung behandelt wurden, konnten die jeweiligen immunsensitiven Proteinbanden detektiert werden. Mehrmaliges Entwickeln einer PVDF-Membran mit verschiedenen Antikörpern konnte durch zwischenzeitliche Behandlung mit NaOH-Lösung (0,2 M) erreicht werden (30 min, RT). Zur Quantifizierung der immunsensitiven Banden wurden deren Pixelintensitäten mit Hilfe des Softwarepackets TotalLab TL100 (v2006) gemessen.

#### 4.7.5 Immunzytochemische (ICC) Färbungen von Zellen

Zur immunzytochemischen Färbung (ICC) von Proteinen in Säugetierzellen, mussten Zellen auf Poly-L-Lysin (0,1 mg/ml; HEK293-EBNA, COS-7)- bzw. Kollagen-beschichteten (1 mg/ml; LLC-PK1) Deckgläschen ausplattiert und angezogen werden. Nach Transfektion der Zellen mit den entsprechenden Expressionsplasmiden und Inkubation für 12-24 h wurden die Deckgläschen mit Hilfe einer Pinzette geerntet und mit der Zellseite nach oben in 24-Well

Platten überführt. Dort wurden die Gläschen durch Waschen mit 500 µl 1x PBS von Mediumsresten befreit und durch Inkubation für 10 min mit 2% PFA-Lösung fixiert. Um eine bessere Erhaltung der Zytoskelettstrukturen zu gewährleisten, konnte der „Mikrotubuli-Stabilisierungspuffer“ (3.10) zur Fixierung der Zellen verwendet werden. Die Reste der Fixierlösungen wurden durch dreimaliges Waschen mit je 500 µl 1x PBS komplett entfernt. Durch Inkubation für 30 min mit ICC-Blocklösung wurden unspezifische Bindestellen abgesättigt. Anschließend konnte die Primärantikörperlösung zu den Proben gegeben und für 1 h auf den Zellen inkubiert werden. Nach gründlichem Waschen mit 3 x je 500 µl 1x PBS wurde die Sekundärantikörperlösung (Alexa Fluor®-Farbstoffe, 1:800) im Dunkeln für 30 min zugegeben. Zellkerne wurden durch die Zugabe von DAPI (1:800) in die Sekundärantikörperlösung gefärbt. Dem erneuten dreimaligen Waschen mit je 500 µl 1x PBS folgte abschließend die Eindeckelung der Gläschen auf Objektträger. Dazu wurden diese mit einer Pinzette mit der Zellseite nach unten in einen Tropfen „Fluoreszenz Mounting Medium“ auf die Objektträger gegeben. Nach ca. 30 min Trocknung bei RT konnten die Gläschen am Fluoreszenzmikroskop betrachtet oder zur längeren Aufbewahrung bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

#### **4.7.6 Immunhistochemische (IHC) Färbungen von Retinaschnitten**

Zur Anfertigung von murinen Retinaschnitten wurden Augen von getöteten Mäusen (CO<sub>2</sub>-Begasung) entnommen und 2 h in 4% PFA fixiert. Die Augen wurden anschließend 3 x je 15 min mit 1x PBS gewaschen und ü.N. in 18% Suchrose entwässert. Die fixierten und entwässerten Augen wurden nun mit dem Einbettmedium „Tissue-Tek® O.C.T™ Compound“ eingebettet und mit Trockeneis schockgefroren. Nach Lagerung der Augen bei -80°C über Nacht, konnten mit Hilfe eines Kältemikrotoms Retinadünnschnitte (9 µm) angefertigt und auf Objektträgern platziert werden (6 Schnitte pro Objektträger). Die Objektträger wurden nach Trocknung bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die aufgetauten und getrockneten Schnitte wurden nun mit Liquid-Barrier-Lösung abgegrenzt und nach dem Trocknen der Barriere kurz mit 1x PBS befeuchtet. Zur Fixierung wurden die Schnitte für 10 min mit 2% PFA-Lösung behandelt. Durch dreimaliges Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte von PFA-Resten befreit. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit IHC-Blocklösung behandelt. Anschließend folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper ü.N. bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte mit Sekundärantikörperlösung (mit DAPI, 1:800) versehen und im Dunkeln für 30 min bei RT inkubiert. Die gefärbten Schnitte mussten nun erneut dreimal mit

1x PBS gewaschen werden und konnten abschließend mit einem Tropfen „Fluorescent Mounting Medium“ und einem Deckgläschen eingedeckelt werden.

#### **4.7.7 Immunpräzipitation (IP)**

Zur Untersuchung von Protein-Protein Interaktionen konnte neben verschiedenen GST-Pulldown Experimenten auch die Methode der Immunpräzipitation verwendet werden. Dazu wurden Aliquots aus mit Triton X-100 aufgeschlossenen HEK293-EBNA-Zellen, die mit den entsprechenden Proteinexpressionsplasmiden transfiziert worden waren, verwendet. Die Zelllysate wurden mit den jeweiligen Antikörperbeads bzw. löslichen Antikörpern, welche anschließend 1 h bei 4°C mit Protein-A Sepharose gefällt werden konnten, versetzt und unter Schütteln für mindestens 1 h bei 4°C in Zentrifugationssäulchen (Sigma-Aldrich) inkubiert. Nachdem die Beads nun dreimal mit Waschpuffer (0,1% Triton X-100 in 1x PBS, Komplexinhibitor 1:100) von unspezifisch gebundenen Proteinen befreit worden waren, konnten die spezifisch gebundenen Proteine durch zweimalige Zugabe von 1x Laemmli-Probenpuffer gelöst werden. Die Immunpräzipitate wurden bei 90°C für 5 min denaturiert und mittels SDS-PAGE (4.6.2) und Western Blot (4.6.4, 4.7.4) analysiert.

#### **4.7.8 „Enzym Linked Immunosorbent Assay“ (ELISA)**

Zur Detektion von EZM-gebundenen Proteinen in transfizierten HEK293-EBNA- oder in Fibroblasten-Zellen wurden 96-Well Platten mit je 15.000 Zellen bestückt und bis zum Erreichen der Konfluenz ca. 3-4 Tage bei 37°C inkubiert. HEK293-EBNA-Zellen konnten dabei zwei Tage vor der Ernte in 10 cm Schalen mit den entsprechenden Konstrukten transient transfiziert werden (4.2.6). Die Zellen in den 96-Well Platten wurden vom Medium befreit und mit je 200 µl 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen unter Bewahrung der EZM mit je 100 µl Ammoniumhydroxidlösung (NH<sub>4</sub>OH, 25 mM) für 10 min bei 37°C von der Platte abgelöst. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl 1x PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit je 200 µl ELISA-Blocklösung für 30 min bei RT abgesättigt. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte standardmäßig für 1 h mit je 50 µl einer 1:4000 Verdünnung. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl 1x PBS folgte die Inkubation mit sekundärer Antikörperlösung (1:10.000 in ELISA-Antikörperlösung) für 1 h bei RT. Zur Entfernung unspezifischer Wechselwirkungen mussten nun erneut dreimal mit je 200 µl 1x PBS gewaschen werden. Die Farbreaktion (Blaufärbung) wurde durch Zugabe von je 50 µl TNB-Substrat gestartet. Nach 15 min Inkubation wurde die Farbreaktion durch Zusatz von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung (0,18 M) gestoppt (Farbumschlag nach Gelb). Die ELISA-Signale wurden

nun durch Absorptionsmessung bei 450 nm quantifiziert. Alle Messungen wurden dabei in Triplikaten durchgeführt und durch Subtraktion des Mittelwerts der Negativkontrolle (ohne Zellen) normalisiert.

#### **4.8 Mikroskopie und mikroskopische Bildaufnahme**

Fluoreszenzmarkierte Präparate (ICC, IHC) wurden mit Hilfe eines LSM 710 Laser-Scanning Mikroskop (Zeiss) bzw. eines motorisierten AxioImager Mikroskop mit Apotom-Zubehör (Zeiss) betrachtet. Die Erstellung und Bearbeitung von Abbildungen wurde mit dem Softwarepaket AxioVision (Zeiss) bewerkstelligt.

#### **4.9 Bioinformatische Analysen**

Bioinformatische Analysen wurden unter Hilfestellung von Felix Grassmann vom Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durchgeführt. Homologe Aminosäuresequenzen von FAM161A wurden durch Datenbanksuche in Pfam (<http://www.sanger.ac.uk/>) und Psi-Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) ermittelt. Multiple Sequenzvergleiche wurden mit MAFFT unter Anwendung der E-INS-i Methode durchgeführt (Kato et al. 2005). Proteinsekundärstrukturvorhersagen der UPF0564-Domäne wurden auf dem Server Jpred3 ausgeführt (Cole et al. 2008). Weitere bioinformatische Analysen wurden mit Hilfe der Internetplattformen Expasy (<http://www.expasy.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und USCS (<http://genome.ucsc.edu/>) durchgeführt.

#### **4.10 Statistische Datenanalyse**

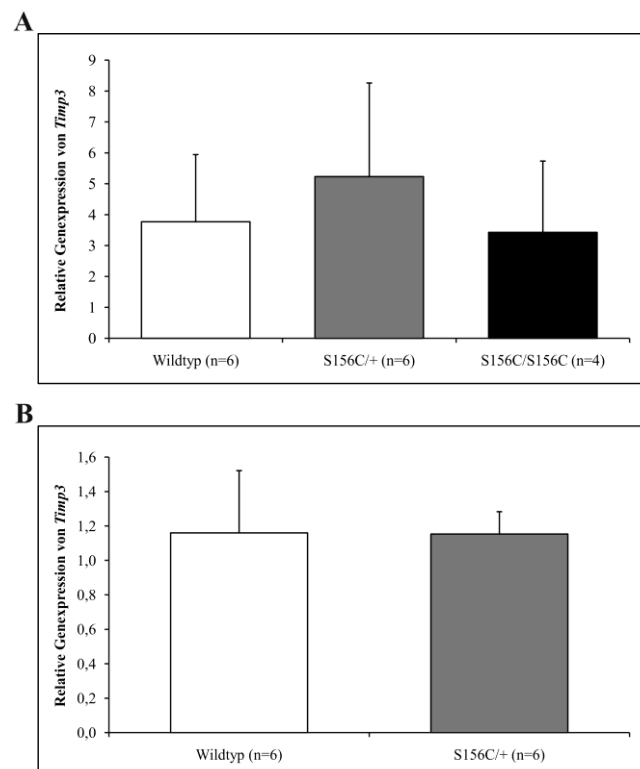
Statistische Datenanalysen wurden unter Verwendung des t-Tests der Student'schen t-Verteilung mit Signifikanzleveln von  $*P < 0,05$ ;  $**P < 0,01$  und  $***P < 0,001$  durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Projekt 1: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Sorsby Fundusdystrophie - Pathomechanismus und Funktion von TIMP3

#### 5.1.1 *Timp3*-Genexpressionsanalysen in murinen Fibroblasten- und RPE-Kulturen

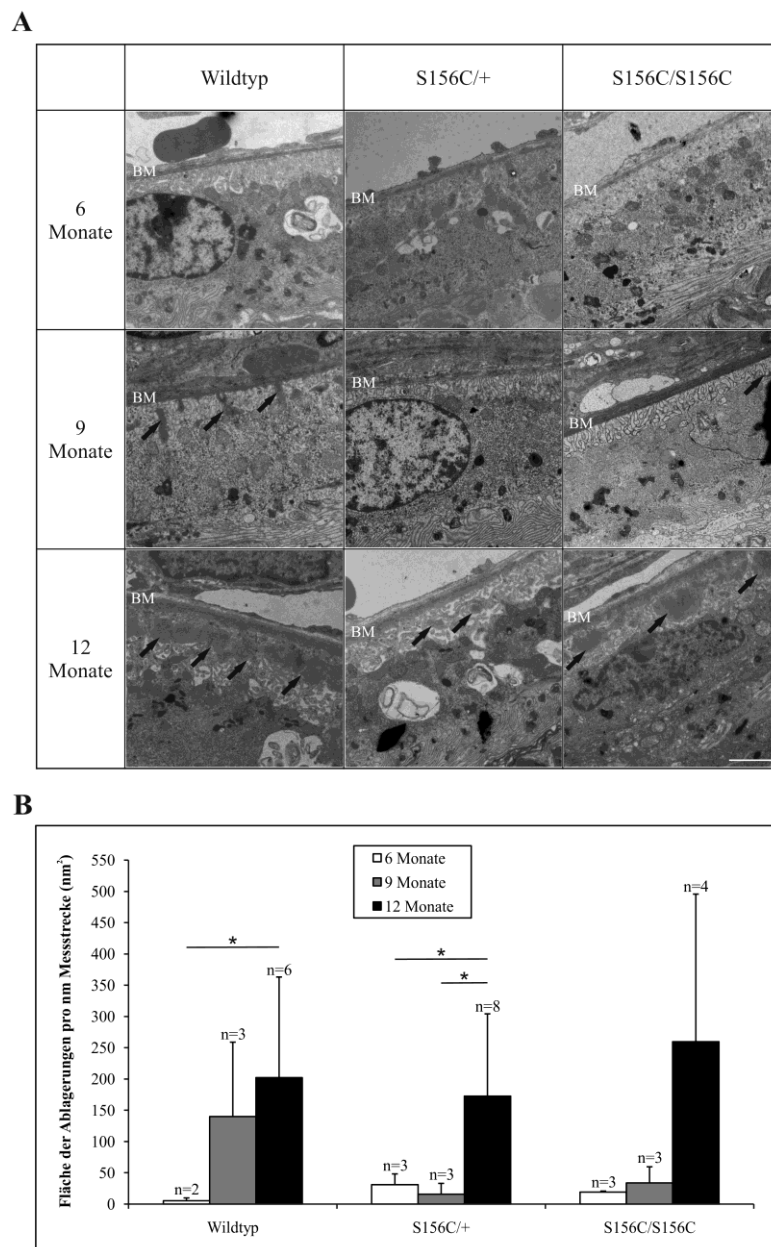
Zur Ermittlung der Genexpression von *Timp3* in Fibroblasten- und RPE-Kulturen von wildtypischen und S156C-TIMP3-exprimierenden Mäusen wurden qRT-PCR-Experimente durchgeführt (Abb. 11). In Fibroblasten-Kulturen von heterozygoten sowie homozygoten S156C-TIMP3-Mäusen konnte dabei kein statistisch signifikanter Unterschied in der *Timp3*-Genexpression im Vergleich zu Wildtypmäusen ermittelt werden (Abb. 11A). Vergleichbare Experimente in RPE-Zellen, die aus wildtypischen und heterozygoten S156C-TIMP3-Mäusen mit vergleichbarem Alter isoliert worden waren, zeigten identische Expressionsstärken des *Timp3*-Gens (Abb. 11B). Zusammenfassend konnte der TIMP3-Mutation S156C also kein Effekt, der möglicherweise durch Rückkopplungsmechanismen aufgrund fehlerhaftem TIMP3 erklärt werden könnte, auf die entsprechende *Timp3*-Genexpression in murinen Fibroblasten und RPE-Zellen zugeordnet werden.



**Abb. 11: Relative *Timp3*-Expression in Zellen aus Wildtyp- und S156C-TIMP3-Mäusen.** Auswertungen der qRT-PCR-Experimente zur relativen Genexpression von *Timp3* in Fibroblasten (A) bzw. RPE-Zellen (B) aus Wildtyp- und S156C-TIMP3-Mäusen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen. Die einzelnen Messwerte wurden jeweils relativ zum niedrigsten Wildtypwert berechnet. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ .

### 5.1.2 Ultrastrukturelle und immunhistochemische Untersuchungen der TIMP3-S156C-Knockin-Mäuse

Durch elektronenmikroskopische (EM) Experimente im Zuge der Dissertation von Andreas Janssen (Janssen 2008) konnte gezeigt werden, dass heterozygote *Timp3*<sup>S156C</sup>-Mäuse (CD1-Hintergrund) nach 3 Monaten zur Ausbildung von sub-RPE-Ablagerungen extrazellulärer Matrix neigen. Zur quantitativen Auswertung dieser Beobachtung wurden größer angelegte Studien mit 6, 9 und 12 Monate alten Mäusen (CD1-Hintergrund) durchgeführt (Abb. 12).



**Abb. 12: Elektronenmikroskopische Analysen des BM/RPE-Bereichs von wildtypischen und *Timp3*-S156C-Knockin-Mäusen.** (A) Charakteristische EM-Aufnahmen des BM-Bereichs der Augen aus WT, TIMP3-S156C-heterozygoten und TIMP3-S156C-homozygoten Mäusen. Die schwarzen Pfeile deuten auf die zu vermessenden sub-RPE-Ablagerungen. Maßstabsbalken, 2  $\mu$ m. (B) Quantitative Auswertung der vermessenen EM-Aufnahmen. Die Summe der ermittelten Ablagerungen in  $\text{nm}^2$  wurde relativ zur jeweiligen Messstrecke (nm) ausgedrückt. Das Diagramm zeigt die erhaltenen Durchschnittswerte der einzelnen Genotypen und der verschiedenen Altersstufen. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .



Aus Augen von Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> wurden Ultradünnschnitte und EM-Aufnahmen über einen Bereich von etwa 400 µm ausgehend vom Sehnerv angefertigt (Labor Prof. Dr. Ernst Tamm). Die Übersichtsaufnahmen wurden in 20 Teilbereiche zu je 20 µm unterteilt (Abb. 12A). Mit Hilfe der Software Isp Viewer wurden die sub-RPE-Ablagerungen entlang der BM quantitativ erfasst und relativ zur gemessenen Gesamtstrecke berechnet (Abb. 12B). Es zeigte sich hierbei bei allen Genotypen eine deutliche kontinuierliche Zunahme der Ablagerungen in Abhängigkeit des Alters der Tiere. In wildtypischen und heterozygoten S156C-TIMP3-Mäusen konnte die Veränderung als statistisch signifikant ermittelt werden; in homozygoten S156C-TIMP3-Tieren war der Anstieg ebenfalls deutlich, jedoch aufgrund der großen Variabilität der Messwerte statistisch nicht signifikant. Bei Wildtyp (WT)-Präparaten war weiterhin ein früherer, nach 9 Monaten einsetzender Anstieg der Ablagerungen erkennbar. Vergleicht man die Mittelwerte der Messwerte aller Genotypen nach 12 Monaten, lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied darstellen. Die Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass es sich bei den beobachteten Ablagerungen eher um ein altersbedingtes und nicht um ein durch die TIMP3-Mutation S156C hervorgerufenes Phänomen handeln könnte.

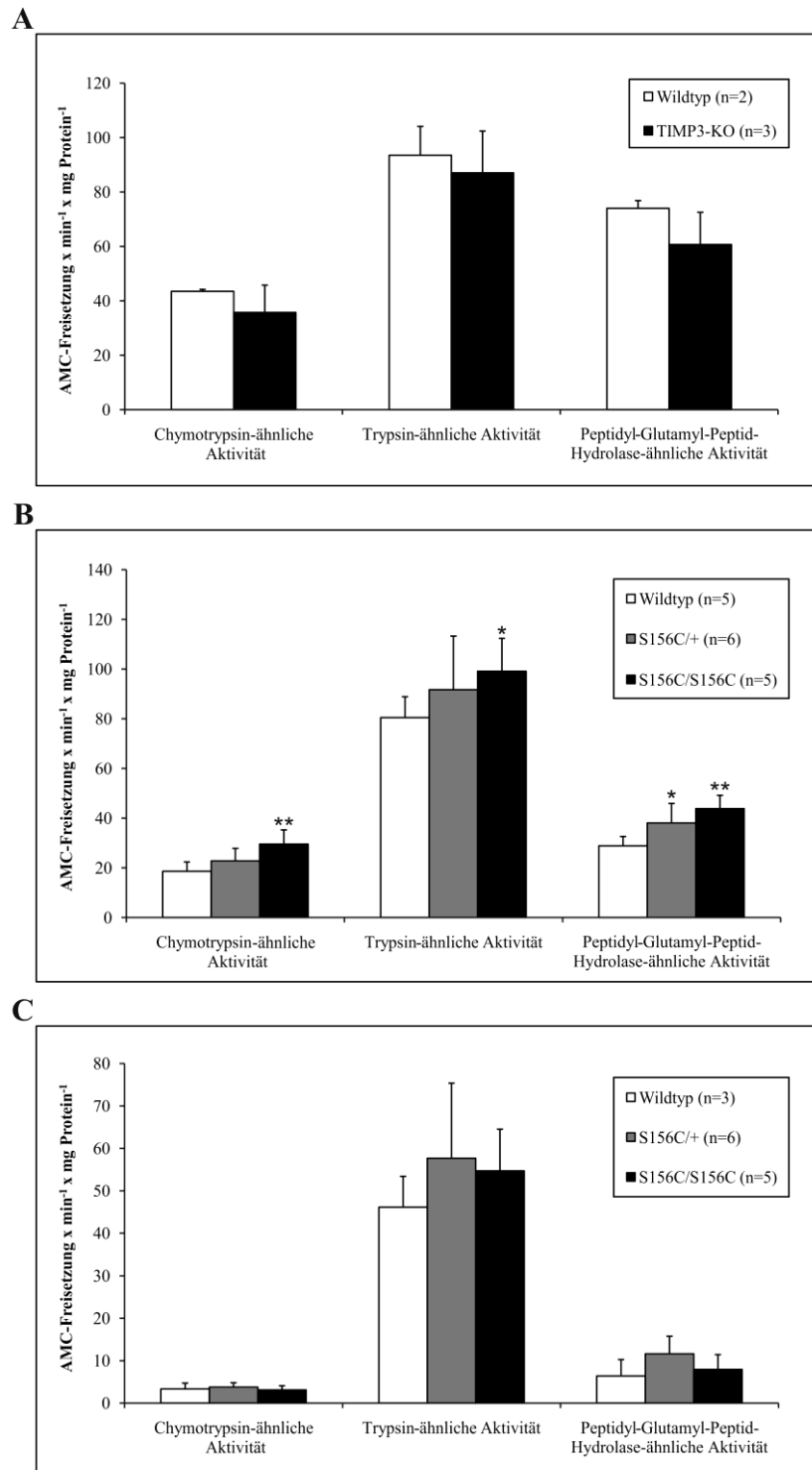
Den EM-Experimenten folgten immunhistochemische (IHC) Analysen der Augen von 1,5, 3, 4,5, 10, 12 und 16 Monate alten Tieren der verschiedenen Genotypen (2-3 Tiere pro Altersstufe, CD1-Hintergrund). Es sollte hierbei der TIMP3-Gehalt der BM (Ko-Lokalisierung mit RPE-Marker anti-RPE65) im Zusammenhang mit dem Alter der Mäuse, sowie die Beteiligung von Entzündungsprozessen als Folge der S156C-Mutation durch Färbungen mit Antikörpern gegen die Markerproteine F4/80 (Makrophagen), IBA1 (Mikroglia) und GFAP (Astrozyten) untersucht werden. Im Verlauf der Altersstadien konnte dabei eine zunehmend stärkere TIMP3-Antikörperfärbung und damit eine Anreicherung von TIMP3 in der BM beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Sowohl in WT als auch in S156C-TIMP3-mutierten Mäusen war TIMP3 ausschließlich im Bereich der BM zu finden, eine fehlerhafte TIMP3-Lokalisation aufgrund der S156C-Punktmutation hatte somit nicht stattgefunden. Eine genauere TIMP3-Quantifizierung in der BM gestaltet sich jedoch in retinalen Schnitten sehr schwierig. Zur exakten Bestimmung der TIMP3-Akkumulation müsste eine quantitativ erfassbarere Methode entwickelt werden. Nach Betrachtung der IHC-Aufnahmen der Genotypen konnten sich jedoch keine signifikanten Veränderungen in den Schichtdicken der BM oder in der eingelagerten TIMP3-Menge ermitteln lassen. Weiterhin konnten in den IHC-Färbungen mit Antikörpern gegen die Makrophagen-, Mikroglia- oder Astrozytenmarkern keine signifikanten Unterschiede in retinalen Schnitten von Augen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>,

*Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> erkannt werden. Zusammenfassend konnten somit keine auffälligen Veränderungen bezüglich Entzündungsprozessen oder der Quantität von BM-gebundenem TIMP3 in den untersuchten Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> aufgedeckt werden.

### 5.1.3 Proteasomaktivitätstests mit murinen Zellen der Genotypen *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>

Um den Effekt der TIMP3-Mutation S156C auf die korrekte Proteinfaltung und das normale Durchlaufen des sekretorischen Wegs zu überprüfen, waren in Vorarbeiten Expressionsanalysen der Komponenten des „Unfolded Protein Response“ (UPR), also der zellulären Stressantwort des Endoplasmatischen Retikulums (ER), durchgeführt worden. Mittels qRT-PCR-Analysen konnten hierbei keine signifikant unterschiedlichen Expressionslevel verschiedener UPR-Regulatoren (ATF4, ATF6, GRP78/BiP, PERK) in den Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> detektiert werden. Einen weiteren Mechanismus von eukaryotischen Zellen zur Entfernung von fehlerhaft gefalteten oder beschädigten Proteinen bildet das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Zur Ermittlung eines möglichen Einflusses von mutantern S156C-TIMP3 auf die planmäßige Funktion des UPS-Systems bzw. auf die Aktivität des Proteasoms wurden Proteasomaktivitätstest von Zelllysaten aus Fibroblasten- und primären RPE-Kulturen der verschiedenen Genotypen mit Hilfe von fluorogenen Substraten durchgeführt (Abb. 13). Die verwendeten Substrate zielten dabei auf die Chymotrypsin-ähnliche, die Trypsin-ähnliche bzw. die Caspase- oder Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase (PGPH)-ähnliche Aktivität des Proteasoms ab. Zu Anfang wurden die Proteasomaktivitäten von Fibroblastenzellen aus Wildtyp- sowie TIMP3-KO-Mäusen verglichen (Abb. 13A). Die Messungen zeigten dabei leicht verringerte, jedoch statistisch nicht signifikant veränderte Proteasomaktivitäten aufgrund der TIMP3-Defizienz. In weiteren Experimenten wurden nun die Chymotrypsin-, Trypsin-, sowie PGPH-ähnlichen Proteasomaktivitäten bei S156C-TIMP3-exprimierenden Fibroblasten ermittelt und mit den Werten aus wildtypischen Zellen verglichen (Abb. 13B). Hierbei zeigte sich gegenüber den WT-Fibroblasten eine Erhöhung aller drei gemessenen Aktivitäten aufgrund der heterozygoten und homozygoten TIMP3-Mutationen. Diese Erhöhung konnte nach statistischer Auswertung teilweise, vor allem in den homozygoten S156C-TIMP3-Fibroblasten, als statistisch signifikant bezeichnet werden (Abb. 13B). Die erhöhten Proteasomaktivitäten von S156C-TIMP3-exprimierenden Zellen konnten durch Experimente mit primären RPE-Zellen tendenziell bestätigt werden. Diese Aktivitätserhöhungen konnten nach statistischer Auswertung jedoch nicht als signifikant bezeichnet werden (Abb. 13C). Im Zuge der

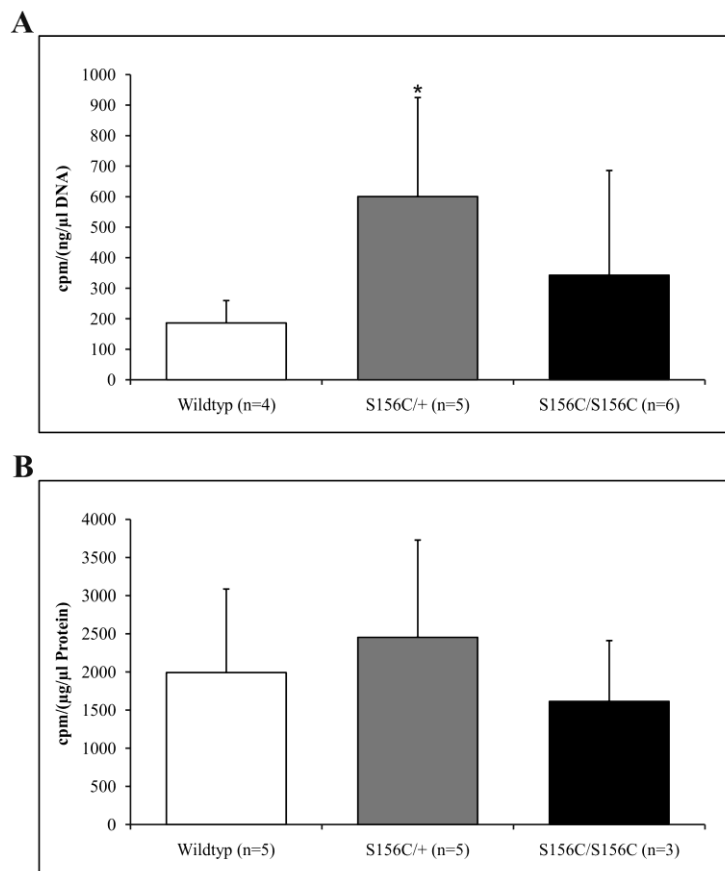
Proteasomaktivitätstest konnte zusammenfassend nur eine moderat erhöhte proteasomale Proteindegradation mit der S156C-Mutation in TIMP3 in Verbindung gebracht werden. Die anfangs vermutete Störung des Ubiquitin-Proteasom-Systems durch fehlerhaft gefaltetes oder beschädigtes S156C-TIMP3 konnte somit nicht bestätigt werden.



**Abb. 13: Proteasomaktivitätstests mit Zelllysaten aus Fibroblasten- und RPE-Zelllinien.** Messung der Proteasomaktivitäten von (A) Fibroblasten aus Wildtyp (n=2) und TIMP3-defizienten (n=3) Mäusen, (B) Fibroblasten aus WT- (n=5), S156C/+ (n=6) und S156C/S156C- (n=6) TIMP3-exprimierenden Mäusen und (C) RPE-Zellen von Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup> (n=3), *Timp3*<sup>+/+</sup>S156C (n=6) und *Timp3*<sup>+/+</sup>S156C/S156C (n=5). Student'scher t-Test: \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01. Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede zum WT.

#### 5.1.4 *De novo* EZM-Produktion muriner Zellen der Genotypen $Timp3^{+/+}$ , $Timp3^{S156C/+}$ und $Timp3^{S156C/S156C}$

Eine mögliche Konsequenz der TIMP3-Mutationen in SFD-Patienten ist die Veränderung der extrazellulären Matrix der RPE-Zellen, der BM (Chong et al. 2000). Eine Hypothese könnte somit davon ausgehen, dass mutiertes TIMP3 störend für die EZM-Homöostase ist und zur erhöhten EZM-Produktion, bzw. zu einem verringerten Umsatz der EZM führen könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde die *de novo* EZM-Produktion in verschiedenen Zelllinien bestimmt (Abb. 14).



**Abb. 14: *De novo* EZM-Produktion von Fibroblasten- und RPE-Zellen.** Statistische Auswertung der Experimente zur Messung der EZM-Neuproduktion in (A) Fibroblasten und (B) RPE-Zellen aus Mäusen der Genotypen  $Timp3^{+/+}$ ,  $Timp3^{S156C/+}$  und  $Timp3^{S156C/S156C}$ . Die Messwerte (Zerfälle pro Minute) wurden auf die jeweiligen DNA- (Fibroblasten) bzw. Proteinmengen (RPE-Zellen) normiert. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ .

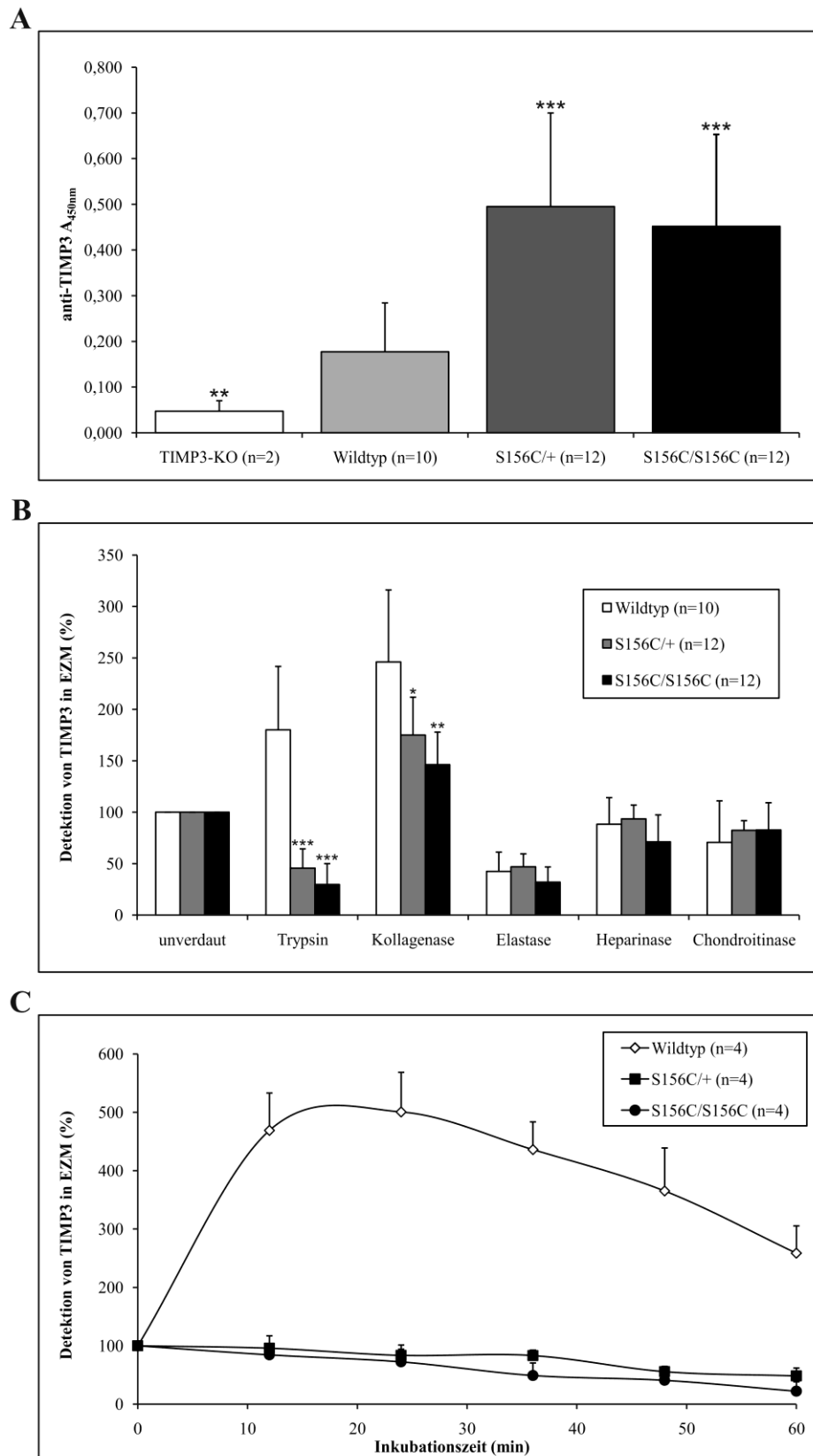
Hierbei wurde auf einen Radioaktivitäts-basierten Ansatz zurück gegriffen. Kultivierte Fibroblasten- und RPE-Zellen wurden dabei mit radioaktiv markiertem L-[2,3,4,5- $^3H$ ]-Prolin gefüttert. Prolin stellt einen Hauptbestandteil der EZM-Komponente Kollagen dar. Der Einbau von radioaktiv markiertem Prolin durch die Zellen ist dadurch ein Maß für die *de novo* Produktion der EZM. Die Messung der Zerfallsereignisse pro Minute (cpm) von isolierten Fibroblasten-EZMs deuten auf eine Erhöhung der EZM-Produktion der Fibroblasten aus  $Timp3^{S156C/+}$ - und  $Timp3^{S156C/S156C}$ -Mäusen hin (Abb. 14A). Es konnte ein statistisch

signifikanter Anstieg des Einbaus von radioaktiv markiertem Prolin in Zellen mit heterozygotem S156C-TIMP3 im Vergleich zu Zellen mit wildtypischem TIMP3 beobachtet werden (Abb. 14A). Die beschriebenen Experimente wurden analog mit primären RPE-Zellen der entsprechenden Genotypen wiederholt. Hierbei zeigten WT-Zellen und Zellen aus homozygoten Tieren vergleichbare EZM-Neusyntheseraten (Abb. 14B). Primäre RPE-Zellen aus S156C-TIMP3 heterozygoten Tieren wiesen, ähnlich wie die entsprechenden Fibroblasten, einen gesteigerten Einbau von radioaktiv markiertem Prolin und damit eine erhöhte *de novo* EZM-Synthese auf. Dieser Anstieg war quantitativ betrachtet geringer und statistisch nicht signifikant. Zusammenfassend konnte durch die Bestimmung des Einbaus von Prolin in die EZM in verschiedenen Zellen der Mäuse-Triplets eine, zum Teil signifikante, Erhöhung der EZM-Neusynthese aufgrund der heterozygoten TIMP3-Mutation S156C beobachtet werden.

### 5.1.5 Wechselwirkungen von TIMP3-Varianten mit EZM-Komponenten

#### 5.1.5.1 Experimente mit endogenem TIMP3 in murinen Fibroblastenkulturen der Genotypen *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>

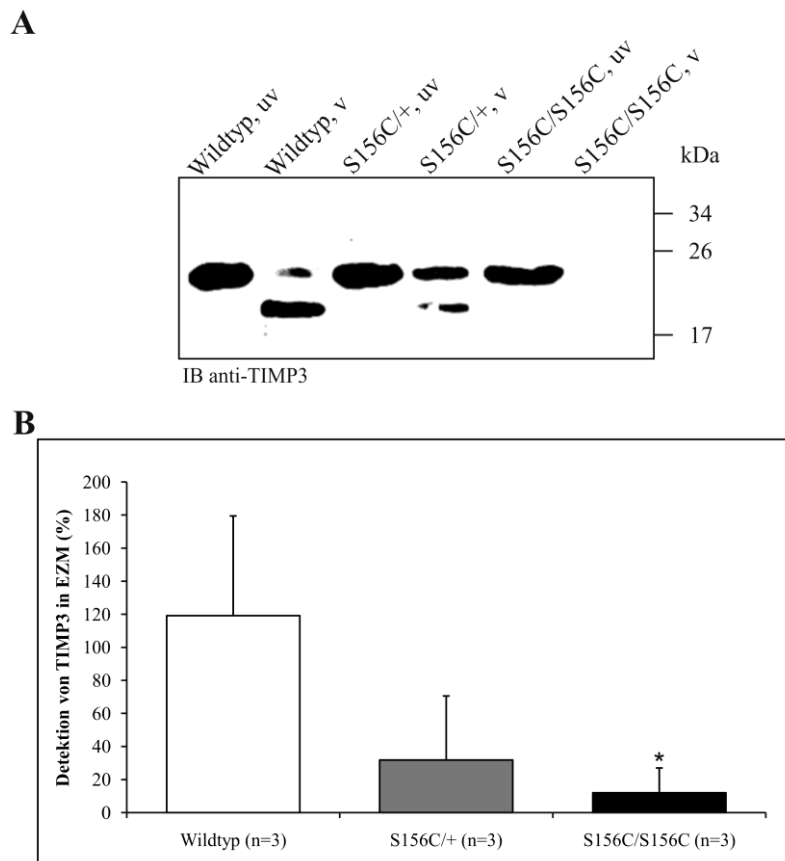
Um die Interaktionen von wildtypischem und durch Mutationen verändertem TIMP3 mit verschiedenen Komponenten der EZM zu untersuchen, wurde auf ELISA-basierte Experimente zurückgegriffen. Dazu wurden Fibroblasten der S156C-TIMP3-Triplets (*Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>) zur Produktion von EZM auf 96-Well Platten ausgebracht. Die isolierten EZMs wurden nachfolgend mit verschiedenen Enzymen, die spezifisch auf unterschiedliche Komponenten der EZM als Substrat abzielten, verdaut. Die Mengen an detektiertem EZM-gebundenen TIMP3 nach Verdau wurde nun als Maß für die Stärke der Interaktion zwischen TIMP3 und der jeweiligen verdauten Komponente herangezogen. Eine verringerte TIMP3-Detektion deutet demnach auf eine Interaktion mit der entsprechenden EZM-Komponente hin; unveränderte oder erhöhte TIMP3-Signale gaben dagegen Hinweise für eine schwache oder fehlende Interaktion. Zu Anfang wurde der ELISA-basierte TIMP3-Nachweis in Fibroblasten-EZMs etabliert. Hierzu wurden Mäuse-Fibroblasten der Genotypen *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> zur EZM-Produktion in 96-Well Platten kultiviert. Nach Entfernung der Zellen wurde EZM-gebundenes TIMP3 mittels ELISA-Experimenten quantifiziert (Abb. 15A). EZMs der TIMP3-KO-Fibroblasten zeigten dabei erwartungsgemäß nur sehr schwache und verglichen mit wildtypischen EZMs statistisch signifikant geringere ELISA-Signale mit Antikörpern gegen TIMP3. Die TIMP3-Mengen in EZMs von S156C-TIMP3-Fibroblasten waren gegenüber wildtypischen Zellen deutlich und statistisch signifikant erhöht.



**Abb. 15: Wechselwirkungen von endogenem TIMP3 mit Komponenten der EZM in Fibroblasten.** (A) ELISA-basierte Quantifizierung der TIMP3-Mengen in EZMs von Fibroblasten der Genotypen *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>. (B) ELISA-basierte Quantifizierung der TIMP3-Mengen in EZMs von Fibroblasten aus *Timp3*<sup>+/-</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Mäusen nach Verdau mit verschiedenen Enzymen. Student'scher t-Test: \**P* < 0,05; \*\**P* < 0,01; \*\*\**P* < 0,001. Sterne markieren jeweils statistisch signifikante Unterschiede im Bezug zu den Werten der entsprechenden Wildtypen. (C) Zeitabhängige ELISA-Messung von EZM-gebundenem TIMP3 aus WT-, S156C-heterozygoten und S156C-homozygoten Fibroblasten während des Trypsinverdau der EZM.

Diese Resultate sind in Einklang mit Vorarbeiten von Andreas Janssen, in denen erhöhte TIMP3-Proteinmengen in den S156C-mutierten Fibroblasten durch ICC-Analysen ermittelt worden waren (Janssen 2008). Um nun die TIMP3-Interaktionsfähigkeit gegenüber verschiedenen EZM-Komponenten in Fibroblasten der Mäusetriplets zu ermitteln, wurden die jeweiligen EZMs mit den Enzymen Trypsin, Kollagenase, Elastase, Heparinase (III) und Chondroitinase (ABC) behandelt. Die gemessenen TIMP3-Mengen nach Enzymverdau wurden nun relativ zu den ohne Verdau ermittelten ELISA-Signalen aufgetragen (Abb. 15B). Enzymverdaue mit Heparinase und Chondroitinase zeigten dabei in keinem Genotyp eine Veränderung der TIMP3-Mengen. Weiterhin war in allen drei EZMs ein Anstieg des ELISA-Signals aufgrund des Verdaus durch Kollagenase zu beobachten. TIMP3-Moleküle wurden somit durch die Kollagenasebehandlung nicht aus der EZM gelöst, sondern durch die Entfernung von Kollagen vermutlich zugänglicher für die anti-TIMP3-Antikörper. Bei wildtypischem TIMP3 zeigte sich dieser Anstieg im Vergleich zu S156C-mutiertem TIMP3 nochmals gesteigert und erreichte statistische Signifikanz. Die Erhöhung der TIMP3-Signale in allen Genotypen deutet zusammenfassend darauf hin, dass TIMP3 in der EZM keine oder nur schwache Assoziationen mit Kollagen ausbildet. Der Elastaseverdau zeigte in allen Genotypen gleichermaßen eine Verringerung der TIMP3-Signale, was auf eine Bindung von wildtypischen und mutiertem TIMP3 an Elastinkomponenten der EZM hindeutet. Die Behandlung mit Trypsin zeigte die größten Unterschiede zwischen EZMs aus wildtypischen Fibroblasten verglichen mit den S156C-TIMP3-exprimierenden Zellen. Während sich die TIMP3-Signale durch Trypsinverdau der EZMs aus wildtypischen Zellen erhöhten, wurden diese in EZMs aus *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Fibroblasten verringert. Diese statistisch signifikanten Unterschiede deuten auf eine verstärkte Assoziation von S156C-mutiertem TIMP3 mit Trypsin-sensitiven Komponenten der EZMs in Mäusefibroblasten hin. Zur detaillierteren Untersuchung des Trypsinabbaus der EZMs wurde nun ein zeitabhängiger Verdausansatz durchgeführt. Hierzu wurden Messwerte über einen Zeitraum von 60 min generiert. Die Verdaureaktionen wurden dabei durch Zugabe von Serum-haltigem Medium gestoppt. Bei Betrachtung des zeitabhängigen Verlaufs der TIMP3-Signale erkennt man, dass die zuvor erhaltenen Ergebnisse bestätigt werden konnten (Abb. 15C). TIMP3-Signale aus EZMs der wildtypischen Zellen zeigten nach einem anfänglich starken Anstieg einen kontinuierlichen aber langsamen Rückgang und erreichten nach 60-minütiger Inkubation im Vergleich zu unverdauten EZMs eine ca. 2,7-fache Gesamtsteigerung. Die TIMP3-Signale aus EZMs der *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Fibroblasten sanken dagegen von Beginn an kontinuierlich bis zum ca. 0,5-fachen des Ausgangswertes ab. Während des gesamten zeitabhängigen Verdaus waren die Werte der Wildtypzellen verglichen mit denen der

mutierten Fibroblasten statistisch signifikant höher. Diese Resultate bekräftigen die ursprünglichen Ergebnisse einer verstärkten Interaktion von S156C-TIMP3 mit Trypsin-sensitiven Bestandteilen der EZM. Zur weiteren Validierung der erhaltenen ELISA-Ergebnisse wurden nun Immunblot-basierte Experimente durchgeführt. Hierzu wurden EZMs aus Fibroblasten von *Timp3*<sup>+/+</sup>-, *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Mäusen auf Zellkulturplatten (10 cm) produziert. Die EZMs wurden nun mit und ohne Trypsinverdau in SDS-PAGE-Probenpuffer isoliert und mittels Western Blot analysiert, sowie quantifiziert (Abb. 16A).



**Abb. 16: Quantifizierung von Matrix-gebundenem TIMP3 in Fibroblasten-EZMs nach Trypsinverdau.** (A) Repräsentativer Western Blot der unverdauten (uv) und Trypsin-verdauten (v) Fibroblasten-EZMs aus den Mäusetriplets. (B) Quantitative Auswertung der Western Blot Analysen (n=3) aus (A). Mittelwerte wurden aus relativen Pixelintensitäten der TIMP3-Signale mit und ohne Trypsinverdau berechnet. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Stern markiert statistisch signifikanten Unterschied gegenüber dem Wildtyp.

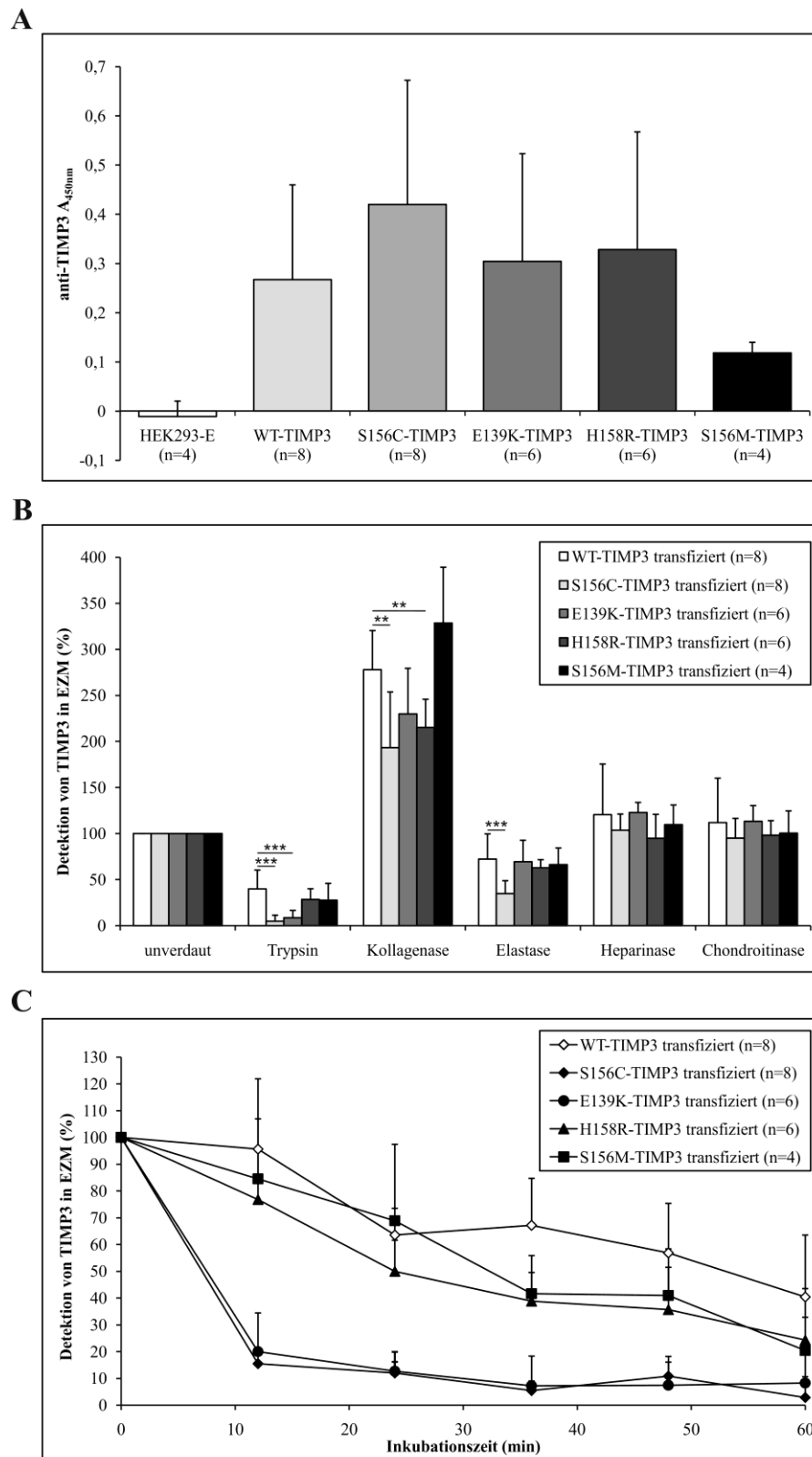
Hierbei zeigte sich im unverdauten Zustand eine distinkte TIMP3-Bande im Bereich von 24 kDa und im Anschluss an den Trypsinverdau zwei anti-TIMP3-immunsensitive Proteinbanden bei ca. 24 und 19 kDa. Die 19 kDa-Bande stellt vermutlich ein Trypsinverdauprodukt von TIMP3 dar. Zur quantitativen Auswertung der TIMP3-Signale wurde das Experiment dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die nach Trypsinverdau noch vorhandenen TIMP3-Anteile wurden relativ zu den Werten vor Enzymverdau berechnet und zur Mittelwertbildung verwendet (Abb. 16B). Die relativen TIMP3-Mengen, die durch Trypsinverdau aus der EZM gelöst werden konnten, waren in Zellen mit der S156C-Mutation im Vergleich zu



wildtypischen Zellen deutlich niedriger (Abb. 16B). Die statistische Auswertung ergab dabei signifikante Unterschiede zwischen TIMP3-wildtypischen und S156C-TIMP3-homozygoten Zellen. Zusammenfassend konnte mit Hilfe von ELISA- und Immunblot-basierten EZM-Verdauexperimenten eine verstärkte Assoziation von endogenem, S156C-mutierten TIMP3-Proteinen mit Trypsin-sensitiven EZM-Komponenten gezeigt werden. Diese Ergebnisse könnten die Hypothese einer erhöhten TIMP3-Proteinmenge bzw. eines verringerten TIMP3-Abbaus in der EZM aufgrund einer veränderten EZM-Wechselwirkung als Folge der S156C-TIMP3-Mutation bekräftigen. Um diese Hypothese an verschiedenen SFD-assoziierten und SFD-unabhängigen TIMP3-Mutationen weiter zu überprüfen, wurde nun auf transient mit TIMP3-Varianten transfizierte HEK293-EBNA-Zellen zurückgegriffen.

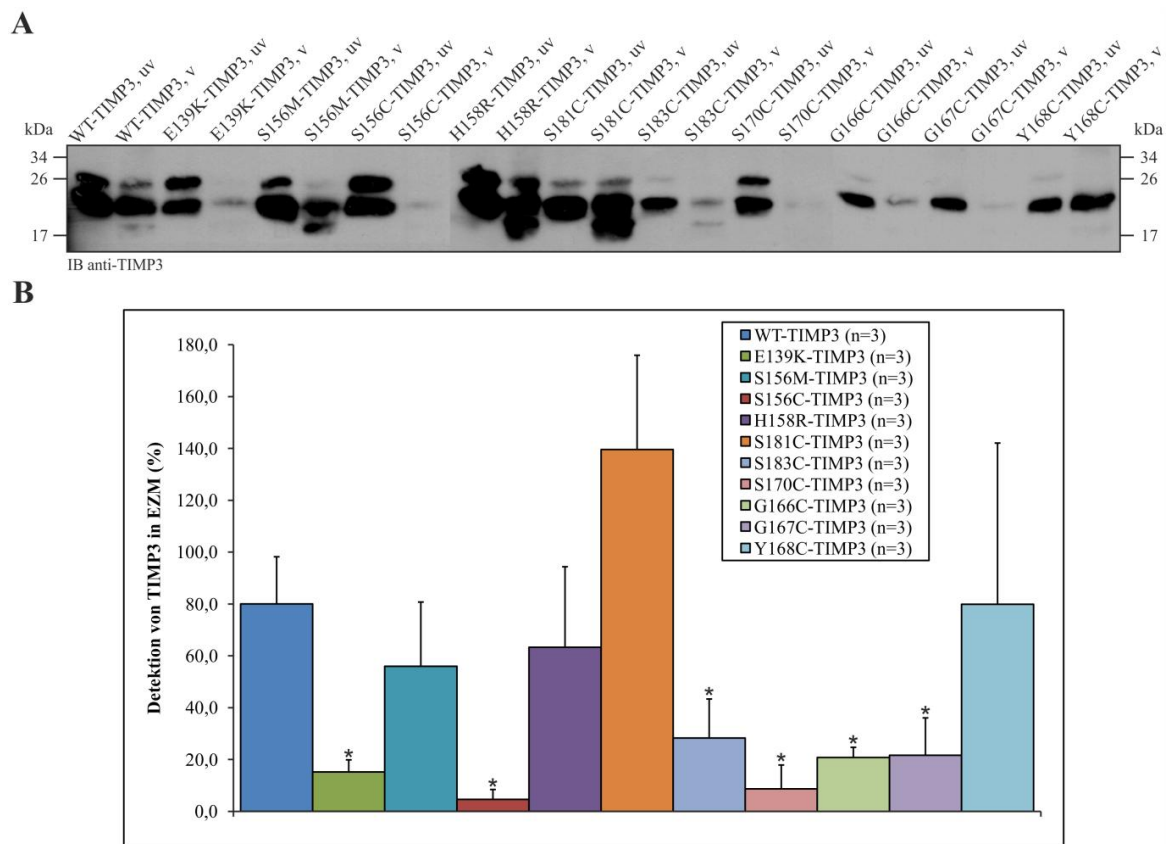
#### **5.1.5.2 Experimente mit transient überexprimiertem TIMP3 in HEK293-EBNA-Zellen**

Zur transienten Expression verschiedener TIMP3-Varianten in HEK293-EBNA-Zellen wurde die kodierende Sequenz von murinem WT-TIMP3, die in den Expressionsvektor pCEP4.1 mittels Klonierung eingebracht worden war, durch *in vitro* Mutagenese einzelner Basen manipuliert. Somit konnten punktuelle Veränderungen in die entsprechenden TIMP3-Aminosäuren eingebracht werden. Erste Expressionsversuche mit pCEP4.1-Konstrukten der wildtypischen TIMP3-Sequenz sowie der TIMP3-Varianten mit den Mutationen S156C, E139K, H158R und S156M zeigten eine vergleichbare Expression der TIMP3-Konstrukte WT, S156C, E139K und H158R, sowie eine etwa 50% geringere Expression von S156M-TIMP3 (Abb. 17A). Endogenes TIMP3, das nachfolgende Experimente verfälschen hätte können, wurde in den ELISA-basierten Messungen in HEK293-EBNA-Zellen nicht detektiert. Analog zu den zuvor beschriebenen Versuchen mit Fibroblasten-EZMs wurden nun Enzymverdauexperimente mit EZMs von transient mit den TIMP3-Expressionskonstrukten transfizierten HEK293-EBNA-Zellen durchgeführt (Abb. 17B). Dabei konnten mit den Fibroblasten-Experimenten vergleichbare Ergebnisse erhalten werden. Keines der Konstrukte zeigte eine veränderte TIMP3-Quantität aufgrund des EZM-Verdaus mit Heparinase (III) oder Chondroitinase (ABC). Dagegen zeigte sich in allen Transfektionen eine erhöhte Detektion von TIMP3 nach Behandlung der EZMs mit Kollagenase. Elastaseinkubation resultierte in allen EZMs, mit Ausnahme der aus S156C-TIMP3-transfizierten Zellen, in einer nur geringfügigen Abnahme der EZM-gebundenen TIMP3-Mengen. Die im Vergleich zum WT statistisch signifikante Verringerung an TIMP3-ELISA-Signalen deutet auf eine verstärkte Interaktion von S156C-TIMP3 mit Elastase-sensitiven EZM-Komponenten hin. Die auffälligsten Veränderungen mutierter TIMP3-Proteine in HEK293-EBNA-EZMs wurden, wie schon in den Fibroblastenexperimenten, anhand des Trypsinverdaus sichtbar (Abb. 17B).



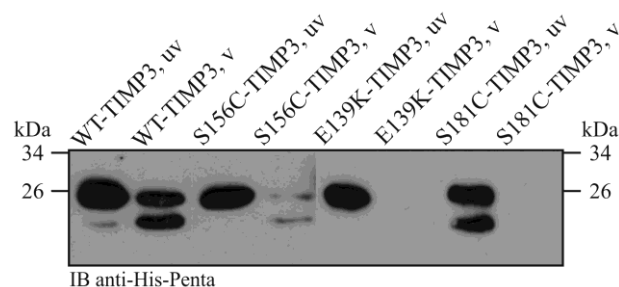
**Abb. 17: Wechselwirkungen von überexprimierten TIMP3-Varianten mit EZM-Komponenten von HEK293-EBNA-Zellen.** (A) ELISA-basierte Quantifizierung der TIMP3-Mengen in EZMs von transient mit unterschiedlichen TIMP3-Konstrukten transfizierten HEK293-EBNA-Zellen. (B) ELISA-basierte Quantifizierung der TIMP3-Mengen in EZMs von transient mit unterschiedlichen TIMP3-Konstrukten transfizierten HEK293-EBNA-Zellen nach Verdau mit verschiedenen Enzymen. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ . Sterne markieren jeweils statistisch signifikante Unterschiede im Bezug zu den Werten der entsprechenden Wildtypen. (C) Zeitabhängige ELISA-Messungen von EZM-gebundenem TIMP3 aus WT-, S156C-, E139K-, H158R- und S156M-TIMP3 transfizierten HEK293-EBNA-Zellen im Verlauf des Trypsinverdaus der EZM.

Überexprimierte S156C- sowie E139K-TIMP3-Proteine resultierten dabei im Vergleich zu WT-TIMP3 in statistisch signifikant verringerten ELISA-Signalen, während sich die Messwerte von H158R- und S156M-TIMP3 auf WT-Niveau befanden (Abb. 17B). Diese Ergebnisse konnten wiederum durch zeitabhängige Trypsinverdauexperimente bestätigt werden (Abb. 17C). In S156C- und E139K-TIMP3-Zellen zeigte sich, verglichen mit WT-, S156M und H158R-TIMP3-exprimierenden Zellen, eine schnellere Trypsinverdau-vermittelte Abnahme des TIMP3-Gehalts. Die TIMP3-Mengen der EZMs aus S156M- und H158R-TIMP3-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen lagen nach 60 min Trypsinverdau ebenfalls niedriger als der entsprechende WT-Wert. Die Resultate deuten auf eine verstärkte Interaktion von punktmutierten TIMP3-Varianten mit Trypsin-sensitiven EZM-Komponenten hin. Zur weiteren Validierung der Ergebnisse wurde nun erneut auf Immunblot-basierte Versuche zurückgegriffen. Darüber hinaus wurde das Spektrum an verfügbaren TIMP3-Mutationen durch mehrere *in vitro* Mutagenesekonstrukte (G166C, G167C, Y168C, S170C, S181C, S183C) erweitert. Die TIMP3-Mengen aus unverdauten und Trypsin-verdauten HEK293-EBNA-Zellen wurden mittels Western Blot ermittelt (Abb. 18A).



**Abb. 18: Quantifizierung von Matrix-gebundenem TIMP3 in transient mit verschiedenen TIMP3-Varianten transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.** (A) Repräsentative Western Blots der unverdauten (uv) und Trypsin-verdauten (v) EZMs aus unterschiedlich transfizierten HEK293-EBNA-Zellen. (B) Quantitative Auswertung der Western Blot Analysen (n=3) aus (A). Mittelwerte wurden aus relativen Pixelintensitäten der TIMP3-Signale mit und ohne Trypsinverdau berechnet. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ . Sterne markieren statistisch signifikante Unterschiede bezogen auf die Wildtypwerte.

Es wurden insgesamt drei unterschiedliche anti-TIMP3 immunsensitive Banden bei etwa 26, 24 und 19 kDa beobachtet. Dabei handelte es sich vermutlich um ein posttranslational modifiziertes TIMP3 (26 kDa), das Protein voller Länge (24 kDa), sowie ein Trypsin-verdautes TIMP3-Spaltprodukt (19 kDa). Die Trypsinverdauexperimente in Kombination mit Western Blots der Produkte wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die somit erhaltenen Proteinbanden wurden durch Messung der Pixelintensitäten quantifiziert und zur Mittelwertbildung, sowie zur statistischen Auswertung verwendet (Abb. 18B). Wildtypisches TIMP3 war dabei nach EZM-Verdau durch Trypsin durchschnittlich noch zu ca. 80% in der Matrix zu detektieren. Die TIMP3-Varianten mit den Aminosäuresubstitutionen S156M, H158R, S181C und Y168C zeigten verglichen mit wildtypischem TIMP3 ähnliche Tendenzen. Die TIMP3-Mutationen E139K, S156C, S183C, S170C, G166C und G177C resultierten dagegen in statistisch signifikant verringerten Signalstärken und damit in einer Reduzierung von EZM-gebundenem TIMP3 als Folge der EZM-Behandlung mit Trypsin. Diese Effekte waren unabhängig von der generellen Expressionsstärke der jeweiligen TIMP3-Varianten. So konnten sowohl stark exprimierte TIMP3-Konstrukte (z.B. S156C-TIMP3) zu einem kompletten Trypsinverdau-abhängigen Verlust von EZM-gebundenem TIMP3, als auch schwächer exprimierte TIMP3-Varianten (z.B. Y168C-TIMP3) zu einer nahezu unveränderten TIMP3-Quantität in der Trypsin-verdauten EZM führen (Abb. 18B). Zusammenfassend konnte eine verstärkte Bindung der TIMP3-Proteine mit den Mutationen E139K, S156C, S183C, S170C, G166C und G177C an Trypsin-sensitive EZM-Bestandteile konstatiert werden. Zum Abschluss der Trypsinverdauexperimente wurde nun ein Ansatz gewählt, in dem ein vom TIMP3-Epitop unabhängiger Antikörper zur Detektion von EZM-gebundenem TIMP3 verwendet werden konnte. Dazu wurden 6xHis-getagte Expressionskonstrukte der TIMP3-Varianten WT, S156C, E139K und S181C hergestellt. Unverdaute und Trypsin-verdaute EZMs von WT-, S156C-, E139K- und S181C-TIMP3-6xHis-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen wurden durch Western Blot Analysen mit anti-His-Penta-Antikörpern auf die Präsenz von EZM-gebundenem TIMP3 getestet (Abb. 19).



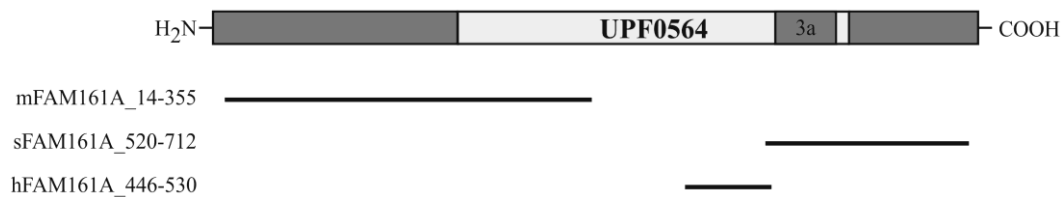
**Abb. 19: Trypsinverdau der EZMs von HEK293-EBNA-Zellen nach Überexpression mit TIMP3-6xHis-Konstrukten.** Western Blot der unverdauten (uv) und Trypsin-verdauten (v) EZMs aus transient mit verschiedenen TIMP3-6xHis transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.

Hierbei waren erneut zwei immunsensitive TIMP3-Proteinbanden bei ca. 24 und 19 kDa zu detektieren. Die erhaltenen Bandenmuster von WT-, S156C- und E139K-TIMP3 waren dabei gut im Einklang mit den zuvor erhaltenen Ergebnissen (Abb. 17-18) und bestätigten diese somit unabhängig vom zuvor verwendeten TIMP3-Antikörper. Das Konstrukt S181C-TIMP3-6xHis zeigte nach Trypsinverdau im Gegensatz zu ungetagtem S181C-TIMP3 keine detektierbaren, EZM-gebundenen TIMP3-Proteine. Diese Resultate könnten aufgrund einer höheren Instabilität des 6xHis-markierten Proteins zustande gekommen sein. Bestätigen könnte dies der Western Blot aus Abbildung 19, der bereits ohne Trypsinverdau eine zweite, etwas kleinere immunsensitive Bande zeigte.

## 5.2 Projekt 2: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Retinitis Pigmentosa (RP28) - Pathomechanismus und Funktion von FAM161A

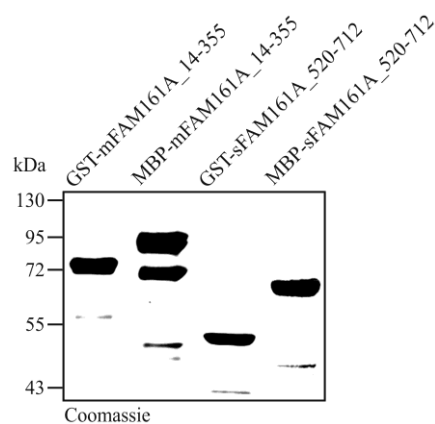
### 5.2.1 Herstellung und Aufreinigung polyklonaler Antikörperseren gegen FAM161A

Ein wichtiger Schritt zur funktionellen Charakterisierung von FAM161A war die Herstellung eines spezifischen Antikörperserums gegen murines „mFAM161A“. Zusätzlich dazu wurde versucht, ein Serum gegen das orthologe Protein der Spezies Schwein („sFAM161A“), z.B. zur Verwendung in Immunpräzipitationsversuchen, zu gewinnen. Der Epitopbereich des Antikörpers anti-sFAM161A bedeckt vollständig des Exon 3a und könnte möglicherweise zur Unterscheidung der beiden FAM161A-Isoformen verwendet werden. Zur Immunisierung wurden GST- und MBP-Fusionsproteine unterschiedlicher Regionen der FAM161A-Orthologen durch Klonierung erzeugt. Die Erkennungsbereiche der Antikörper liegen im N- (mFAM161A\_14-355) bzw. C-terminalen Bereich (sFAM161A\_520-712) (Abb. 20).



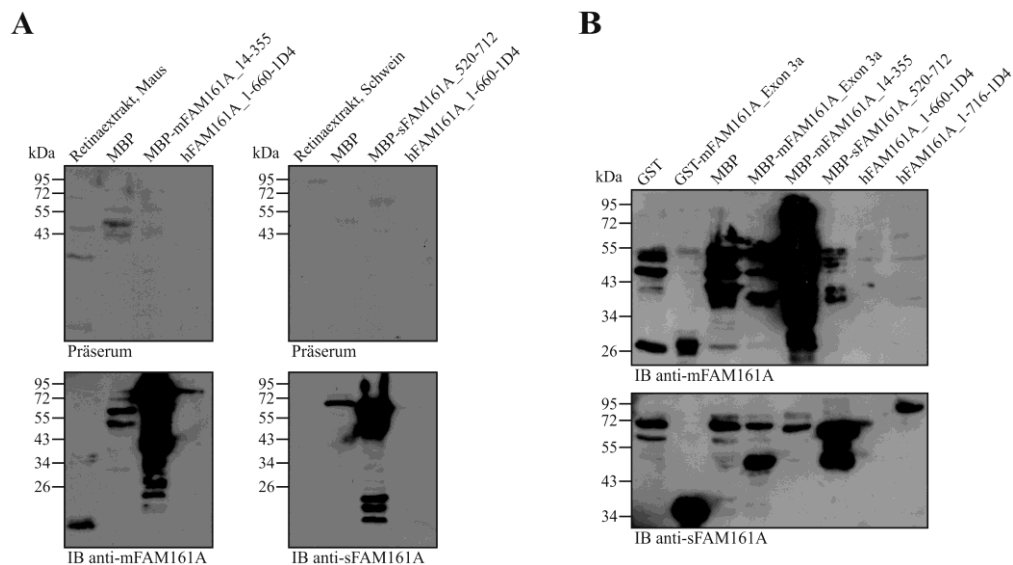
**Abb. 20: Erkennungsbereiche der verschiedenen anti-FAM161A-Antikörper.** Schematische Darstellung der Erkennungsbereiche der Antikörper anti-mFAM161A, anti-sFAM161A sowie anti-hFAM161A (kommerziell erhältlich) im Vergleich zur langen Isoform von FAM161A. Der Erkennungsbereich des Antikörpers gegen sFAM161A bedeckt das komplette Exon 3a.

Die Proteine wurden in *E. coli*-Zellen exprimiert und durch Reinigung und affinitätschromatographische Aufkonzentrierung mit Hilfe von Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow Beads (GST) bzw. Amylose Resin (MBP) in größeren Mengen gewonnen (Abb. 21).



**Abb. 21: Expression und Aufreinigung der FAM161A-Fusionsproteine zur Antikörperproduktion und -aufreinigung.** Coomassie-Färbung der mittels SDS-PAGE aufgetrennten Fusionsproteine GST-mFAM161A\_14-355 (67 kDa), MBP-mFAM161A\_14-355 (82 kDa), GST-sFAM161A\_520-712 (51 kDa) und MBP-sFAM161A\_520-712 (66 kDa).

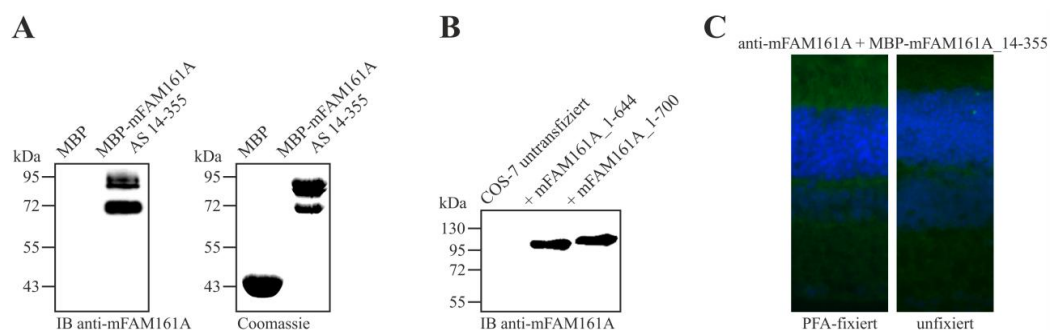
Nach Elution der Fusionsproteine von den Beads, wurden die Proteinmengen durch Bradford-Messung quantitativ erfasst (GST-mFAM161A<sub>14-355</sub>: 0,53 mg/ml; GST-sFAM161A<sub>520-712</sub>: 0,71 mg/ml). Die GST-Fusionsproteine wurden nach Dialyse gegen 1x PBS-Puffer für die Antikörperproduktion zur Firma Davids Biotechnology gegeben. Nach mehrmaliger Immunisierung von Kaninchen mit den GST-Proteinlösungen wurden Antikörperseren gewonnen, die durch Vergleich mit den entsprechenden Prä-Immunseren der Tiere auf den Erfolg der jeweiligen Antikörperproduktion getestet wurden (Abb. 22A).



**Abb. 22: Charakterisierung der durch die Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Antikörperseren.** (A) Western Blot Analysen der Prä-Immunseren im Vergleich zu den erhaltenen Antikörperseren gegen mFAM161A (linke Seite) bzw. sFAM161A (rechte Seite). (B) Western Blots zur Charakterisierung der Spezifität und Reaktivität der Seren anti-mFAM161A (oben) und anti-sFAM161A (unten).

Die beiden Prä-Immunseren, die vor Immunisierung der Kaninchen gewonnen wurden, zeigten dabei keine Reaktivität gegenüber Retinaextrakten, den bakteriell exprimierten Proteinen MBP und MBP-FAM161A, sowie dem in HEK293-EBNA-Zellen überexprimierten Fusionsprotein hFAM161A<sub>1-660-1D4</sub> aus humanem Ursprung (Abb. 22A, oben). Nach Immunisierung mit den jeweiligen Antigenen zeigten die Seren nun eine starke Reaktivität gegenüber dem entsprechenden GST-Fusionsproteinen (Abb. 22A, unten), konnten aber in Retinaextrakten der jeweiligen Spezies kein FAM161A detektieren. Weiterhin besaßen die Antikörper keine spezifische Reaktivität gegenüber MBP sowie humanem FAM161A, es konnten jedoch in den Spuren mit MBP unspezifische Banden im Bereich von 50-70 kDa detektiert werden, die vermutlich durch die nicht komplette Reinheit der zur Immunisierung verwendeten Antigene entstanden sein könnten. Weiterhin wurden die Seren bezüglich ihrer Spezifität und Reaktivität gegenüber verschiedenen FAM161A-Fusionsproteinen sowie gegen GST und MBP charakterisiert (Abb. 22B). Das Serum anti-mFAM161A zeigte dabei wie erwartet die stärkste Immunreaktivität gegenüber dem entsprechenden MBP-Fusionsprotein

des Antigens, war jedoch auch bei Verwendung weiterer, bakteriell exprimierter Proteine (bei 43-55 kDa) unspezifisch reaktiv (Abb. 22B, oben). Die Proteine GST (28 kDa) und GST-mFAM161A\_Exon-3a (30 kDa) wurden aufgrund der Verwendung eines GST-basierten Fusionsproteins als Antigen erwartungsgemäß ebenfalls detektiert. Das Antikörperserum anti-sFAM161A reagierte am effektivsten gegen die MBP-Variante des zur Immunisierung verwendete Antigens sFAM161A\_520-712 (Abb. 22B, unten). Weiterhin konnten in den Proteinextrakten bakteriellen Ursprungs unspezifische Signale bei ca. 70 kDa ermittelt werden. Mit dem anti-sFAM161A-Antikörper konnten die GST- und MBP-Fusionsproteine, die die Aminosäuren des Exons 3a von FAM161A umfassten, detektiert werden. Die Spezifität des Serums gegenüber Exon 3a wurde weiterhin durch dessen Reaktivität gegenüber humanem FAM161A\_1-716-1D4, sowie der Abwesenheit immunsensitiver Proteinbanden bei Verwendung von hFAM161A\_1-660-1D4 (ohne alternativ gespleißtes Exon 3a) verdeutlicht. Zur Erhöhung der Spezifität und Effektivität der Antikörperseren wurde eine affinitätschromatographische Aufreinigung mit Hilfe von HiTrap NHS-aktivierten Sepharose-Säulchen, an die die entsprechenden MBP-Fusionsproteine der Antigene gekoppelten waren, durchgeführt. Der Erfolg dieses Reinigungsschrittes konnte im Falle des mFAM161A-Antikörpers durch A) eine spezifische Reaktivität gegen MBP-mFAM161A\_14-355 (nicht aber gegen MBP), B) die Erkennung von überexprimiertem mFAM161A\_1-644 und mFAM161A\_1-700 (mit Exon 3a), sowie C) die Möglichkeit, die Reaktionsfähigkeit gegenüber endogenem mFAM161A in Retinaschnitten nach Vorinkubation mit dem Antigen MBP-mFAM161A\_14-355 blocken zu können, bestätigt werden (Abb. 23, Zach et al. 2012). Der Antikörper gegen sFAM161A zeigte nach Aufreinigung eine etwa zwei- bis dreifache Erhöhung der Reaktivität (Daten nicht gezeigt) und kann somit für zukünftige Anwendungen, wie z.B. Immunpräzipitation oder Western Blot, verwendet werden.

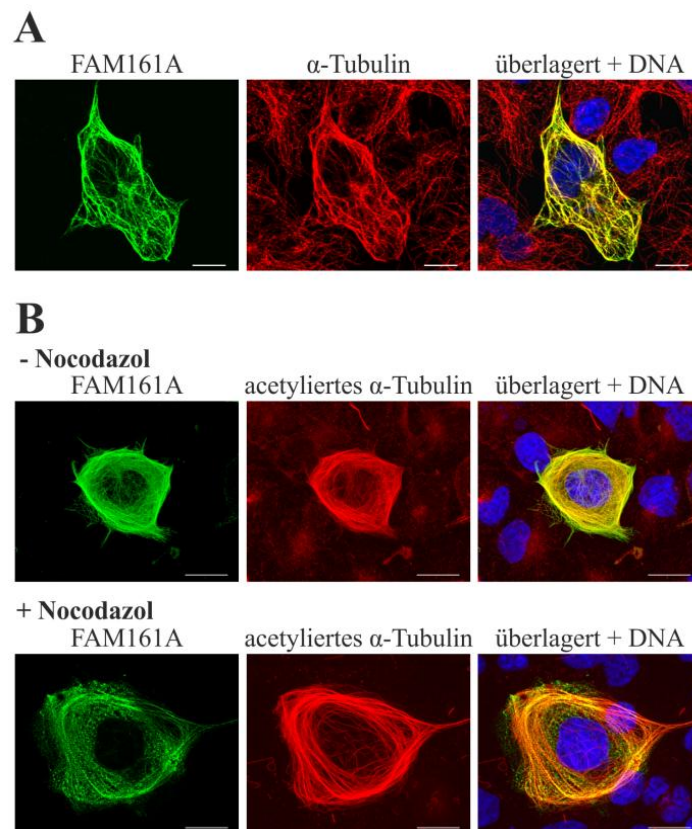


**Abb. 23: Spezifität des Antikörperserums mFAM161A nach affinitätschromatographischer Aufreinigung.** (A) Western Blot mit MBP-mFAM161A\_14-355 und MBP (anti-mFAM161A 1:20.000). Coomassie-Färbung bestätigt die Präsenz von MBP-mFAM161A\_14-355 und MBP. (B) Detektion von überexprimiertem mFAM161A\_1-644 und mFAM161A\_1-644 in transfizierten COS-7-Zellen (anti-mFAM161A 1:20.000) mittels WB. (C) Die Immunreaktivität von mFAM161A auf retinalen Schnitten von PFA-fixierten sowie unfixierten Augen konnte durch Vorinkubation des Serums mit MBP-mFAM161A\_14-355 geblockt werden. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.



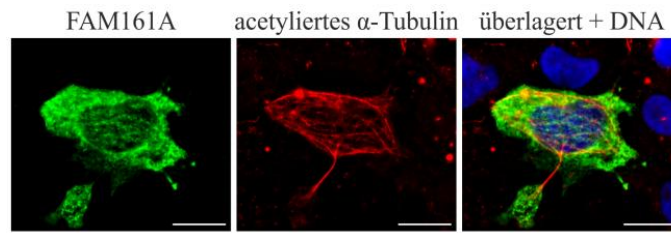
### 5.2.2 Lokalisierung und Eigenschaften von überexprimiertem FAM161A in Säugetierzellen

Zur Untersuchung der Lokalisation und der Eigenschaften des Proteins wurde FAM161A heterolog in Säugetierzellen exprimiert. Wie in Interphasezellen (Abb. 24A) veranschaulicht wird, ist überexprimiertes FAM161A (mit C-terminalem Rho1D4-Tag) in feinen Strukturen, die komplett mit dem Mikrotubulinnetzwerk im Zytoplasma von COS-7-Zellen überlappen, lokalisiert. Durch die FAM161A-Expression wird eine Bündelung und eine Veränderung der Morphologie des Netzwerk hin zu einer zunehmend kreisförmigen Struktur sowie eine Erhöhung des Acetylierungslevels der  $\alpha$ -Tubulinuntereinheiten hervorgerufen (Abb. 24B und C), welche zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Behandlung mit Nocodazol (2,5  $\mu$ M), einem Mikrotubuli-destabilisierenden Wirkstoff, führt (Abb. 24C).



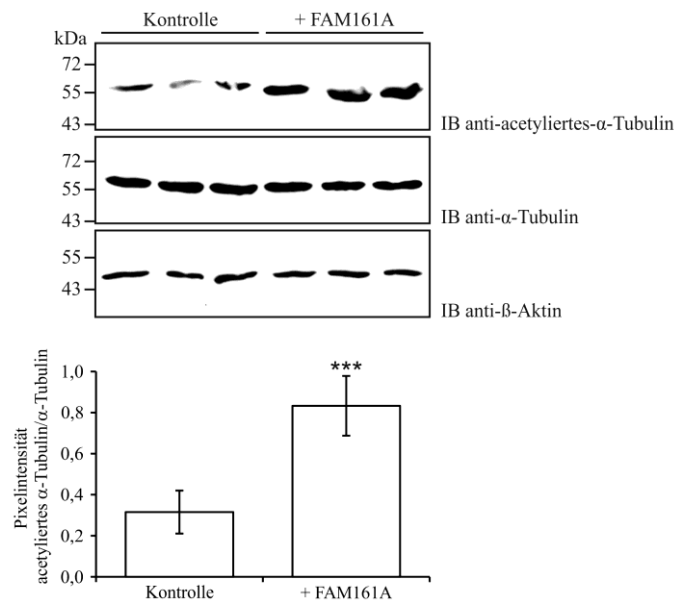
**Abb. 24: Lokalisierung und Effekte von überexprimiertem FAM161A in COS-7-Zellen.** (A) Immunfluoreszenzaufnahmen von FAM161A-transfizierten COS-7-Zellen zeigt Mikrotubuli-basierte FAM161A-Lokalisierung. Maßstabsbalken, 10  $\mu$ m. (B) Erhöhte Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin in FAM161A-transfizierten COS-7-Zellen, sichtbar durch Doppelfärbung gegen FAM161A und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin. Maßstabsblaken, 20  $\mu$ m. (C) Fluoreszenzaufnahmen FAM161A-transfizierter COS-7-Zellen nach Behandlung mit 2,5  $\mu$ M Nocodazol zeigen FAM161A-vermittelte Stabilisierung des Mikrotubulinnetzwerks. Maßstabsbalken, 20  $\mu$ m. Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Der Mikrotubulistabilisierungseffekt durch rekombinantes FAM161A geht jedoch bei einer erhöhten Nocodazolkonzentration (10  $\mu$ M) verloren (Abb. 25), was auf die Notwendigkeit der Integrität des Netzwerks für die Mikrotubulilokalisierung von FAM161A hindeutet.



**Abb. 25: Immunfluoreszenzlokalisierung von FAM161A in COS-7-Zellen nach Nocodazolbehandlung.** Ko-Immunfluoreszenzaufnahmen von FAM161A und acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin nach Behandlung mit 10  $\mu$ M Nocodazol zeigen eine Destabilisierung des Mikrotubulinetzwerks und eine daraus folgende zufällige Verteilung von FAM161A im Zytoplasma der Zelle. Maßstabsbalken, 20  $\mu$ m. Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

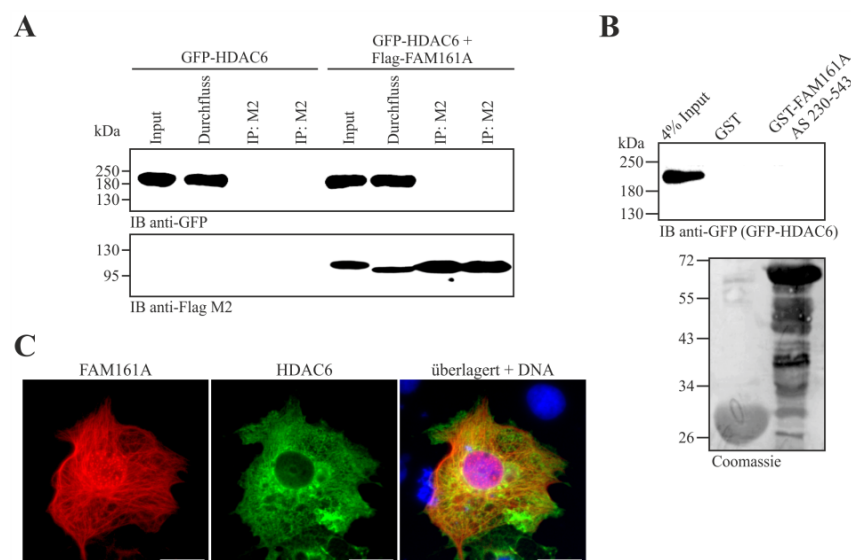
Die erhöhte Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin wurde in weiterführenden Experimenten in Zusammenarbeit mit dem Bachelorstudenten Christian Umkehrer quantitativ untersucht. Hierzu wurden Zelllysate von pCEP4.1-1D4- (Kontrolle) bzw. pCEP4.1-FAM161A-1D4-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen angefertigt und mittels WB-Analysen auf die Quantität der Proteine  $\beta$ -Aktin,  $\alpha$ -Tubulin und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin getestet. Es ergab sich eine signifikante Erhöhung des Acetylierungslevels von  $\alpha$ -Tubulin in FAM161A-exprimierenden HEK293-EBNA-Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, die mit dem pCEP4.1-1D4-Leervektor transfiziert wurden (Abb. 26, verändert nach Umkehrer 2012 und Zach et al. 2012).



**Abb. 26: Quantifizierung des Acetylierungslevels von pCEP4.1-1D4- bzw. pCEP4.1-FAM161A-1D4-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.** Western Blot Analysen von jeweils drei HEK293-EBNA-Zelllysaten von Kontroll- und FAM161A-transfizierten Zellen mit Antikörpern gegen acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin,  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Aktin (Ladekontrolle). Relative Pixelintensitäten aus jeweils sechs unabhängigen Experimenten wurden zur Ermittlung des Verhältnisses zwischen acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin und  $\alpha$ -Tubulin verwendet. Student'scher t-Test: \*\*\* $P < 0,001$ . Abbildung verändert nach Zach et al. 2012 und Umkehrer 2012.

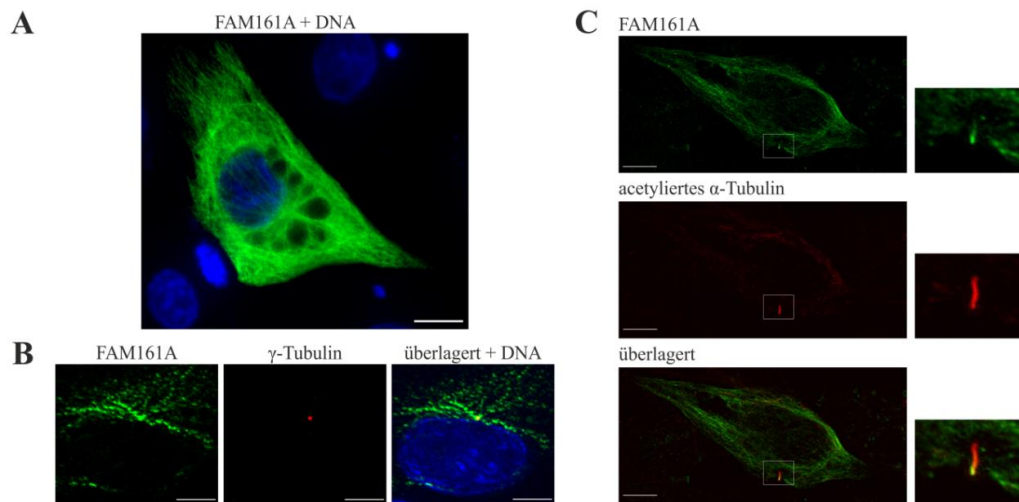
Eine denkbare Möglichkeit der Regulation des Acetylierungsstatus von Mikrotubuli stellt die Inhibierung von der Histondeacetylase HDAC6 dar (Takemura et al. 1992, Di Fulvio et al.

2011). Um diese Möglichkeit zu testen wurden GST-Pulldown-, Ko-Immunpräzipitations- sowie Ko-Lokalisationsexperimente durchgeführt (Abb. 27). Die Interaktionsexperimente wurden mit heterolog exprimiertem GFP-getagtem HDAC6 (volle Länge) und Flag-FAM161A (volle Länge), sowie mit GFP-HDAC6 und dem GST-Fusionsprotein GST-FAM161A\_230-543, das die UPF0564-Domäne umfasst, durchgeführt. Ko-Lokalisierungsversuche wurden durch Expression von GFP-HDAC6 (volle Länge) und Flag-FAM161A in COS-7-Zellen (volle Länge) ausgeführt. Hierbei zeigte sich weder eine direkte physikalische Interaktion der beiden Proteine (Abb. 27A und B), noch eine spezifische Ko-Lokalisation von HDAC6 mit den Mikrotubuli-assoziierten FAM161A-Strukturen (Abb. 27C).



**Abb. 27: Experimente zur Untersuchung einer möglichen Interaktion der Proteine FAM161A und HDAC6.** (A) Western Blot eines IP-Versuches von Flag-FAM161A mittels anti-M2 Agarose. Die GFP-HDAC6 Einzeltransfektion diente als Negativkontrolle. (B) WB (oben) eines GST-Pulldowns mit GST sowie GST-FAM161A\_230-543 und überexprimiertem GFP-HDAC6. Coomassie-Färbung (unten) der PVDF-Membran zeigt GST-Proteine. GST: 28 kDa, GST-FAM161A\_230-543: 53 kDa (C) IHC-Aufnahmen der Ko-Lokalisierung von FAM161A und HDAC6 in COS-7-Zellen. Maßstabsbalken, 20 μm.

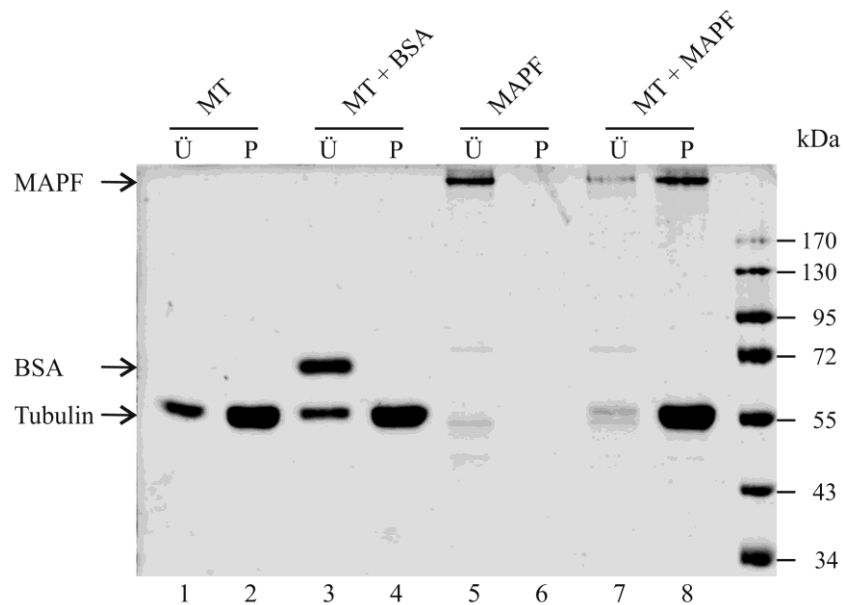
Nach der Expression von FAM161A in COS-7-Zellen wurden LLC-PK1-Zellen, die ein einzelnes primäres Zilium ausbilden, zur FAM161A-Expression verwendet, um eine denkbare FAM161A-Lokalisierung, vor allem in den primären Zilien der Zellen zu untersuchen. Die Expression von FAM161A in diesen Zellen zeigte ebenfalls eine Dekoration des  $\alpha$ -Tubulin-markierten Mikrotubulinetzwerks mit FAM161A (Abb. 28A). Im Bereich des Zentrosoms, dem Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC), kann durch Ko-Lokalisierung von FAM161A mit  $\gamma$ -Tubulin ein funktioneller Zusammenhang von FAM161A mit Zentrosomen vermutet werden (Abb. 28B). Zusätzlich zeigten Färbungen von FAM161A und acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin in primären Zilien der Zellen die Assoziation von FAM161A mit Komponenten der Ziliumbasis, einer Struktur, die analog zur Übergangszone bzw. zum Basalkörper in Photorezeptoren ist (Abb. 28C).



**Abb. 28: Überexpression von FAM161A-1D4 in LLC-PK1-Zellen.** (A) ICC-Aufnahme der Expression von FAM161A in LLC-PK1-Zellen. Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ . (B) Ko-Lokalisierung von FAM161A mit  $\gamma$ -Tubulin im Bereich des MTOCs. Maßstabsbalken, 5  $\mu\text{m}$ . (C) Ko-Lokalisierung von FAM161A mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin. Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ . Rechts: Ausschnitte aus höheren Vergrößerungen zeigen den Bereich des primären Ziliums der LLC-PK1-Zellen und die Ko-Lokalisierung von FAM161A und acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin, einem Markerprotein des Ziliums, im Bereich der Basis des Ziliums. Maßstabsbalken, 10  $\mu\text{m}$ . Kernfärbung mit DAPI. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

### 5.2.3 Physikalische Interaktion von FAM161A mit polymerisierten Mikrotubuli

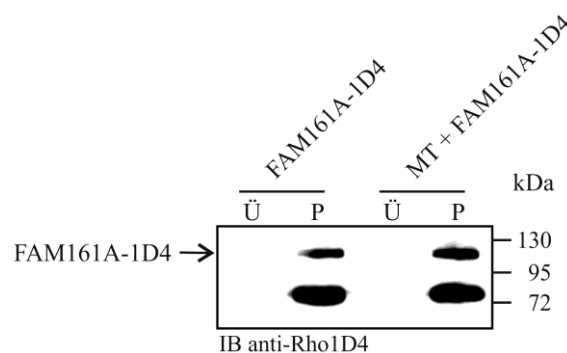
Nachdem in den vorangegangenen Versuchen eine Überlappung der FAM161A-Signale mit den Mikrotubulikomponenten  $\alpha$ -Tubulin, acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin, sowie  $\gamma$ -Tubulin mittels Fluoreszenzfärbungen beobachtet werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob zwischen FAM161A und polymerisierten Mikrotubuli eine direkte Wechselwirkung möglich ist und von welchen Bereichen des FAM161A-Polypeptids eine solche Interaktion vermittelt werden könnte. Um die Fragestellung einer direkten physikalischen Interaktion des FAM161A Proteins mit Mikrotubuli testen zu können, wurde das kommerziell erhältliche „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ Reaktionskit der Firma Cytoskeleton verwendet. Dabei werden aufgereinigte monomere Tubulinuntereinheiten zu Mikrotubulistrukturen *in vitro* polymerisiert, mit Taxol stabilisiert und auf ihre Bindungsfähigkeit bezüglich Testproteinen, im vorliegenden Fall FAM161A, getestet. Die auspolymerisierten Mikrotubuli besitzen die Eigenschaft bei 100.000 x g mittels Ultrazentrifugation in die Pelletfraktion überzugehen. Eine Ko-Sedimentation des Testproteins aus dem Überstand in das Mikrotubulipellet würde dabei auf eine physikalische Interaktion des Testproteins mit den Mikrotubuli hindeuten. Zur Etablierung des Kits wurde der Versuchsansatz mit einer mitgelieferten Positiv- (MAPF entspricht „MAP-Fraktion“ bzw. MAP2-Protein) sowie einer Negativkontrolle (BSA) durchgeführt (Abb. 29). Wie bei korrekter Durchführung und Beschaffenheit der Komponenten des Assays zu erwarten war, ließ sich eine Ko-Sedimentation des MAP2-Proteins mit den Mikrotubuli in die Pelletfraktion erreichen (Abb. 29, Spuren 7-8).



**Abb. 29: „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit Positiv- und Negativkontrollen.** Coomassie-gefarbtes SDS-Gel der Überstand- und Pelletfraktionen des „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit den Kontrollen BSA und MAPF. Tubulin, 55 kDa; BSA, 68 kDa; MAPF (MAP2), 280 kDa.

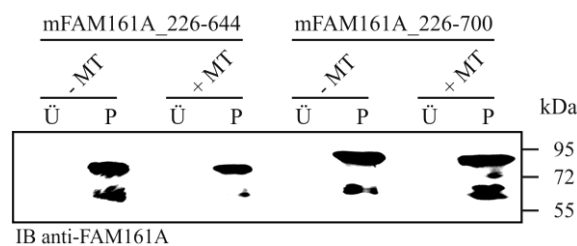
Dies war ohne zugesetzte Mikrotubuli nicht zu beobachten, das MAP2-Protein befand sich vollständig in der Überstandsfraction (Abb. 29, Spuren 5-6). Außerdem besaß BSA, trotz zugefügter Mikrotubuli keine Ko-Sedimentation mit Mikrotubuli und war dadurch ausschließlich in der Überstandsfraction nachweisbar, was eine fehlende Interaktion beider Proteine bestätigte (Abb. 29, Spuren 3-4). Darüber hinaus zeigte sich beim Vergleich der Tubulinsignale in den Überstand- und Pelletfraktionen, dass mit Hilfe der durchgeführten Ultrazentrifugation die erwartete und benötigte Pelletierungseffizienz der Mikrotubuli von mindestens 80-90% erreicht werden konnte (Abb. 29, Spuren 1-2 und 3-4).

Nach erfolgreicher Etablierung des Kits sollte nun die Bindung von FAM161A an Mikrotubuli getestet werden. Dazu wurde der Assay mit heterolog exprimiertem FAM161A-1D4, das durch Zelllyse von transient transfizierten Zellen gewonnen wurde, durchgeführt (Abb. 30).



**Abb. 30: „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit Lysaten von FAM161A-1D4-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.** Der Western Blot zeigt FAM161A-1D4-Signale in den Pelletfraktionen unabhängig von zugesetzten Mikrotubuli. Signale bei ca. 75 kDa deuten auf die Degradation von FAM161A-1D4 hin.

Die Zelllyse wurde mittels Sonifikation der transfizierten HEK293-EBNA-Zellen in Sonifikations-Lysepuffer (3.10) durchgeführt. Für die Interaktions-Assays wurden jeweils 30  $\mu$ l des Zelllysats (Bradford-Messung: 2,7 mg/ml) eingesetzt. Bei Betrachtung der Pellet- und Überstandfraktionen wurde deutlich, dass FAM161A-1D4 und ein möglicherweise durch die Sonifikation hervorgerufenen FAM161A-1D4-Degradationsprodukt unabhängig von zugesetzten Mikrotubuli in der Pelletfraktion zu finden waren (Abb. 30). Dies könnte aufgrund von Aggregations- oder Denaturierungsprozessen von FAM161A-1D4 oder durch die nicht spezifische Proteinzusammensetzung eines nicht aufgereinigten kompletten Zelllysats, in dem sich endogene Mikrotubuli und diverse Mikrotubuli-assoziierte Proteine befinden, zu Stande gekommen sein. Um die zuletzt genannte Möglichkeit zu testen, wurden GST-Fusionsproteine aus verschiedenen Teilbereichen von murinem FAM161A durch Klonierung erzeugt, exprimiert, aufgereinigt und mittels GST-Elutionspuffer in Lösung gebracht. Nach Dialyse gegen einen HEPES-basierte Dialysepuffer (Dialysepuffer A, 3.10) wurden die GST-Fusionsproteine für den Mikrotubuli-Assay verwendet. Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der Experimente nach Verwendung der murinen GST-Fusionsproteine mFAM161A\_226-644 (10  $\mu$ l, 2,2  $\mu$ g) und mFAM161A\_226-700 (30  $\mu$ l, 4,8  $\mu$ g).

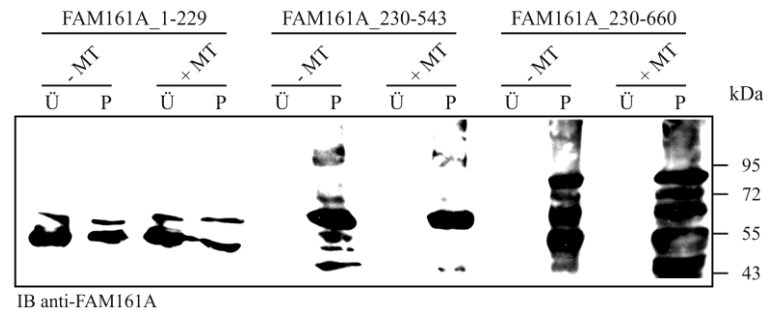


**Abb. 31: „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit den GST-Fusionsproteinen mFAM161A\_226-644 und mFAM161A\_226-700.** Western Blot der Überstand- und Pelletfraktionen zeigt Anreicherung der Proteine in den Pelletfraktionen auch in Abwesenheit von polymerisierten Mikrotubuli. Molekularmassen: mFAM161A\_226-644 (76 kDa), mFAM161A\_226-700 (83 kDa).

Es zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei Verwendung von FAM161A-1D4, sowohl das Protein mFAM161A\_226-644, als auch mFAM161A\_226-700 (mit Exon 3a) waren nach Durchführung des Assays, auch ohne den Zusatz von polymerisierten Mikrotubuli, ausschließlich in den Pelletfraktionen zu finden (Abb. 31). Somit brachte auch die Verwendung von definierten Fusionsproteinen keine Verbesserung im Vergleich zu den zuvor verwendeten Zelllysaten.

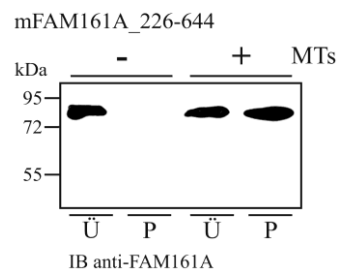
Im weiteren Verlauf wurde GST-Fusionsproteine unterschiedlicher Teilbereiche von FAM161A mit humanem Ursprung verwendet und mit Hilfe der Herstellerangaben eine Problembehandlung unter Berücksichtigung der nachfolgenden Punkten durchgeführt: Es wurde 1.) eine Zentrifugation der verwendeten Proteine unmittelbar vor Verwendung im

Assay, sowie 2.) eine Dialyse der GST-Fusionsproteine gegen alternative Pufferkomponenten, wie z.B. PIPES empfohlen. Wie sich zeigte, waren auch diese Veränderungen des Protokolls nicht dazu geeignet, die Pelletierung der Proteine GST-hFAM161A\_1-229, GST-FAM161A\_230-543 und GST-FAM161A\_230-660 in den Fraktionen ohne Zusatz von polymerisierten Mikrotubuli zu verhindern (Abb. 32).



**Abb. 32: „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit den GST-Fusionsproteinen hFAM161A\_1-229, hFAM161A\_230-543 und hFAM161A\_230-660.** Western Blots der Überstand- und Pelletfraktionen zeigt Proteine in den Pelletfraktionen auch in Abwesenheit von polymerisierten Mikrotubuli. Es wurden je 6 µg Protein verwendet. FAM161A\_1-229: 1,82 mg/ml, 53 kDa; FAM161A\_230-543: 0,26 mg/ml, 64 kDa; FAM161A\_230-660: 0,2 mg/ml, 78 kDa.

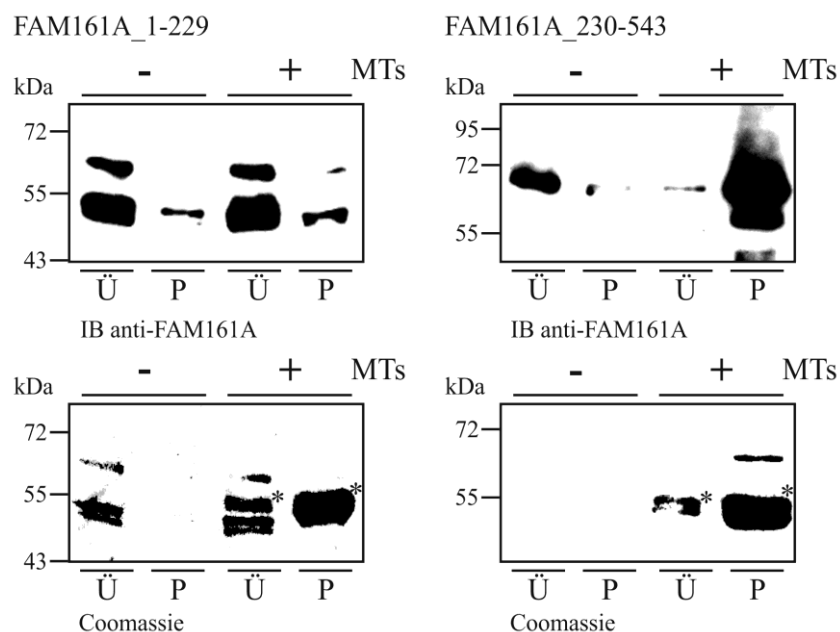
Daraufhin wurden als weitere Modifikationen 3.) verschiedene, vor allem geringere Konzentrationen der Fusionsproteine verwendet, sowie 4.) dem Elutions- und Dialysepuffern DTT (1 mM) zur Stabilisierung der Fusionsproteine zugesetzt. Weiterhin wurde 5.) besonders darauf geachtet, nach Aufreinigung und Dialyse der GST-Fusionsproteine Wartezeiten zu vermeiden und die Proteine unmittelbar nach erfolgter Dialyse für den Assay einzusetzen. Nach Berücksichtigung aller Modifikationen konnte der Mikrotubuli-interaktionsassay mit Verwendung der murinen und humanen GST-Fusionsproteine mFAM161A\_226-644 (Abb. 33), hFAM161A\_1-229 und hFAM161A\_230-543 (Abb. 34) erfolgreich durchgeführt werden.



**Abb. 33: Verbesserter „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit dem GST-Fusionsprotein mFAM161A\_226-644 murinen Ursprungs.** Western-Blot der elektrophoretisch aufgetrennten Überstand- und Pelletfraktionen. Entwicklung des Western Blots mit anti-hFAM161A. Es wurden 5 µg Protein (c = 0,53 mg/ml) eingesetzt. Theoretische Molekularmasse mFAM161A\_226-644: 76 kDa.

Abbildung 33 zeigt die Ergebnisse mit dem murinen Protein mFAM161A\_266-644, das ursprünglich in der Überstandfraktion detektiert, jedoch durch die Zugabe von polymerisierten Mikrotubuli (teilweise) in die Pelletfraktion gezogen werden konnte. Dies deutet auf eine

direkte Interaktion der Aminosäuren 226-644 des mFAM161A-Proteins mit polymerisierten Mikrotubuli hin. Durch dieses Ergebnis ließ sich vermuten, dass die ermittelte Interaktion ohne den N-terminalen Bereich, sowie ohne Beteiligung des FAM161A-Exons 3a möglich sein muss. Durch die Anwendung des Interaktionsassays auf die Fusionsproteine GST-hFAM161A\_1-229 und GST-FAM161A-230-543 aus humanem Ursprung konnten diese Hypothesen weiter untersucht werden (Abb. 34). Hierbei zeigte sich eine nahezu vollständige Ko-Sedimentation von GST-FAM161A\_230-543 mit polymerisierten Mikrotubuli in das Pellet. Ohne Zusatz von Mikrotubuli ließ sich GST-FAM161A\_230-543 größtenteils in der Überstandfraktion nachweisen. Bei Verwendung des N-terminalen Proteinteilbereichs FAM161A\_1-229 bewirkte die Zugabe von polymerisierten Mikrotubuli keine Veränderung. Das Protein konnte in beiden Fällen größtenteils in der Überstandfraktion detektiert werden. Anzumerken ist das Auftreten eines Degradationsproduktes bei ca. 45-50 kDa, das in einem kleineren Prozentsatz im Pellet, sowohl ohne als auch mit zugefügten Mikrotubuli, auftrat.

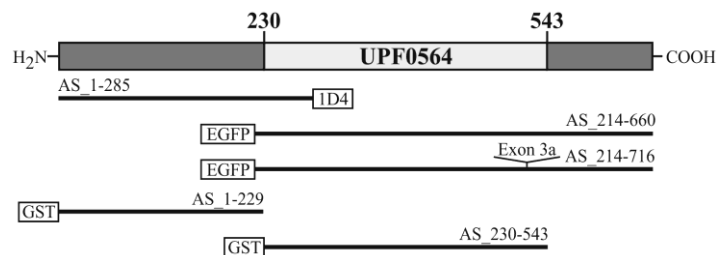


**Abb. 34: Verbesserte „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assays“ mit den GST-Fusionsproteinen FAM161A\_1-229 und FAM161A\_230-543 aus humanem Ursprung.** Entwicklung des Western Blots der elektrophoretisch aufgetrennten Überstand- und Pelletfraktionen mit anti-mFAM161A (links) bzw. anti-hFAM161A (rechts). Es wurden 4,5 µg FAM161A\_1-229 und 2 µg FAM161A\_230-543 verwendet. FAM161A\_1-229: 2,27 mg/ml, 53 kDa; FAM161A\_230-543: 0,13 mg/ml, 64 kDa. Die eingezeichneten Sterne heben die ausreichende Effizienz der Mikrotubulibildung und -pelletierung hervor. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Zusammenfassend konnte somit mit Hilfe des „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assays“ eine direkte Assoziation von FAM161A mit polymerisierten Mikrotubuli *in vitro* gezeigt werden. Weiterhin deuteten die Ergebnisse darauf hin, dass diese Interaktion durch die UPF0564-Domäne (Aminosäuren 230-543), ohne Beteiligung des N-terminalen Proteinbereichs, sowie ohne die Aminosäuren des Exons 3a ausgebildet werden kann.

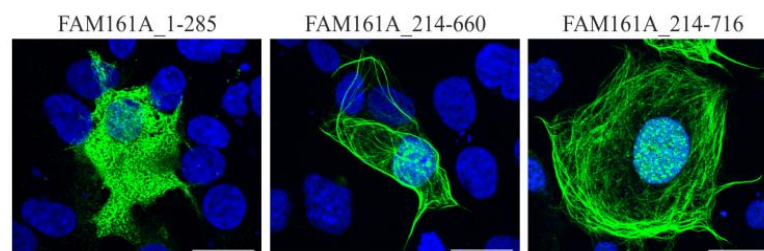


In einem weiteren Schritt sollten die Ergebnisse der „Spindown-Assays“ durch die Expression verschiedener Teilbereiche des FAM161A-Moleküls in COS-7-Zellen und die Ermittlung der Protein-Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie verifiziert werden. Dazu wurden verschiedene Teilbereiche der kodierenden Sequenz von FAM161A mit EGFP- bzw. Rho1D4-Tags versehen und durch Transfektion in COS-7-Zellen exprimiert. Abbildung 35 zeigt die Lokalisierung der entsprechenden Konstrukte im Bezug zum Protein voller Länge und verglichen mit den beiden, für den „Microtubule Binding Protein Spin-Down-Assay“ verwendeten GST-Fusionsproteinen GST-hFAM161A\_230-543 und GST-FAM161A\_1-229.



**Abb. 35: Schematische Darstellung der für die Mikrotubulibindungsversuche verwendeten FAM161A-Teilkonstrukte.** Die verwendeten Proteine bedecken die Teilbereiche des N-Terminus, der UPF0564 Domäne sowie des C-terminalen Proteinabschnittes (mit bzw. ohne die Aminosäuren des alternativ gespleißten Exon 3a). Abbildung verändert aus Zach et al. 2012.

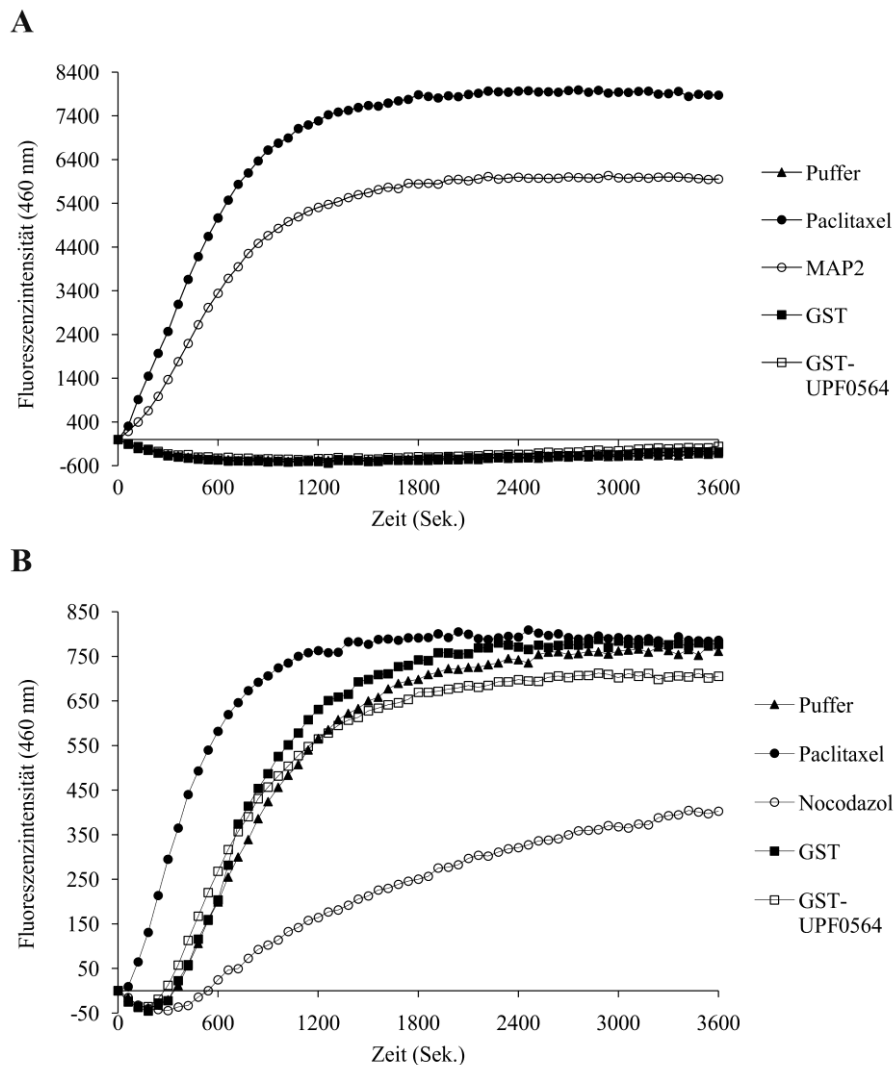
Bei Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen von COS-7-Zellen, die den N-terminalen Bereich des FAM161A-Proteins exprimierten, fand sich eine zufällige und homogene Verteilung des 1D4-getagten Fusionsproteins im Zytoplasma der Zellen (Abb. 36: Links). Im Gegensatz dazu zeigten die EGFP-markierten Proteine FAM161A\_214-660 und FAM161A\_214-716 eine, mit dem FAM161A-Protein voller Länge vergleichbare Mikrotubulilokalisierung (Abb. 36: Mitte und rechts, Abb. 24A). Zusammenfassend ließen sich die Ergebnisse des *in vitro* Interaktionsassays durch immunzytochemische Analysen bestätigen. Die Mikrotubuli-FAM161A-Interaktion wird offensichtlich durch die Aminosäuren der UPF0564-Domäne, unabhängig vom kodierten Proteinbereich des Exons 3a, vermittelt.



**Abb. 36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung verschiedener FAM161A-Verkürzungs-konstrukte in COS-7-Zellen.** Die Proteine FAM161A\_1-285-1D4, GFP-FAM161A\_214-660 sowie GFP-FAM161A\_214-716 wurden in COS-7 Zellen exprimiert und ihre Verteilung im Bezug auf das Mikrotubulinetzwerks durch Fluoreszenzmikroskopie (anti-Rho-1D4 Antikörper bzw. GFP Eigenfluoreszenz) untersucht. Anmerkung: Beide GFP-Konstrukte neigen zur Anreicherung von Fusionsproteinen im Kernbereich. Zellkernfärbung mittels DAPI. Maßstabsbalken, 20 µm. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

### 5.2.4 Tubulin-Polymerisationssassays

Nach Aufklärung der *in vitro* Bindungsfähigkeit von FAM161A an Mikrotubuli sollte nun ein möglicher Effekt des Proteins auf den Verlauf der Tubulinpolymerisierungsprozedur untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde der fluoreszenzbasierte „Tubulin Polymerization Assay Kit“ der Firma Cytoskeleton verwendet. Dadurch lässt sich der Einfluss von Testproteinen oder -substanzen auf den Verlauf der Ausbildung von polymeren Mikrotubulistrukturen aus den Tubulinuntereinheiten verfolgen. Der Assay wurde sowohl im „Enhancer“- als auch im „Inhibitor“-Modus mit den Positiv- (Paclitaxel, MAP2) und Negativkontrollen (Nocodazol), sowie den Proteinen GST (Negativkontrolle für GST-Fusionsproteine) und GST-hFAM161A\_230-543, das in den vorangegangenen Bindungsversuchen ausreichend für die Mikrotubuliassoziation war (5.2.3), durchgeführt (Abb. 37).

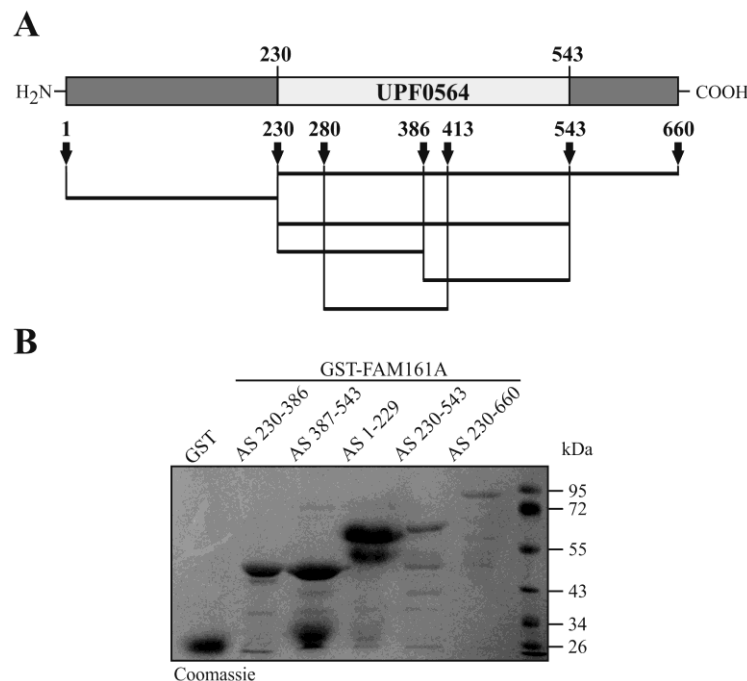


**Abb. 37: Tubulin-Polymerisationsassay mit den Proteinen GST und GST-FAM161A\_230-543.** (A) Messung des Fluoreszenzverlaufs (460 nm) im „Enhancer“-Modus. Kontrollen des Verstärkungs-Effekts auf die Polymerisation durch MAP2 und Paclitaxel. (B) Messung des Fluoreszenzverlaufs (460 nm) im „Inhibitor“-Modus. Die Kontrolle der Polymerisations-Inhibierung erfolgte durch Nocodazol. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Während Paclitaxel und MAP2 im „Enhancer-Modus“ die Polymerisierung von Tubulin erheblich verstärkten, konnte sowohl bei GST als auch bei GST-FAM161A\_230-543 (UPF0564) keine Veränderung im Vergleich zur Pufferkontrolle beobachtet werden (Abb. 37A). Auch im „Inhibitor-Modus“, bei dem die Tubulinpolymerisierung durch Nocodazol stark vermindert wurde, konnte kein signifikanter Effekt von GST oder GST-FAM161A\_230-543 sichtbar gemacht werden (Abb. 37B). Zusammenfassend kann somit gefolgert werden, dass das Fusionsprotein GST-FAM161A\_230-543 und damit die UPF0564-Domäne *in vitro* keinen messbaren Einfluss auf den Tubulin-Polymerisierungsprozess besitzt.

### 5.2.5 Homotypische Interaktion von FAM161A

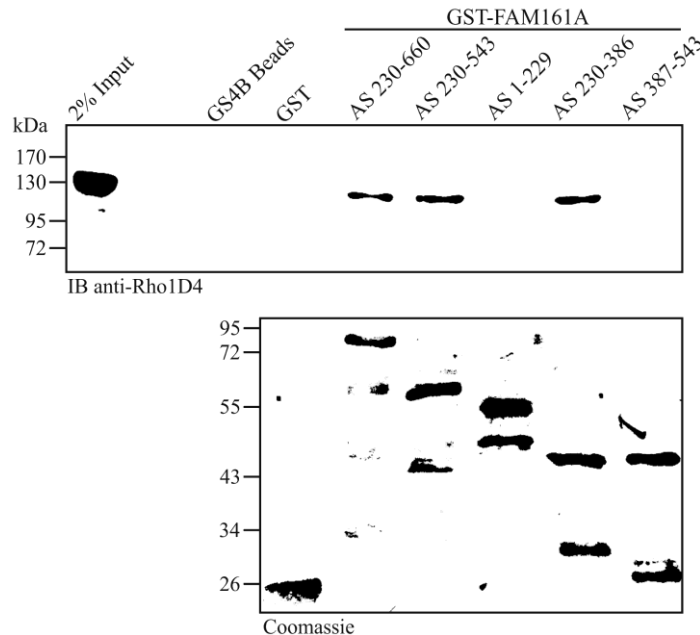
Um den im Vorfeld der Arbeit und während der vorliegenden Dissertation erhaltenen Hinweisen auf eine homotypische Interaktionsfähigkeit des FAM161A-Proteins nachzugehen, wurden GST-Pulldown-Experimente durchgeführt. Zu Anfang wurden unterschiedliche GST-FAM161A-Fusionskonstrukte kloniert, exprimiert und aufgereinigt (Abb. 38A-B).



**Abb. 38: GST-FAM161A-Fusionsproteine für den GST-Pulldown mit FAM161A-1D4.** (A) Schema der FAM161A-Teilbereiche, die für die Klonierung von GST-Fusionsproteinen verwendet wurden. (B) Coomassie-Gel der GST-Proteine nach Aufreinigung durch GS4B-Beads. Theoretische Molekularmassen: GST, 28 kDa; GST-FAM161A\_230-386, 46 kDa; GST-FAM161A\_387-543, 46 kDa; GST-FAM161A\_1-229, 54 kDa; GST-FAM161A\_230-543, 64 kDa; GST-FAM161A\_230-660, 78 kDa. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Die von den GST-Beads eluierten und gegen 1x PBS dialysierten Proteine zeigten mit steigender Molekulargröße eine zunehmend geringere Ausbeute. Eine erfolgreiche Aufreinigung eines GST-FAM161A-Fusionsproteins voller Länge konnte im Zuge dieser Arbeit nicht erreicht werden. Um vergleichbare Proteinmengen für die Experimente

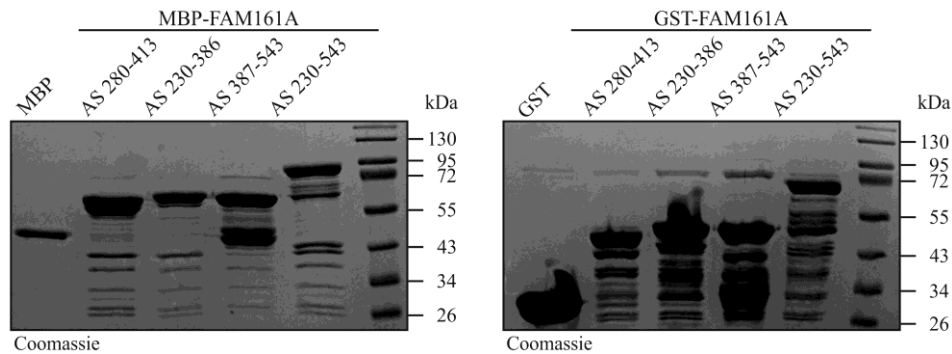
garantieren zu können, wurden die Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Assay vermessen und jeweils 13 µg für die GST-Pulldown-Ansätze mit in HEK293-EBNA-Zellen exprimiertem FAM161A-1D4 verwendet (Abb. 39).



**Abb. 39: GST-Pulldown-Experiment zur Aufklärung der homotypischen FAM161A-Interaktion.** Der Western Blot (oben) mit Antikörpern gegen den Rho1D4-Tag (FAM161A-1D4) zeigt Signale in den Proben mit den GST-Proteinen FAM161A\_230-660, FAM161A\_230-543 sowie FAM161A\_230-386. Als Vergleich wurden 2% des Inputs aufgetragen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran (unten) stellt die Verwendung vergleichbarer Mengen verschiedener GST-Fusionsproteine sicher. Theoretische Molekularmassen: GST, 28 kDa; GST-FAM161A\_230-660, 78 kDa; GST-FAM161A\_230-543, 64 kDa; GST-FAM161A\_1-229, 54 kDa; GST-FAM161A\_230-386, 46 kDa; GST-FAM161A\_387-543, 46 kDa. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

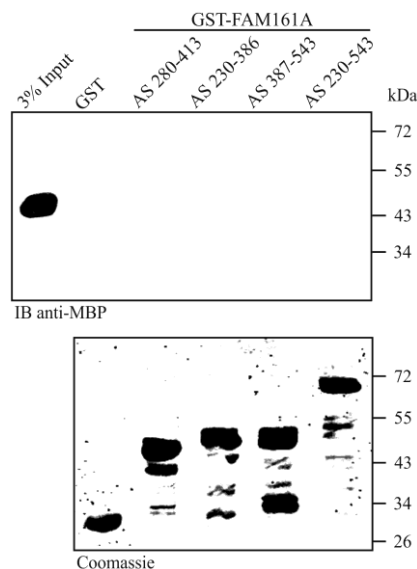
Nach Auswertung des Western Blots konnte bei den drei Proteinen GST-FAM161A\_230-660, GST-FAM161A\_230-543 sowie GST-FAM161A\_230-386 eine direkte physikalische Bindungsfähigkeit an FAM161A-1D4 nachgewiesen werden (Abb. 39). Es ließ sich somit ein minimaler, für die Interaktion notwendiger Proteinbereich der Aminosäuren 230-386 (1. Hälfte der UPF0564-Domäne) definieren. Die Konstrukte mit den Aminosäuren des N-Terminus (1-229), sowie der 2. Hälfte der UPF0564-Domäne (Aminosäuren 386-543) zeigten dabei keine Wechselwirkungen mit dem Protein voller Länge (Abb. 39). Auch die Negativkontrolle GST, sowie die Glutathione Sepharose™ 4 Fast Flow Beads (GS4B Beads) ohne zugegebene GST-Fusionsproteine zeigten keine unspezifischen Wechselwirkungen mit FAM161A-1D4, was auf eine korrekte Durchführung des Versuchsablaufs hindeutet (Abb. 39). Bei Betrachtung der PVDF-Membranen nach Coomassie-Färbung konnte die Verwendung ähnlicher bzw. vergleichbarer Mengen der verschiedenen GST-Fusionsproteine bestätigt werden (Abb. 39). In einem weiteren unabhängigen Pulldown-Experiment mit MBP-Fusionsproteinen sollten die zuvor erhaltenen Ergebnisse der GST-Pulldown-Versuche mit FAM161A-1D4 weiter verfeinert werden. Hierzu wurde anstatt heterolog exprimiertem

FAM161A-1D4 auf bakteriell exprimierte MBP-FAM161A-Fusionsproteine zurückgegriffen. Nach Klonierung, Expression und Aufreinigung der MBP-Proteine, wurden diese mit Hilfe eines Maltose-haltigen MBP-Elutionspuffers durch eine Verdrängungsreaktion in Lösung gebracht, gegen TNBN-Puffer (3.10) dialysiert und zusammen mit den GST-Proteinen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung charakterisiert (Abb. 40).



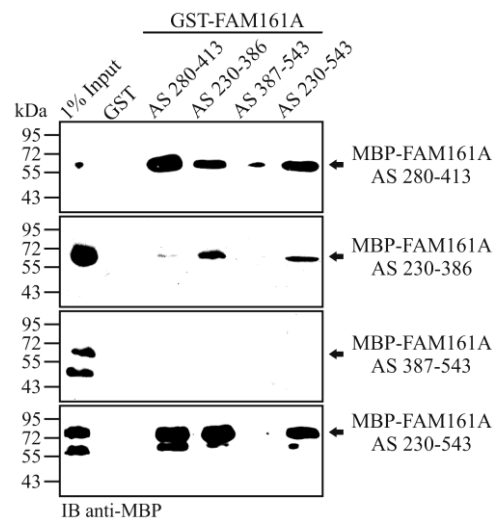
**Abb. 40.: GST- und MBP-markierte FAM161A-Fusionskonstrukte für die Pulldown-Experimente.** Die Coomassie-Färbungen der SDS-Gele zeigen eine erfolgreiche Expression der MBP- (linke Seite) sowie GST-Fusionskonstrukte (rechte Seite) verschiedener Teilbereiche des FAM161A-Proteins. MBP und GST wurden als Negativkontrollen für den Pulldown-Assay exprimiert. Theoretisches Molekulargewicht: GST, 28 kDa; GST-FAM161A<sub>280-413</sub>, 43 kDa; GST-FAM161A<sub>230-386</sub>, 46 kDa; GST-FAM161A<sub>387-543</sub>, 46 kDa; GST-FAM161A<sub>230-543</sub>, 64 kDa; MBP, 43 kDa; MBP-FAM161A<sub>280-413</sub>, 58 kDa; MBP-FAM161A<sub>230-386</sub>, 61 kDa; MBP-FAM161A<sub>387-543</sub>, 60 kDa; MBP-FAM161A<sub>230-543</sub>, 79 kDa.

Zur Etablierung der geeigneten Bedingungen des Pulldowns wurden Reaktionsansätze mit allen GST-Proteinen und der Negativkontrolle MBP als Input durchgeführt (Abb. 41). Dabei wurden die Bead-gebundenen GST-Fusionsproteine zusammen mit löslichem MBP in TNBN-Puffer inkubiert. Vergleichbare Proteinmengen wurden aus Abbildung 40 abgeschätzt.



**Abb. 41: Etablierung der Reaktionsbedingungen des MBP-Pulldowns mit der Negativkontrolle MBP.** Western Blot Analyse des GST-Pulldowns mit der Negativkontrolle MBP bestätigt die Verwendung geeigneter Reaktionsbedingungen. Die Coomassie-Färbung der PVDF-Membran belegt den Einsatz der GST-Proteine in ausreichenden und vergleichbaren Mengen.

Die gewählten Reaktionsbedingungen zeigten keine unspezifischen Interaktionen des MBP-Proteins mit den verschiedenen GST-Fusionsproteinen (Abb. 41). Im nächsten Schritt wurden alle GST- sowie MBP-Proteine mit den jeweiligen Elutionspuffern von den Beads gelöst und mittels Bradford-Assay quantifiziert. Das Experiment wurde mit jeweils 7,5 µg der Fusionsproteine und frischen GS4B-Beads zur Präzipitation der GST-Proteine durchgeführt. Die Western Blot Analysen der Elutionsfraktionen nach Durchführung der Pulldowns sind in Abbildung 42 zusammengefasst.

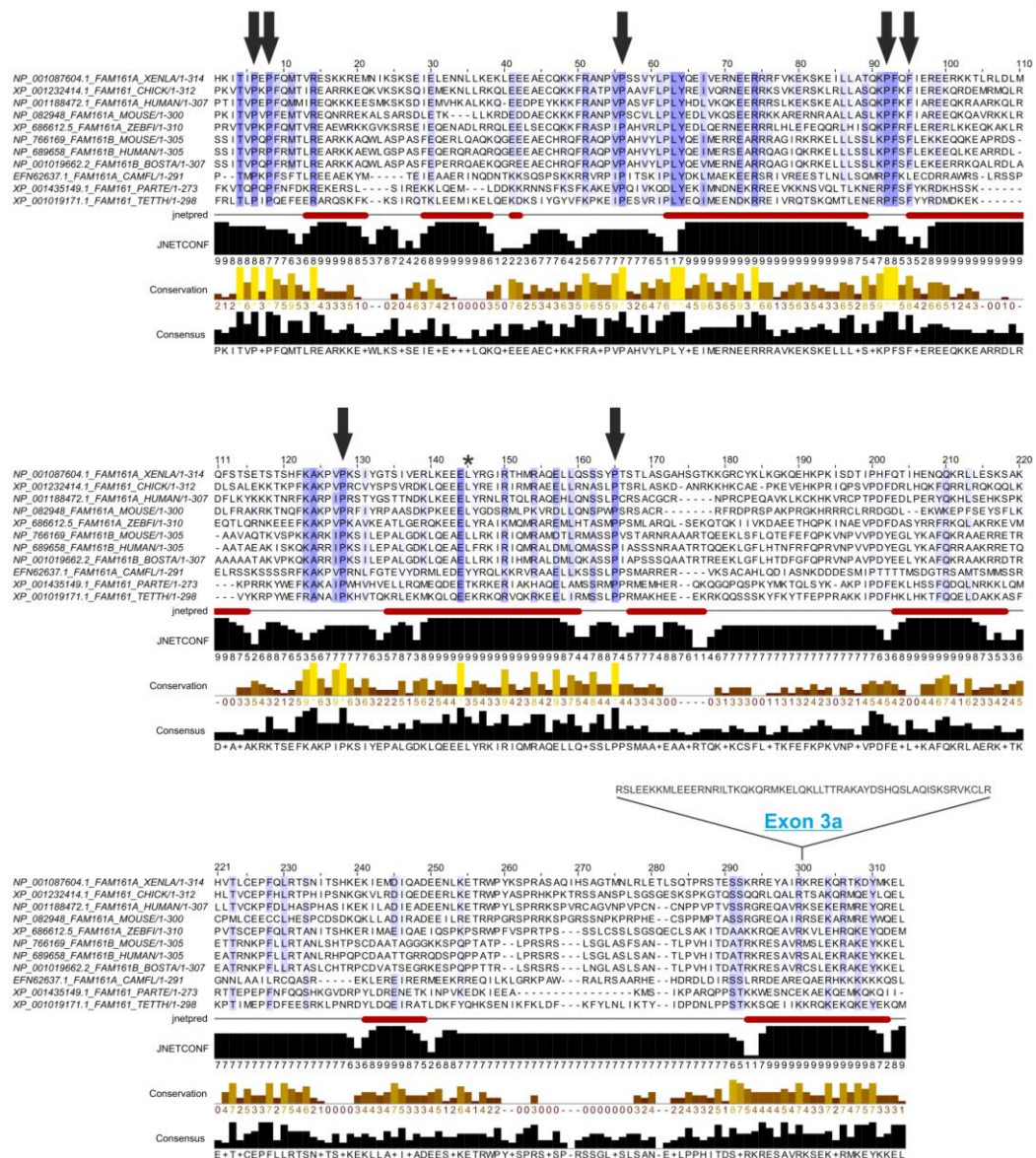


**Abb. 42: Homotypische Bindungsassays mit GST- und MBP-FAM161A-Fusionsproteinen.** WB-Experimente der homotypischen FAM161A-Bindungsstudie mit GST- und MBP-Fusionsproteinen. Die minimale Bindungsdomäne konnte auf die Aminosäuren 280-413 eingengt werden. Als Input wurden je 1% der MBP-Fusionsproteine verwendet. Theoretische Molekularmassen der verwendeten Fusionsproteine: GST, 28 kDa; GST-FAM161A\_280-413, 43 kDa; GST-FAM161A\_230-386, 46 kDa; GST-FAM161A\_387-543, 46 kDa; GST-FAM161A\_230-543, 64 kDa; MBP-FAM161A\_280-413, 58 kDa; MBP-FAM161A\_230-386, 61 kDa; MBP-FAM161A\_387-543, 60 kDa; MBP-FAM161A\_230-543, 79 kDa. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Durch Analyse der Western Blots (Abb. 42) konnten die gewonnen Erkenntnisse des GST-Pulldowns bezüglich der homotypischen Interaktionsfähigkeit von Abbildung 39 bestätigt und ausgeweitet werden. MBP-Fusionsproteine mit den FAM161A-Aminosäuren 280-413, 230-386 (verschiedene Teilkonstrukte des 1. Teils der UPF0564-Domäne), sowie 230-543 (UPF0564-Domäne) zeigten eine Assoziation mit den entsprechenden GST-Konstrukten, während mit den Proteinen des Teilbereichs der Aminosäuren 387-543 (2. Teil der UPF0564-Domäne) nur eine geringe bzw. keine homotypische Interaktion mit den verschiedenen Abschnitten des FAM161A-Proteins beobachtet werden konnte. Desweiteren konnte keine homotypische Interaktion der Proteine GST-FAM161A\_387-543 und MBP-FAM161A\_387-543 detektiert werden. Der minimale, für die Interaktion mit MBP-FAM161A\_230-543 ausreichende und notwendige Bereich konnte mit Hilfe dieser Experimente somit den Aminosäuren 280-413 im ersten Teil der UPF0564-Domäne des FAM161A-Proteins zugeordnet werden.

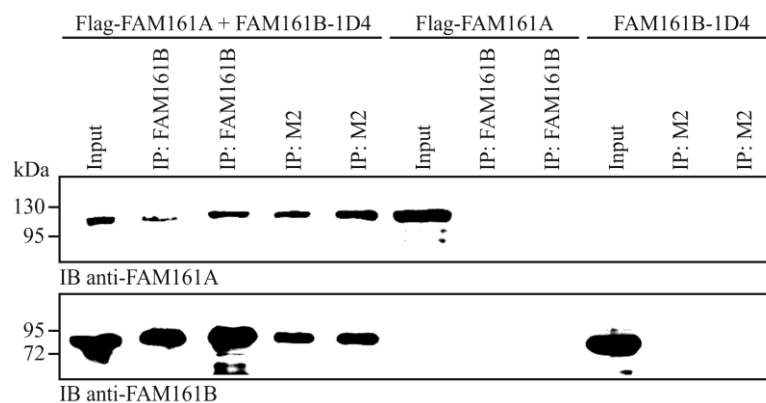
## 5.2.6 Heterotypische Interaktion von FAM161A und FAM161B

Nachdem die homotypische FAM161A-Interaktion mit verschiedenen Methoden nachgewiesen und charakterisiert worden war, konnte nun aufgrund der vorhandenen Aminosäure- bzw. Strukturhomologie eine Interaktion zwischen FAM161A und FAM161B angenommen werden. Um den Grad der Konservierung beider Proteine in verschiedenen Spezies darstellen zu können, wurde aus den Aminosäuresequenzen im Bereich der UPF0564-Domäne ein multiples Sequenzalignment und eine Vorhersage der möglichen Sekundärstrukturelemente durchgeführt (Abb. 43).



**Abb. 43: Multiples Sequenzalignment und vergleichende Sekundärstrukturvorhersage der konservierten UPF0564-Domänen verschiedener orthologer und paraloger FAM161-Proteine.** Aminosäurealignment der UPF0564-Domänen verschiedener Organismen mittels Blossum 62 Matrix. Durch „JNETCONF“ vorhergesagte Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices) sind in rot dargestellt. Pfeile heben konservierte Aminosäuren unmittelbar vor prognostizierten Sekundärstrukturelementen hervor. Die Aminosäure 378, welche in Patienten mit Retinitis Pigmentosa mutiert ist, wurde durch einen Stern markiert. Die Aminosäuren des alternativ gespleißten Exon 3a sind am C-terminalen Ende der UPF0564 eingefügt. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Hierbei zeigte sich ein relativ hoher Grad an Sequenzähnlichkeit und -identität. Desweiteren konnte mittels der durchgeführten Sekundärstrukturanalyse eine Vielzahl von Aminosäuren gefunden werden, die in allen hier einbezogenen Spezies in beiden paralogen Proteinen konserviert sind. Die Sekundärstrukturanalyse ergab mehrere  $\alpha$ -helikale Bereiche, die an der Vermittlung von homotypischen und heterotypischen Interaktion, z.B. mit Mikrotubuli beteiligt sein könnten. Um nun eine direkte physikalische Interaktion von FAM161A und FAM161B zu testen wurde ein Immunpräzipitationsexperiment durchgeführt. Die getagten Proteine Flag-FAM161A und FAM161B-1D4 wurden dabei durch Zelllyse von transient transfizierten HEK293-EBNA-Zellen gewonnen und mit den Antikörpern anti-Flag M2 bzw. anti-FAM161B wechselseitig präzipitiert (Abb. 44).

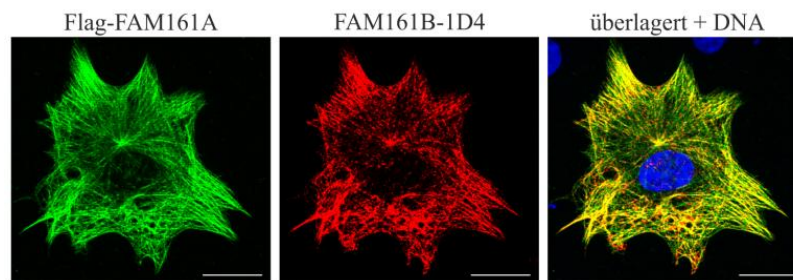


**Abb. 44: Immunpräzipitationsexperimente mit Flag-FAM161A und FAM161B-1D4.** Analyse der Immunpräzipitationsexperimente mit Zelllysaten aus transient transfizierten HEK293-EBNA-Zellen. Als Input sind jeweils 2% der verschiedenen Einzel- und Doppeltransfektionen aufgetragen. IP: Immunpräzipitation, IB: Immunblot. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

In beiden Fällen konnte das jeweilige Protein mit den angegebenen Antikörpern spezifisch gefällt werden. Aufgrund einer direkten physikalischen Interaktion von FAM161A und FAM161B ließ sich eine Ko-Präzipitation der Proteine nachweisen. Es wurde sowohl FAM161B-1D4 durch Zugabe des Antikörpers anti-Flag M2, der gegen den Flag-Tag und somit gegen Flag-FAM161A gerichtet war, als auch Flag-FAM161A durch die Zugabe von Antikörpern gegen FAM161B ko-präzipitiert (Abb. 44). Experimente mit Einzeltransfektionen von Flag-FAM161A bzw. FAM161B-1D4 dienten als Negativkontrollen. Durch Zugabe der Antikörper gegen das jeweils nicht exprimierte Protein konnten keine unspezifischen Interaktionen festgestellt werden. Die Ergebnisse des *in vitro* Experiments konnten durch Immunfluoreszenzaufnahmen von Flag-FAM161A- und FAM161B-1D4-transfizierten COS-7-Zellen bekräftigt werden (Abb. 45). Die Mikrotubulilokalisierung von FAM161A (Abb. 24A) konnte somit nun auch in FAM161B-exprimierenden Zellen beobachtet werden. Die Proteine zeigten einen hohen Grad an Ko-Lokalisierung entlang der Fasern des Mikrotubulinnetzwerks. Dies deutet auf eine physikalische Assoziation von FAM161A und

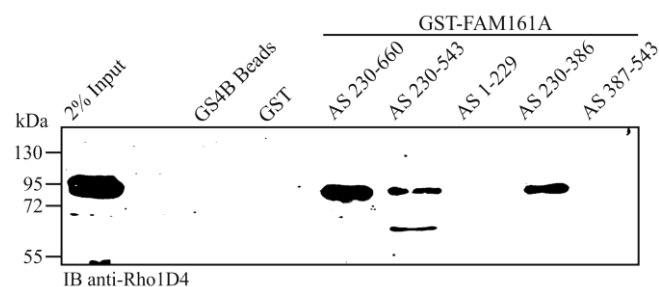


FAM161B hin. Die Möglichkeit einer FAM161A-unabhängigen direkten Bindung von FAM161B an Mikrotubulistrukturen sollte hierbei jedoch nicht außer Acht gelassen werden.



**Abb. 45: Lokalisierung von Flag-FAM161A und FAM161B-1D4 in transfizierten COS-7-Zellen.** ICC-Analysen von COS-7-Zellen, die transient mit Flag-FAM161A- und FAM161B-1D4-Expressionskonstrukten transfiziert worden waren. FAM161A und FAM161B zeigen eine Ko-Lokalisierung entlang der Zytoskelettstrukturen. Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Maßstabsbalken, 20  $\mu$ m. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

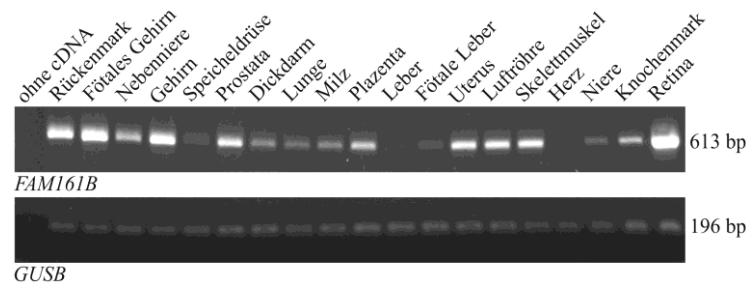
In einem weiteren Bindungsexperiment sollte ermittelt werden, welcher FAM161A-Bereich für die FAM161B-Bindung verantwortlich ist (Abb. 46). Wie vermutet, zeigte sich bei diesem GST-Pulldown-Experiment zur Charakterisierung der heterotypischen FAM161A-FAM161B-Interaktion ein mit den homotypischen Bindungsassays (Abb. 39, 42) vergleichbares Bild. GST-Fusionsproteine mit den FAM161A-Bereichen 230-660, 230-543, sowie 230-386, nicht jedoch mit den Aminosäuren 1-229 und 387-543, bildeten eine physikalische Interaktion mit FAM161B aus. Daraus geht der 1. Teil der UPF0564-Domäne als notwendig und ausreichend für die homo- und heterotypische Interaktionen von Proteinen der FAM161-Familie hervor.



**Abb. 46: GST-Pulldown Experiment zur Aufklärung der heterotypischen Interaktion von FAM161A und FAM161B.** Western Blot mit Antikörpern gegen den Rho1D4-Tag (FAM161B-1D4) zeigt eine Interaktion von FAM161B mit den Proteinen GST-FAM161A\_230-660, GST-FAM161A\_230-543 sowie GST-FAM161A\_230-386. Als Vergleich wurden 2% des Inputs aufgetragen. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Zur Erstellung eines *FAM161B*-Expressionsprofil in unterschiedlichen humanen Geweben wurde eine semiquantitative RT-PCR Analyse mit 19 verschiedene cDNAs, inklusive retinaler cDNA, durchgeführt (Abb. 47). Eine starke *FAM161B*-Expression konnte vor allem in neuronalen Geweben, wie z.B. Gehirn und Rückenmark, sowie in der Retina nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine funktionelle Bedeutung des zu FAM161A paralogen Proteins im Bereich der Retina hindeuten. Weiterhin könnte es sich beim *FAM161B*-Gen, das auf

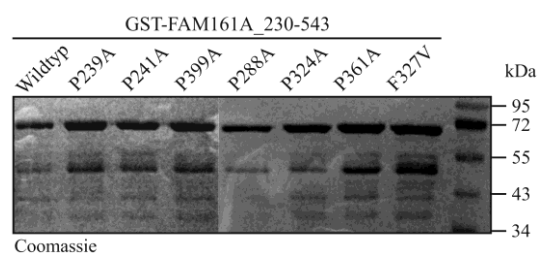
Chromosom 14 (C14orf44) lokalisiert ist, um ein Kandidatengen von Erkrankungen handeln, die dieser genomischen Region zugeordnet worden waren.



**Abb. 47: FAM161B-Expressionsprofil in verschiedenen humanen Geweben.** Die Expression von *FAM161B* in 19 verschiedenen humanen Geweben wurde durch semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Die gleichmäßigen Signale des universell exprimierten Gens *GUSB* zeigen die Vergleichbarkeit der eingesetzten Template-DNAs. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

### 5.2.7 Kartierung von bedeutenden Aminosäuren für die Ausbildung von homo- und heterotypischen FAM161A-Interaktionen

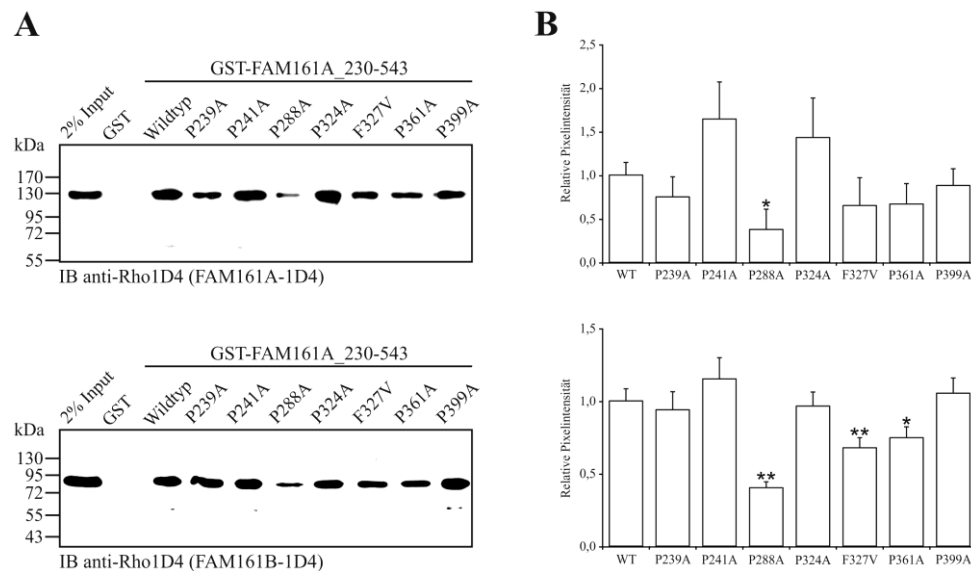
Zur Kartierung von Aminosäureresten innerhalb der UPF0564-Domäne, die für die homo- und heterotypischen FAM161-Interaktionen von Bedeutung sind, wurden mittels ortsspezifischer *in vitro* Mutagenese diverse Punktmutationen (P239A, P241A, P288A, P324A, F327V, P361A und P399A) in das Protein GST-FAM161A\_230-543 eingefügt (schwarze Pfeile in Abb. 43). Bei den durch die Mutagenese veränderten Aminosäureresten handelt es sich hauptsächlich um hoch konservierte Proline. Die punktmultierten GST-Fusionsproteine wurden nun in *E. coli*-Zellen exprimiert, gereinigt und mittels Elutionspuffer in Lösung gebracht (Abb. 48).



**Abb. 48: Expression und Aufreinigung verschiedener punktmultiertter GST-FAM161A-Fusionskonstrukte.** Coomassie-Färbung von SDS-Gelen der Elutionsfraktionen verschiedener GST-FAM161A\_230-543-Proteine mit Wildtypsequenz bzw. mit den zuvor eingefügten Punktmutationen. Theoretische Molekularmasse GST-FAM161A\_230-543: 64 kDa.

Alle Fusionsproteine konnten erfolgreich und in vergleichbaren Ausbeuten aufgereinigt werden. Nach Ermittlung der Proteinkonzentrationen mittels Bradford-Messung wurden jeweils 15 µg der Proteine in GST-Pulldown-Experimente mit Zelllysaten aus FAM161A-1D4- und FAM161B-1D4-exprimierenden Zellen eingesetzt (Abb. 49A). Die Pixelintensitäten von jeweils drei unabhängigen Western Blots wurden nun auf die Stärke der jeweiligen

Inputbanden normalisiert und zur Mittelwertbildung verwendet. Diese wurden in Relation zum Wildtypmittelwert berechnet und auf statistisch signifikante Unterschiede mittels Student'schem t-Test überprüft. Nach Durchführung dieser Analysen konnten statistisch signifikante Unterschiede der Bindungsfähigkeit von wildtypischem GST-FAM161A\_230-543, im Vergleich zu GST-FAM161A\_230-543 mit den Punktmutationen P288A, F327V und P361A, an FAM161B gefunden werden (Abb. 49B: unten).



**Abb. 49: Interaktion von FAM161A/B mit Punktmutationskonstrukten der UPF0564-Domäne.** (A) GST-Pulldown-Experimente mit wildtypischen bzw. punktmutierten GST-FAM161A\_230-543-Proteinen und Lysaten von FAM161A-1D4- (oben) bzw. FAM161B-1D4-exprimierenden Zellen (unten) (B) Quantitative Auswertung der Bandenintensitäten der Western Blot Experimente aus (A). Mittelwerte von drei Blots wurden jeweils auf 2% Input normalisiert und in Relation zum Mittelwert der Wildtypmesswerte berechnet. Student'scher t-Test: \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ . Statistisch signifikante Unterschiede zum Wildtypprotein sind durch Sterne markiert. Abbildung verändert nach Zach et al. 2012.

Bei Verwendung von FAM161A zeigten sich ähnliche Tendenzen, statistische Signifikanz konnte hierbei nur im Falle der Mutation P288A beobachtet werden. Die Resultate dieser Untersuchungen zeigten die Wichtigkeit diverser Aminosäuren unmittelbar vor Sekundärstrukturübergängen, vor allem im Bereich vorhergesagter  $\alpha$ -Helices, auf die Ausbildung der homo- und heterotypischen Interaktionen der FAM161-Proteine. Weiterhin befinden sich die drei Reste P288, F327 und P361 im Aminosäurebereich 280-413, der in vorherigen Versuchen als kritisch für die Protein-Interaktion definiert worden war. Diese Erkenntnisse geben somit weitere Hinweise auf die Wichtigkeit dieses Proteinabschnittes im Bereich der UPF0564-Domäne.

### 5.2.8 Hefe-Zwei-Hybrid-Assay zur Ermittlung von FAM161A-Interaktionspartnern

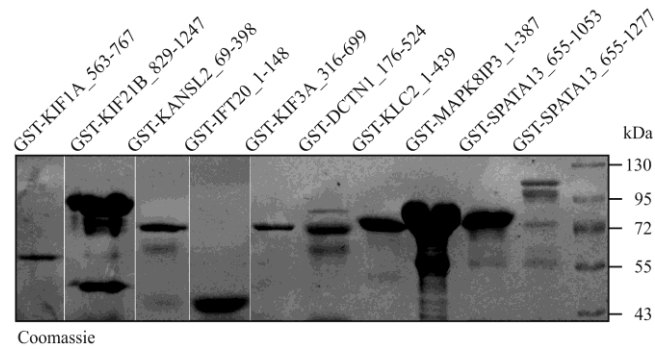
Zur weiterführenden funktionellen Charakterisierung des FAM161A-Proteins sollten mit Hilfe eines Hefe-Zwei-Hybrid-Assays („yeast-2-hybrid“, Y2H) direkte Interaktionspartner

identifiziert werden. Aus diesem Grund wurde bei der Firma Hybrigenics mit Sitz in Paris eine Interaktionsstudie mit FAM161A voller Länge als „Köder“ in Auftrag gegeben. Es wurden dabei 58,2 Millionen Interaktionen einer „Beute“-Bibliothek, generiert aus humaner Retina, getestet. Als Ergebnis der Studie ergaben sich 2 Kandidatenproteine der Kategorie C („gute Konfidenz“), 39 aus Kategorie D („moderate Konfidenz“) sowie 11 der Kategorie E („nicht spezifisch“). FAM161B, das bereits als Interaktionspartner von FAM161A identifiziert worden war, konnte ebenfalls, in der Kategorie D, entdeckt werden. Proteine in den Kategorien A und B mit höchster Überzeugungskraft konnten im Zuge des Experiments jedoch nicht beobachtet werden. Das Ergebnisdokument umfasste eine Angabe der jeweiligen „SID“ („selected interaction domain“), also des Bereichs des Kandidatenproteins, der im Zuge der Analyse als potentielle FAM161A-Interaktionsdomäne gefunden worden war. Zur weiteren Charakterisierung und Validierung der erhaltenen Ergebnisse wurden zu Anfang GST-Fusionsproteine aus diesen SID-Domänenbereichen von acht ausgewählten Kandidaten mittels molekularer Klonierung aus cDNA-Templates erstellt. Die cDNAs wurden dabei durch reverse Transkription aus RNAs, die aus Retina oder HEK293-EBNA-Zellen isoliert wurden, gewonnen. IFT20, das im Mikrotubuli-basierten Transport vom Golgi Apparat zur Basis des Zilium involviert ist (Follit et al. 2006), wurde zusätzlich als mögliches Kandidatenprotein in die Studie aufgenommen. Tabelle 48 zeigt eine Übersicht der Nukleotid- und Aminosäurebereiche der Kandidaten.

Gen	Referenz	Basen (VL)	AS (VL)	Basen (SID)	AS (SID)	Basen (kloniert)	AS (kloniert)	# AS (kloniert)	kDa
<i>KIF1A</i>	NM_004321.4	4497	1499	1783-2205	595-735	1687-2301	563-767	205	52
<i>KANSL2</i>	NM_017822.3	1476	492	259-1170	87-390	205-1194	69-398	330	65
<i>MAPK8IP3</i>	NM_015133.3	4008	1336	103-1071	35-357	1-1162	1-387	387	71
<i>DCTN1</i>	NM_023019.3	3432	1144	790-1404	264-468	526-1572	176-524	349	68
<i>KLC2</i>	NM_001134775.1	1866	622	1-1224	1-408	1-1317	1-439	439	77
<i>SPATA13</i>	NM_001166271.1	3831	1277	2059-3063	687-1021	1963-3159	655-1053	399	73
<i>SPATA13</i>	NM_001166271.1	3831	1277	2059-3831	687-1277	1963-3831	655-1277	623	98
<i>KIF21B</i>	NM_017596.2	4497	1499	2581-3645	861-1215	2485-3741	829-1247	419	75
<i>KIF3A</i>	NM_007054.5	2097	699	1246-2097	416-699	946-2097	316-699	384	72
<i>IFT20</i>	NM_174887.2	444	148			1-444	1-148	148	43

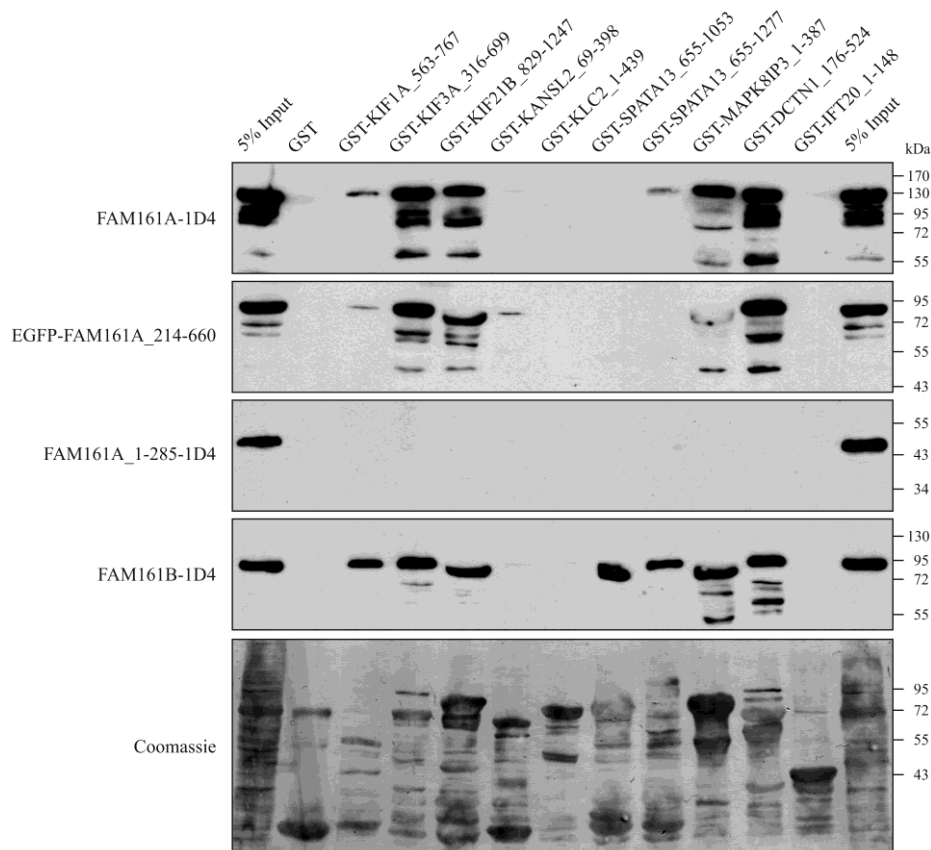
**Tab. 48: Übersichtstabelle der Interaktionskandidaten von FAM161A.** Übersicht der Kandidatengene mit Referenznummer sowie Basen- bzw. Aminosäureinformationen der Gesamt-, SID- und Klonierungsbereiche der angegebenen Gene bzw. der Genprodukte. Theoretische Molekularmassen der klonierten GST-SID-Fusionsproteine sind in kDa angegeben.

Die klonierten Plasmide wurden nun zur Expression der GST-Fusionsproteine mittels GS4B-Beads in *E. coli*-Zellen (BL21 [DE3]) transformiert. Die Elutionsfraktionen der jeweiligen isolierten und aufgereinigten GST-Fusionsproteine sind in Abbildung 50 zusammengefasst.



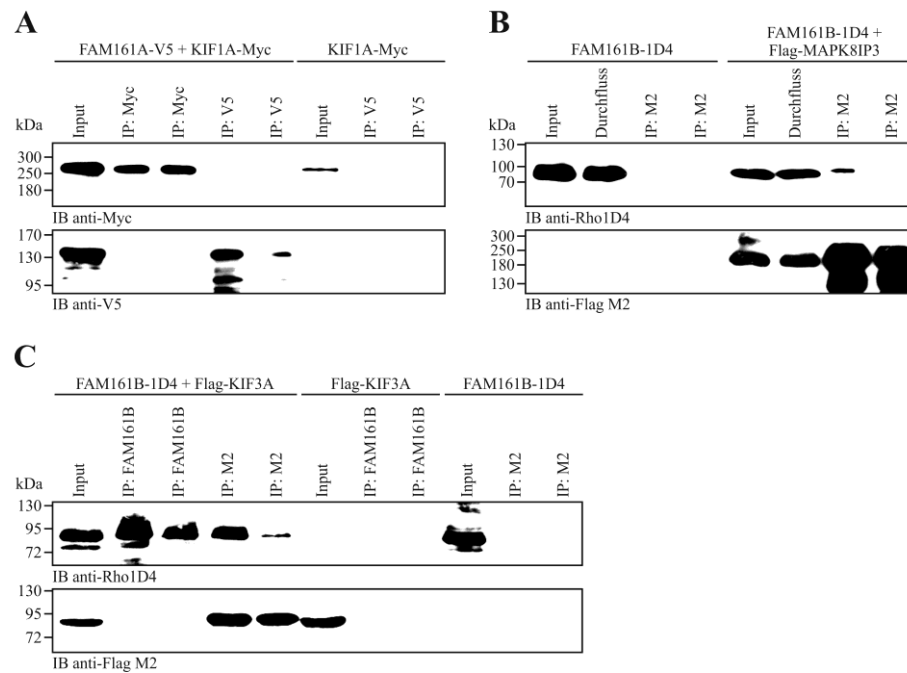
**Abb. 50: GST-Fusionsproteine aus SIDs der potentiellen FAM161A-Interaktionspartner.** Coomassie-gefärbte SDS-Gele zeigen die erfolgreiche Expression und Aufreinigung von Teilbereichen potentieller Interaktionspartner als GST-Fusionsproteine. Theoretische Molekularmassen der GST-Fusionsproteine: KIF1A\_563-767, 52 kDa; KIF21B\_829-1247, 75 kDa; KANSL2\_69-398, 65 kDa; IFT20\_1-148, 43 kDa; KIF3A\_316-699, 72 kDa; DCTN1\_176-524, 68 kDa; KLC2\_1-439, 77 kDa; MAPK8IP3\_1-387, 71 kDa; SPATA13\_655-1053, 73 kDa; SPATA13\_655-1277, 98 kDa.

Alle Fusionsproteine konnten, wenn auch in unterschiedlichen Ausbeuten, exprimiert und aufgereinigt werden. Zur Validierung der direkten physikalischen Bindung an FAM161A und FAM161B wurde nun eine Serie verschiedener Bindungsexperimente durchgeführt (Abb. 51). FAM161A-1D4 wies dabei eine starke Interaktion mit den GST-Fusionsproteinen der Kandidaten KIF3A, KIF21B, MAPK8IP3 und DCTN1, sowie schwächere Signale mit KIF1A und SPATA13 (655-1277) auf (Abb. 51). Bei Verwendung von FAM161B-1D4 zeigte sich ein ähnliches Bild. Die Signalstärken mit KIF1A und den beiden Varianten von SPATA13 waren jedoch stärker und damit vergleichbarer mit den durch die KIF3A-, KIF21B-, MAPK8IP3- und DCTN1-Bindung vermittelten FAM161A-1D4-Signale (Abb. 51). Die Teilbereiche der Proteine KANSL2, KLC2 und IFT20 zeigten mit keinem der FAM161-Konstrukte eine signifikante Assoziation (Abb. 51). Zur genaueren Charakterisierung der Interaktionen und zur Lokalisierung der Bindungsdomäne, welche die Assoziation von FAM161A mit den potentiellen Interaktionspartnern vermittelt, wurden weitere GST-Pulldown-Versuche mit den Proteinen EGFP-FAM161A\_214-660 (C-Terminus) sowie FAM161A\_1-285-1D4 (N-Terminus) durchgeführt (Abb. 51). Hierbei zeigte sich, dass sämtliche Interaktionen vom C-Terminus vermittelt werden. Der N-Terminus von FAM161A alleine konnte in keinem der getesteten Fälle eine Assoziation mit den potentiellen Interaktionspartnern ausbilden. Das Bindungsmuster von EGFP-FAM161A\_214-660 überlappte dabei nahezu komplett mit dem volle Länge FAM161A-1D4, es konnte starke Signale mit KIF3A, KIF21B und DCTN1, sowie schwächere Banden mit KIF1A und KANSL2 beobachtet werden (Abb. 51). Bei der Verwendung von GST-MAPK8IP3 war zu erkennen, dass das GST-Fusionsprotein das immunsensitive Signal von EGFP-FAM161A\_214-660 sehr wahrscheinlich überlagerte (Abb. 51). Aufgrund ihrer nahezu identischen Molekularmassen wurde die vermutlich vorhandene Interaktion somit hier nicht eindeutig sichtbar.



**Abb. 51: GST-Pulldown-Experimente zur Validierung der potentiellen FAM161A-Interaktionen aus dem Y2H-Screen.** Western Blot der GST-Pulldown-Experimente der potentiellen Interaktionspartner mit den Proteinen FAM161A-1D4, EGFP-FAM161A\_214-660, FAM161A\_1-285-1D4 sowie FAM161B-1D4. Die exemplarische Coomassie-Färbung (unten) bestätigt die Integrität der eingesetzten GST-Proteine und der Negativkontrolle GST. Als Input sind jeweils 5% der zu den Beads gegebenen Zelllysate aufgetragen. Anmerkung: Verschiebung/Verdeckung einiger Signale aufgrund Überlagerung mit GST-Fusionsproteinen ähnlicher Molekularmasse. Theoretische Molekularmassen der GST-Fusionsproteine: KIF1A\_563-767, 52 kDa; KIF21B\_829-1247, 75 kDa; KANSL2\_69-398, 65 kDa; IFT20\_1-148, 43 kDa; KIF3A\_316-699, 72 kDa; DCTN1\_176-524, 68 kDa; KLC2\_1-439, 77 kDa; MAPK8IP3\_1-387, 71 kDa; SPATA13\_655-1053, 73 kDa; SPATA13\_655-1277, 98 kDa.

Zur weiterführenden Charakterisierung der Interaktionspartner wurde damit begonnen, IP-Experimente mit FAM161A- und FAM161B-Expressionskonstrukten durchzuführen. Dazu wurden die jeweiligen cDNA-Abschnitte der Proteine (volle Länge der kodierenden Sequenz) von KIF1A, KIF3A, MAPK8IP3 sowie KANSL2 (=C12Orf41) mittels Klonierung in die Expressionsplasmide pFLAG-CMV4, pEGFP-C1 oder pBudCE4.1 eingebracht. Diese Konstrukte wurden in Doppeltransfektionen zusammen mit Flag-FAM161A- bzw. FAM161B-1D4-exprimierenden Plasmiden in HEK293-EBNA-Zellen transfiziert. Mit Zelllysaten von konfluenten Zellen wurden IP-Assays mit verschiedenen Antikörperkombinationen durchgeführt (Abb. 52). Der Assay zur Ermittlung der Interaktion zwischen FAM161A-V5 und KIF1A-Myc (Abb. 52A) zeigte eine erfolgreiche Präzipitation der jeweiligen Proteine mit den zugehörigen Antikörpern (anti-V5-Tag, anti-Myc). Es konnte jedoch keine spezifische Ko-Präzipitation von FAM161A mit KIF1A oder von KIF1A mit FAM161A und damit keine physikalische Interaktion beider Proteine in diesem Experiment beobachtet werden.



**Abb. 52: Immunpräzipitationsexperimente von FAM161-Proteinen mit potentiellen Interaktionspartnern.** Western Blots der Ko-Präzipitationsexperimente von (A) FAM161A und KIF1A, (B) FAM161B und MAPK8IP3, sowie (C) FAM161B und KIF3A. Abkürzungen: IP, Immunpräzipitation; IB, Immunblot.

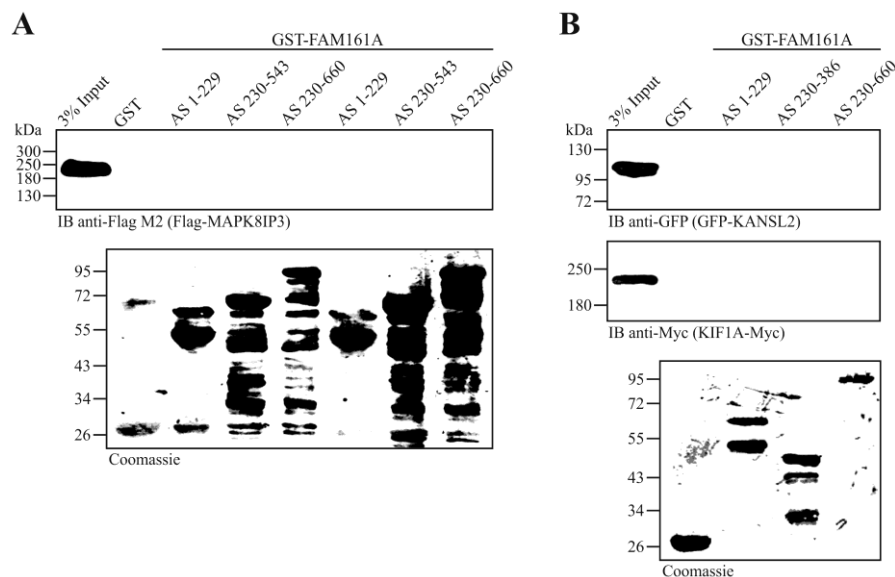
Nach Präzipitation von Flag-MAPK8IP3 mit anti-M2-Flag Agarose (Abb. 52B) konnte eine schwache Ko-Präzipitation von FAM161B-1D4 beobachtet werden. Als Negativkontrolle diente die Behandlung von Lysaten aus FAM161B-1D4-exprimierenden Zellen mit anti-Flag M2 Agarose, bei der eine unspezifische Präzipitation von FAM161B-1D4 ausblieb.

Zur Präzipitation der Proteine FAM161B-1D4 mit Flag-KIF3A wurden Antikörper gegen FAM161B (gekoppelt an Protein A-Sepharose), sowie gegen den Flag-Tag (anti-Flag M2 Agarose) verwendet. Die Proteine konnten dabei erfolgreich und spezifisch gefällt werden (Abb. 52C). Weiterhin konnte eine starke Ko-Präzipitation von FAM161B-1D4 mit Flag-KIF3A beobachtet werden. Bei Betrachtung der reziproken Situation, ließ sich jedoch keine Ko-Präzipitation von Flag-KIF3A mit FAM161B-1D4 detektieren (Abb. 52C).

Ein Ko-Immunpräzipitationsexperiment von GFP-KANSL2 mit Flag-FAM161A wurde im Zuge der Bachelorarbeit von Matthias Glögl (Glögl 2011) durchgeführt. Hierbei konnte eine Ko-Präzipitation von GFP-KANSL2 mit Flag-FAM161A (anti-Flag M2) gezeigt werden, jedoch blieb diese bei Verwendung von GFP-Antikörpern gegen GFP-KANSL2 aus. Während dieser Bachelorarbeit konnte die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse bezüglich der fehlenden Interaktion von KIF1A(-Myc) und FAM161A(-1D4) bestätigt werden.

In einer nun folgenden zusätzlichen Interaktionsstudie wurden GST-Pulldown-Experimente mit Fusionsproteinen unterschiedlicher FAM161A-Teilbereiche und den Interaktionspartnern

voller Länge durchgeführt (Abb. 53A-B). Bei zusammenfassender Betrachtung der verschiedenen GST-Pulldown-Versuche konnten keinerlei Interaktionen der Proteine Flag-MAPK8IP3, GFP-KANSL2 oder KIF1A-Myc mit den unterschiedlichen FAM161A-Verkürzungskonstrukten gefunden werden (Abb. 53A-B). Die Integrität der GST-Fusionsproteine wurde dabei durch Coomassie-Färbungen der PVDF-Membranen getestet und war in allen Fällen gegeben (Abb. 53B). Weiterhin wurden in allen Fällen parallele Positivkontrollexperimente zwischen GST-FAM161A\_230-543 und FAM161A-1D4 durchgeführt, die zu starken Banden führten und die korrekten Bedingungen des GST-Pulldown-Experimente bestätigten (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Pulldown von Flag-KIF3A mit GST-FAM161A\_1-229 und GST-FAM161A\_230-543 wurde während der Bachelorarbeit von Christian Umkehrer durchgeführt (Umkehrer 2012). Hierbei konnte ebenfalls keine Interaktion zwischen KIF3A und FAM161A nachgewiesen werden.

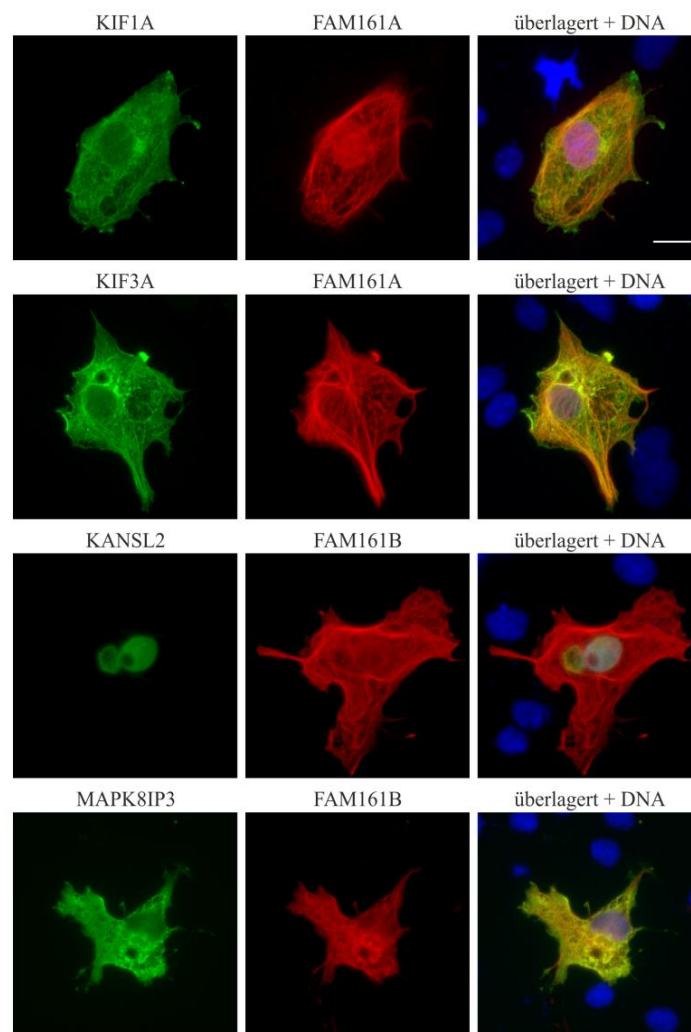


**Abb. 53: GST-Pulldown-Experimente mit GST-FAM161A-Fusionsproteinen und heterolog exprimierten potentiellen FAM161A-Interaktionspartnern.** (A) Western Blot Analyse (oben) des GST-Pulldown-Experiments mit Flag-MAPK8IP3 und verschiedenen GST-FAM161A-Proteinen. Coomassie-Färbung der PVDF-Membran (unten) zeigt eingesetzte Fusionsproteine (Anmerkung: GST-FAM161A-Fusionsproteine wurden jeweils in zwei verschiedenen Volumina [50 µl bzw. 100 µl] verwendet). (B) Western Blots der GST-Pulldown-Versuche mit GFP-KANSL2 (Oben) und KIF1A-Myc (Mitte). Die verwendeten GST-Proteine sind sichtbar in exemplarischer Coomassie-Färbung einer PVDF-Membran (Unten). Theoretische Molekularmassen der GST-Proteine: GST, 28 kDa; GST-FAM161A\_1-229, 54 kDa; GST-FAM161A\_230-386, 46 kDa; GST-FAM161A\_230-543, 64 kDa; GST-FAM161A\_230-660, 78 kDa.

Zum Abschluss der Validierung der Y2H-Ergebnisse wurden Lokalisierungsassays von FAM161-Konstrukten mit Säugetierexpressionskonstrukten der Kandidatenproteinen KIF1A, KIF3A, KANSL2 und MAPK8IP3 in COS-7-Zellen durchgeführt (Abb. 54). Die Kinesinmotorproteine KIF1A und KIF3A lokalisierten an den netzartigen Mikrotubuli-strukturen. An den Mikrotubuli kann eine teilweise Ko-Lokalisierung mit FAM161A beobachtet werden, was durchaus auf einen funktionellen Zusammenhang der Proteine *in vivo*



hindeuten könnte. Weiterhin kann aufgrund der ausschließlichen Kernlokalisierung von KANSL2, trotz teilweiser positiver Anhaltspunkte durch die Bindungsassay, eine Assoziation mit FAM161A oder FAM161B in COS-7-Zellen als eher unwahrscheinlich postuliert werden. Betrachtet man die Ko-Expression von MAPK8IP3 und FAM161B in den COS-7 Zellen, ergibt sich eine ähnliche Lokalisierung beider Proteine. In ersten Experimenten konnte, bedingt durch die Doppeltransfektion mit MAPK8IP3 eine morphologische Veränderung der FAM161B-Verteilung von netzartigen Strukturen durch die MT-Bindung hin zu einer verstärkten zytoplasmatischen Lokalisierung beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 54: Ko-Expression von FAM161-Proteinen mit potentiellen Interaktionspartnern in COS-7-Zellen.** Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen die Ko-Transfektionen von COS-7-Zellen mit FAM161-Konstrukten sowie KIF1A-, KIF3A-, KANSL2- und MAPK8IP3-Expressionsplasmiden. Maßstabsbalken 10 µm.

Insgesamt betrachtet konnten die potentiellen FAM161A-Interaktionspartner KANSL2, SPATA13 und KLC2, sowie IFT20 aufgrund der Ergebnisse der Bindungs- bzw. Lokalisierungsexperimente nicht bestätigt werden. Die Kinesinproteine KIF1A, KIF3A und KIF21B sowie DCTN1 und MAPK8IP3 zeigten teilweise nicht eindeutige Ergebnisse, können jedoch zu diesem Zeitpunkt nicht als Interaktionspartner ausgeschlossen werden.

## 6 Diskussion

### 6.1 Projekt 1: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Sorsby Fundusdystrophie - Pathomechanismus und Funktion von TIMP3

#### 6.1.1 Analysen zu Veränderungen der *Timp3*-Genexpression

*Timp3*-Genexpressionsanalysen von Fibroblasten- und RPE-Zellkulturen, die aus Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> isoliert worden waren, ergaben keine signifikanten Unterschiede als Folge der *Timp3*-Mutation. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Studien, in denen sich unveränderte *Timp2*- und *Timp3*-Expressionsprofile mit retinalen RNAs der Genotypen *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> und *Timp3*<sup>+/+</sup> ergaben (Janssen 2008). In derselben Versuchsreihe zeigte sich, im Vergleich zu wildtypischen Geweben, eine statistisch signifikante Erhöhung der *Timp1*- bzw. eine signifikante Verringerung der *Timp4*-Transkripte in Retinaea aus *Timp3*<sup>S156C/+</sup>-Tieren (Janssen 2008). Es ergeben sich somit zusammenfassend keine Hinweise auf die Beteiligung einer veränderten *Timp3*-Genexpression am Pathomechanismus der S156C-TIMP3-assoziierten Sorsby Fundusdystrophie. Eine erhöhte TIMP3-Proteinmenge, wie sie beispielsweise in primären Fibroblastenlinien der *Timp3*<sup>S156C/+</sup>-Mäuse beobachtet werden kann (Janssen 2008), ist somit sehr wahrscheinlich nicht mit einer Steigerung des entsprechenden mRNA-Levels verknüpft. Vergleichbare Ergebnisse wurden bereits in Studien mit SFD- und AMD-Spenderaugen erhalten, die keine Hinweise auf eine erhöhte TIMP3-mRNA Expression ermitteln konnten (Bailey et al. 2001, Chong et al. 2003).

#### 6.1.2 Ultrastrukturelle und histologische Untersuchungen in S156C-TIMP3 Mäusen

Die ursprünglichen Untersuchungen des S156C-TIMP3-assoziierten Phänotyps waren in *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Knockin-Mäusen mit einem C57BL/6-Hintergrund durchgeführt worden (Weber et al. 2002). Hierbei hatte sich lediglich ein milder Phänotyp mit geringen Veränderungen der BM und der basalen Mikrovillistrukturen der RPE-Zellen ergeben (Weber et al. 2002). Weiterführende Studien im Zuge der Doktorarbeit von Andreas Janssen zielten auf die Charakterisierung der Knockin-Mauslinien *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> auf dem Albinohintergrund CD1, der aufgrund der fehlenden RPE-Pigmentierung gewählt wurde, ab (Janssen 2008). Hierbei konnte nun ein Phänotyp mit knotenartigen Verdickungen der BM, sowie in das RPE verlängerten Bereichen der BM in 8 Monate alten *Timp3*<sup>S156C/+</sup>-Tieren beobachtet werden (Janssen 2008). Eine Desorganisation der BM in *Timp3*<sup>S156C/+</sup>-Mäusen wurde ebenso gefunden wie eine sub-RPE-Ablagerung von

elektronendichtem Material aus der extrazellulären Matrix (Janssen 2008). Die Ablagerungen, die bereits bei 3 Monate alten Tiere zu finden waren, enthielten u.a. TIMP3-immunsensitives Material (Janssen 2008). Weiterhin wurden eine Zerstörung der fünfschichtigen Organisation der BM und vor allem eine Auflösung der zentralen Elastinschicht ermittelt (Janssen 2008). Homozygote Tiere zeigten den beschriebenen Phänotyp hingegen nicht (Janssen 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde eine größer angelegte Studie mit 6, 9 und 12 Monate alten Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> auf dem CD1-Hintergrund durchgeführt. Diese Tiere wurden jedoch aus einer CD1-Kolonie gezüchtet, die unabhängig von der in den Experimenten von Andreas Janssen verwendeten Kolonie waren. Die sub-RPE-Ablagerungen in 3 Monate alten heterozygoten Tieren konnten in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die 6 Monate alten Mäuse zeigten eine relativ geringe Menge an Ablagerungen. Vielmehr wurde in allen Genotypen ein kontinuierlicher und vergleichbarer, altersbedingter Anstieg des elektronendichten Materials in Bereich der BM/RPE Übergangszone ermittelt. Erwähnenswert ist die sehr hohe Variabilität bezüglich des elektronendichten Materials, die sich zwischen Tieren derselben Genotypen und Altersstufen bei Auswertung der Dünnschnitte ergab. In der vorliegenden Arbeit konnten somit die ursprünglichen Beobachtungen im Bezug auf die phänotypischen Auswirkungen der S156C-TIMP3 Mutation auf Mäuse des CD1-Hintergrunds nicht bestätigt werden. Ein Grund dafür könnte die angesprochene Verwendung verschiedener CD1-Mauslinien sein, die durch einen möglichen Koloniegründereffekt zu einer unterschiedlichen phänotypischen Ausprägung des *Timp3*-Gendefekts geführt haben könnten.

Die elektronenmikroskopischen Experimente der vorliegenden Arbeit wurden durch immunhistologische Färbungen von retinalen Schnitten aus 1,5, 3, 4,5, 10, 12 und 16 Monate alten Tieren der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> ergänzt. Insbesondere wurde ein mögliches Auftreten von Entzündungsprozessen, wie sie z.B. mit AMD in Verbindung gebracht wurden (Francis & Klein 2011), in den Augen von Tieren mit S156C-mutiertem TIMP3 mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen und Antikörpern gegen charakteristische Proteine der retinalen Mikroglia und Makrophagen untersucht. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Mikrogliallokalisierung oder -aktivierung in den verschiedenen Genotypen ermittelt werden. Die Ergebnisse deuten also zusammenfassend darauf hin, dass Entzündungsprozesse nicht in der Entwicklung von phänotypischen Auffälligkeiten, wie z.B. eine erhöhte Anzahl von Immunzellen, als Folge der S156C-Mutation in TIMP3 beteiligt sind.

ICC-Färbungen gegen TIMP3 in der BM der verschiedenen Genotypen konnten ebenfalls keine auffälligen Unterschiede ermitteln. Diese Daten stehen in Einklang mit den Experimenten der Dissertation von Andreas Janssen (Janssen 2008). TIMP3-Lokalisierungsstudien konnten hier ebenfalls keine größeren Auffälligkeiten in Abhängigkeit des *Timp3*-Genotyps liefern (Janssen 2008). Lediglich in *Timp3*<sup>S156C/+</sup>-Tieren konnte eine leichte Verlagerung der TIMP3-Fluoreszenzsignale hin zur inneren Retina um die Kerne der RPE-Zellen detektiert werden (Janssen 2008). Eine abschließende quantitative Auswertung einer eventuellen TIMP3-Akkumulation in Retinaschnitten von *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Mäusen wurde jedoch bisher nicht durchgeführt.

### 6.1.3 Erhöhung der Proteasomaktivität durch die S156C-TIMP3-Mutation

Zur Untersuchung des Einflusses der S156C-Mutation auf die fehlerhafte Faltung von TIMP3 wurden in der vorliegenden Arbeit Proteasomaktivitätstests mit Zelllysaten aus Fibroblasten- und RPE-Kulturen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> durchgeführt. Aufgrund der beobachteten Ausbildung von hochmolekularen Aggregaten als Folge der TIMP3-Mutationen (Langton et al. 2000, Yeow et al. 2002, Weber et al. 2002, Arris et al. 2003) wurde die Möglichkeit einer Störung des Proteasoms aufgrund der Ansammlung von falsch gefalteten und aggregierten TIMP3-Molekülen in Betracht gezogen. Eine Ansammlung von misgefalteten Proteinen, beispielsweise durch ungepaarte Cysteinreste, kann zu einer Störung der Homöostase des Endoplasmatischen Reticulums (ER) führen (Brown & Naidoo 2012). Das ER ist ein Organell mit verschiedenen zellulären Aufgaben wie z.B. Proteinfaltung oder Lipidbiosynthese (Brown & Naidoo 2012). Störungen des ER-Systems können zur Induktion von ER-Stress und zu verstärkter Expression von Mitgliedern verschiedener Signalwege des sogenannten „Unfolded Protein Response“ (UPR) führen (Brown & Naidoo 2012). Der UPR-Mechanismus bewirkt unter normalen physiologischen Bedingungen eine Degradation von fehlerhaft gefalteten Proteinen und eine verminderte Proteintranslation (Brown & Naidoo 2012). Kommt es jedoch zu einem gehäuftem Auftreten von ER-Stress, woraufhin dieser nicht mehr durch das UPR-System gelöst werden kann, sind oftmals apoptotische Prozesse oder die Anhäufung von unlöslichen Materialien als Folge zu beobachten (Brown & Naidoo 2012). Diese Phänomene sind Teil der Pathomechanismen vieler altersbedingter neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Typ II Diabetis (Brown & Naidoo 2012). Alterungsprozesse in neuronalen Retinazellen von Ratten konnten z.B. mit einer sinkenden Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms korreliert werden (Kapphahn et al. 2007). Die UPR-Stressantwort löst im Wesentlichen drei verschiedene Mechanismen aus. Neben der Hochregulierung von ER-Chaperonen, wie z.B.

GRP78/BiP (Glukose reguliertes Protein 78 oder Immunglobulinbindeprotein), die bei der korrekten Faltung von Proteinen helfen, und der PERK (PKR ähnliche ER-Kinase)-vermittelten Phosphorylierung der Translationsinitiations-faktors eIF2 $\alpha$ , die zur Dämpfung der Translation führt, kommt es zur proteasomalen Degradation von falsch gefalteten Proteinen (Brown & Naidoo 2012). Das Proteasom ist ein sehr großer Proteinkomplex (2590 kDa) zur proteolytischen Spaltung von polyubiquitinierten, kurzlebigen oder fehlerhaften Proteinen (Tanaka et al. 2012). Der proteolytische Kernbereich (CP) wird von entweder einem oder zwei terminalen regulatorischen Untereinheiten (RP) zum RP-CP (26S Proteasom) oder zum RP-CP-RP (30S Proteasom) ergänzt (Tanaka et al. 2012). Der CP-Kernbereich, bestehend aus zwei äußeren  $\alpha$ - und zwei inneren  $\beta$ -Ring, die jeweils aus sieben  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten zusammengebaut sind, trägt die enzymatischen Aktivitäten (Tanaka et al. 2012). Die Caspase (oder auch Peptidyl-Glutamyl-Peptid-Hydrolase)-, Trypsin-, sowie Chymotrypsin-ähnlichen Aktivitäten werden von den  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-Untereinheiten im inneren der  $\beta$ -Ringe ausgebildet (Tanaka et al. 2012). Durch katalytisch aktive Threoninreste wird hierdurch die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen am C-terminalen Ende von sauren, basischen und hydrophoben Aminosäuren ausgeführt (Tanaka et al. 2012).

Zur Untersuchung der UPR-induzierten Prozesse in murinen Fibroblasten- und RPE-Zellen mit S156C-mutiertem TIMP3 waren in Vorarbeiten Expressionsprofile von ER-Stressmarkerproteinen, wie z.B. ATF4, ATF6, GRP78/BiP, PERK, nach Tunicamycin-induzierten Sekretionsstress angefertigt worden. Hierbei ergaben sich jedoch keine signifikant unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurde nun der Einfluss der TIMP3-Defizienz, sowie der S156C-Mutation in TIMP3 auf die drei Hauptaktivitäten des Proteasoms untersucht. Die TIMP3-Defizienz hatte dabei keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die proteasomalen Aktivitäten. Dies wurde durchaus erwartet, da durch das Fehlen von TIMP3 kein zusätzlicher UPR-Stress induziert worden sein sollte. Die Proteasomtätigkeit von Zellen aus *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Tieren zeigten einen, zum Teil statistisch signifikanten, Anstieg verglichen mit Wildtypzellen. Statt einer anfangs vermuteten Störung des UPR-Systems war es somit zu einer leichten Anregung der Proteasomaktivität gekommen, die möglicherweise durch eine leicht erhöhte Aggregatbildung aufgrund der TIMP3-S156C-Mutation induziert worden sein könnte. Weitere Versuche, in denen Zellen durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zusätzlicher oxidativer Stress zugefügt worden war, um die Anpassungsfähigkeit des Proteasomsystems in den Zellen der verschiedenen Genotypen mit der S156C-TIMP3-Mutation zu untersuchen, zeigten, im Vergleich zu unbehandelten und

wildtypischen Zellen, ebenfalls keine Beeinträchtigungen der proteasomalen Aktivität (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend konnte somit kein negativer Einfluss der TIMP3-Defizienz oder der TIMP3-Mutation S156C auf die korrekte Funktion der ER- bzw. UPR-Stressantwort in murinen Fibroblasten und RPE-Zellkulturen entdeckt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse scheint somit die Störung des UPR-Systems als Folge einer fehlerhaften Faltung durch den ungepaarten Cysteinrest in S156C-TIMP3 nicht vorhanden zu sein. Die bereits beschriebene Beeinträchtigung der proteasomalen Funktion aufgrund altersbedingter Prozesse hauptsächlich in der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität in neuronalem Retinagewebe (Kapphahn et al. 2007) könnte die Möglichkeit weiterer Proteasomaktivitätsexperimente mit retinalen Zelllysaten sinnvoll erscheinen lassen.

#### 6.1.4 S156C-TIMP3-vermittelte Erhöhung der EZM-Produktion

Zur Ermittlung einer Beteiligung von S156C-mutiertem TIMP3 an der Beeinträchtigung der EZM-Homöostase wurden in dieser Arbeit *in vivo* EZM-Syntheseexperimente durchgeführt. In früheren Arbeiten konnte eine Akkumulation von punktmutierten TIMP3-Molekülen in der Bruchschenden Membran, der extrazellulären Matrix zwischen der RPE-Zellschicht und der Aderhaut, registriert werden (Janssen 2008). Darüber hinaus zeigten immunzytochemische Untersuchungen in Fibroblasten- und RPE-Zellkulturen von Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> verglichen mit wildtypischen Zellen eine gesteigerte zytoplasmatische TIMP3-Proteinmenge (Janssen 2008). Diese Ergebnisse konnten weiterhin durch verschiedene Western Blot Experimente quantitativ erfasst werden (Weber et al. 2002, Soboleva et al. 2003). Um nun diese, möglicherweise am Pathomechanismus der SFD beteiligten Effekte weiter zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einbau von radioaktiv markiertem Prolin, der ein Maß für die Neusyntheserate der EZM ist, in Fibroblasten- und primären RPE-Zellkulturen von *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Tieren bestimmt und mit den Werten von wildtypischen Zellen (*Timp3*<sup>+/+</sup>) verglichen. Hierbei ergab sich eine tendenzielle Erhöhung der EZM-Neusynthese in S156C-TIMP3-mutierten Zellen, die jedoch nur in Fibroblasten von Tieren des Genotyps *Timp3*<sup>S156C/+</sup> als statistisch signifikant bezeichnet werden konnte. Somit hatten sich im Zuge dieser Experimente Tendenzen hin zu einer erhöhten EZM-Synthese aufgrund des S156C-mutierten TIMP3 ergeben, die jedoch in weiteren Experimenten validiert werden müssen. So könnte beispielsweise durch Fütterung der Zellen mit radioaktiv markiertem Glucosaminhydrochlorid weiteren Daten über die TIMP3-Abhängigkeit des Einbaus von zusätzlichen Komponenten, wie z.B. Proteoglykanen oder verschiedenen sulfatierten Glykosaminoglykanen in die EZM gewonnen werden. Eine gesteigerte *de novo* EZM-Syntheserate könnte theoretisch auf eine erhöhte *Timp3*-

Genexpression und damit einem verringerten EZM-Abbau durch die TIMP3-gebundenen Proteasen oder auf eine Akkumulation von TIMP3 in der EZM zurückzuführen sein. Da jedoch in dieser und in vorherigen Arbeiten keine veränderte *Timp3*-Expression als Folge der S156C-Mutation gefunden werden konnte, ist somit ein verringerter EZM-Abbau durch eine Anhäufung von TIMP3, z.B. durch eine erhöhte Halbwertszeit der mutierten Proteine, in der extrazellulären Matrix am Wahrscheinlichsten (Chong et al. 2003, Janssen 2008). Zusammenfassend haben sich durch die Experimente zur *de novo* EZM-Synthese Hinweise auf eine Beteiligung von heterozygot S156C-mutiertem TIMP3, vor allem in Fibroblasten-Zellen des Genotyps *Timp3*<sup>S156C/+</sup>, an einem veränderten EZM-Umsatz ergeben. Dieses Phänomen könnte einen Teilaspekt des SFD-assoziierten Pathomechanismus darstellen.

### 6.1.5 Veränderungen der EZM-Wechselwirkung von mutiertem TIMP3

Um TIMP3-Bindungspartner in der EZM ermitteln und den Einfluss verschiedener TIMP3-Mutationen auf diese Wechselwirkungen untersuchen zu können, wurden unterschiedliche Komponenten der EZM von Fibroblasten der Mauslinien *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> bzw. von TIMP3-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen mittels Enzymverdau aus der Matrix gelöst. Durch Quantifizierung der verbleibenden EZM-gebundenen TIMP3-Moleküle wurde nachfolgend auf die Assoziationsstärke der EZM-Komponenten mit TIMP3 geschlossen. Die EZM-Assoziation von TIMP3, die durch Behandlung mit SDS oder Guanidin aufgelöst werden konnte, war erstmals in embryonalen Fibroblasten der Spezies Huhn nachgewiesen worden (Blenis & Hawkes 1983, Blenis & Hawkes 1984). Von der EZM-Bindung von wildtypischem TIMP3 sowohl in der glykosylierten als auch in der unglykosylierten Form wurde ursprünglich angenommen, dass sie hauptsächlich durch kovalente Wechselwirkungen des C-terminalen Proteinbereichs vermittelt wird (Langton et al. 1998). TIMP1, TIMP2 und TIMP3 weisen eine ähnliche molekulare Struktur auf, bei der die Inhibierung der Proteinasesubstrate vom N-Terminus ausgeht und die speziellen Funktionen durch den C-Terminus ausgefüllt werden (Willenbrock & Murphy 1994, Langton et al. 1998). Experimente mit TIMP3-Abbruchkonstrukten konnten zeigen, dass die C-terminalen Aminosäuren 121-189 ausreichend für eine EZM-Lokalisierung waren (Langton et al. 1998). Eine unterstützende Funktion des N-terminalen Proteinbereichs konnte hier jedoch aufgrund einer im Vergleich zu wildtypischem TIMP3 etwas schwächeren EZM-Bindungsfähigkeit des TIMP3-Fragments und einer ermittelten Assoziation des N-terminalen TIMP3-Fragments mit Heparin nicht ausgeschlossen werden (Langton et al. 1998, Yu et al. 2000). Detaillierte Studien neueren Datums konnten eine exaktere Bestimmung der an der EZM-Bindung beteiligten TIMP3-Aminosäurereste erreichen (Lee et al. 2007). Durch Punktmutationsstudien

wurde eine Beteiligung sowohl der N-terminalen TIMP3-Aminosäuren Lys-26, Lys-27, Lys-30 und Lys-76 als auch der C-terminalen Reste Arg-163 und Lys-165 an der Ausbildung einer fortlaufenden, positiv geladenen EZM-Bindungsoberfläche nachgewiesen (Lee et al. 2007). Somit scheint keiner der bisher identifizierten SFD-assoziierten TIMP3-Mutationen an einer direkten Störung der EZM-Interaktion beteiligt zu sein. Auf molekularer Ebene wurden Hinweise auf die Beteiligung von EZM-gebundenen, sulfatierten Glykosaminoglycanen an der TIMP3-Bindung erhalten (Yu et al. 2000). Yu und Mitarbeiter konnten dabei TIMP3 durch Behandlung mit Heparin-, Heparan- oder Chondroitansulfat aus der EZM von Rattenuterusgewebe erfolgreich extrahieren (Yu et al. 2000). Eine effektive Extraktion von TIMP3 konnte weiterhin vor allem durch einen kombinierten enzymatischen Verdau der EZM mit Heparinase III und Chondroitinase ABC erreicht werden. Zusammenfassend wurden somit negativ geladene Glykosaminoglykane als potentielle Bindungspartner des positiv geladenen N-terminalen TIMP3-Proteinbereichs postuliert (Yu et al. 2000). Jüngere Experimente, bei denen mehrere TIMP3-Varianten heterolog in COS-7-Zellen exprimiert und deren Bindungsstärken an verschiedene immobilisierte Komponenten der EZM ermittelt wurden, ergaben Elastin und Laminin als stärkste TIMP3-Interaktionspartner, während Chondroitin- und Heparinsulfate und vor allem die Typ-I- und Typ-IV-Kollagene nur schwache Wechselwirkungen mit TIMP3 zeigten (Majid et al. 2006). Weiterhin konnte kein Effekt der TIMP3-Mutationen an den Positionen Ser-181, Gly-167, Ser-156 und Tyr-168 auf eine möglicherweise verstärkte Assoziation mit den EZM-Komponenten entdeckt werden (Majid et al. 2006). Im Zuge der Arbeiten von Majid und Kollegen wurden mögliche Szenarien für den Effekt von mutiertem TIMP3 auf die EZM diskutiert (Majid et al. 2006). Da ein TIMP3-Überschuss in RPE-Zellen mit einer erhöhten Apoptoserate in Verbindung gebracht wurde (Majid et al. 2002), könnte dem SFD-assoziierten Pathomechanismus eine Akkumulation von TIMP3 in der EZM, entweder durch eine erhöhte Stabilisierung von mutiertem TIMP3 gegenüber proteolytischem Abbau oder durch eine gesteigerte thermodynamische Stabilität im Vergleich zu wildtypischem TIMP3, zu Grunde liegen (Majid et al. 2006). Eine verringerte Umsatzrate von EZM-gebundenem E139X-, S156C- und S181C-mutiertem TIMP3 durch ARPE19-Zellen (Langton et al. 2005) konnte ebenso experimental nachgewiesen werden wie eine erhöhte thermodynamische Stabilität von EZM-assoziierten TIMP3-Molekülen mit den Aminosäuresubstitutionen S156C, G167C, Y168C oder S181C in COS-7 Zellen. (Majid et al. 2007) Als Grundaussage der hier erwähnten früheren Studien konnte den bekannten TIMP3-Mutationen von SFD-Patienten somit eher eine Zugewinnmutation aufgrund veränderter EZM-Assoziation als eine Haploinsuffizienz oder eine Verlustmutation durch das Fehlen einer funktionellen TIMP3-Kopie zugeordnet werden. Die in der vorliegenden Dissertation



durchgeführten Bindungsstudien zielten nun darauf ab, detailliertere Einblicke in die EZM-Bindungspartner von TIMP3 und den Einfluss einer großen Bandbreite von SFD-assoziierten und SFD-unabhängigen TIMP3-Mutationen zu liefern. Die anfänglichen Experimente wurden mit EZMs aus murinen Fibroblasten der verschiedenen Genotypen *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> durchgeführt. Die gesteigerten EZM-gebundenen TIMP3-Proteinmengen in S156C-TIMP3 heterozygoten und homozygoten Zellen bestätigten erneut die postulierte Ablagerung von mutantern TIMP3 in der EZM, die als Teil des SFD-Pathomechanismus angesehen wird (Fariss 1998 et al., Janssen 2008). In den Bindungsversuchen von wildtypischen TIMP3 an ausgewählte EZM-Komponenten in der vorliegenden Arbeit konnte Elastin als hauptsächlicher Bindungspartner der untersuchten EZM-Bestandteile ermittelt werden. Den Chondroitinase ABC-, Heparinase III, Kollagenase- und Trypsin-sensitiven EZM-Bestandteilen konnte dagegen keine nachweisbare TIMP3-Interaktion zugordnet werden. Diese Ergebnisse spiegeln teilweise die bereits erwähnten früheren Studien wieder, die Elastin neben Laminin als Hauptbindungspartner für TIMP3 ermittelt (Majid et al. 2006), den sulfatierten Glykosaminoglycane eine vorhandene (Yu et al. 2000), aber eher schwächere TIMP3-Bindungsfähigkeit (Majid et al. 2006) und Kollagen keine TIMP3-Interaktion zugordnet hatten (Chong et al. 2000, Majid et al. 2007). Weiterhin wurde der Einfluss der S156C-Mutation in TIMP3 auf die EZM-Assoziation untersucht. Biologisch relevante Veränderungen konnten hierbei lediglich durch den Trypsinverdaу der Fibroblasten-EZMs ermittelt werden. Die Folge des Trypsinverdaуs von EZMs der Zellen mit der S156C-TIMP3 Punktmutation war offensichtlich eine verringerte EZM-gebundene TIMP3-Menge. Ein denkbarer Grund hierfür könnte möglicherweise eine veränderte EZM-Bindung der mutierten TIMP3-Moleküle sein. Der Trypsinverdaу erfolgt nach Lysin- und Argininresten. Die S156C-Mutation könnte womöglich Einfluss auf die Struktur des TIMP3-Proteins in der EZM haben und dessen Erreichbarkeit durch Trypsin erhöhen. Eine zweite Theorie könnte von einer erhöhten unspezifischen EZM-Bindungsfähigkeit der S156C-mutierten TIMP3-Moleküle ausgehen. Eine verstärkte Bindung von S156C-TIMP3 an Trypsin-sensitive EZM-Bestandteile, möglicherweise aufgrund eines zusätzlichen, ungepaarten Cysteinrestes, könnte somit den beobachteten Verlust des EZM-gebundenen TIMP3-Signals als Folge des Trypsinverdaуs induzieren. Die gesteigerte unspezifische EZM-Bindung würde wiederum die Anreicherung von TIMP3 in der Matrix der mutierten Fibroblasten erklären. Die angesprochene zweite Theorie könnte dadurch Teilaspekte der Hypothese einer gesteigerten Ansammlung von mutierten TIMP3-Molekülen als Folge einer Zugewinnmutation und als Teil des SFD-assoziierten Pathomechanismus weiter unterstützen (Fariss 1998 et al., Janssen 2008). Nachdem die Studien mit endogenem TIMP3 in

Fibroblasten-EZMs durchgeführt worden waren, wurde anschließend versucht, die erhaltenen Resultate durch Verdauexperimente von EZMs aus HEK293-EBNA-Zellen mit heterolog exprimierten TIMP3-Varianten zu ergänzen. Da HEK293-EBNA-Zellen kein detektierbares endogenes TIMP3 besitzen und die erfolgreiche Expression mehrerer TIMP3-Konstrukte gezeigt werden konnte, eignete sich dieses System für die weiteren EZM-Verdauexperimente. Verdauexperimente mit heterolog exprimiertem wildtypischem TIMP3 deuteten, ähnlich endogenem TIMP3 in Fibroblasten, auf eine Wechselwirkung mit Elastase-sensitiven und auf eine fehlende Assoziation mit Kollagenase-, Chondroitinase ABC- und Heparinase III-sensitiven EZM-Komponenten hin. Verringerte TIMP3-Signale nach Trypsinverdau gaben Anhaltspunkte auf eine stärkere Assoziation mit Trypsin-sensitiven EZM-Bestandteilen. Die Einführung der TIMP3-Mutationen S156M und H158R zeigten nach Enzymverdau keine Unterschiede zu wildtypischem TIMP3. Der Aminosäureaustausch S156M stellt keine natürlich vorkommende SFD-Mutation dar und wurde zur Ermittlung des spezifischen Einflusses einer Cystein-unabhängigen Mutation an Position 156 in die Studie aufgenommen. Die Bedeutung des Cysteins-156 wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter verdeutlicht, da S156M-mutiertes TIMP3 ein dem Wildtyp ähnliches Verhalten aufweist. Analog dazu zeigte die Mutation H158R einen Effekt, der in einem Bereich zwischen wildtypischem und S156C-mutiertem TIMP3 anzusiedeln ist. Der Cystein-unabhängige Aminosäureaustausch H158R ist mit einer spät einsetzenden Form der SFD assoziiert (Lin et al. 2006). Die Experimente mit heterolog exprimiertem H158R-TIMP3 könnten die Beobachtungen einer schwächeren phänotypischen Ausprägung dieses Gendefekts in SFD-Patienten unterstützen. Die Punktmutationen S156C und E139K zeigten eine statistisch signifikante Verringerung der verbleibenden EZM-gebundenen TIMP3-Signale nach Trypsinverdau. Die verstärkte Bindung von S156C-TIMP3 an Elastase-sensitive EZM-Komponenten ergab einen zusätzlichen Hinweis auf die negativen Auswirkungen der S156C-TIMP3 bezüglich der EZM-Assoziation. Durch statistische Auswertung der Western Blot Analysen nach Trypsinverdau der entsprechenden EZMs mit heterolog exprimierten weiteren SFD-assozierten oder SFD-unabhängigen TIMP3-Mutationskonstrukten konnte ein allgemeiner Trend der Konsequenz einer Cystein-abhängigen Aminosäuresubstitutionen beobachtet werden. Verringerte bzw. komplett fehlende TIMP3-Signale als Folge des Trypsinverdaus deuteten auf eine veränderte EZM-Assoziation bzw. eine verstärkte EZM-Bindung von mutierten TIMP3-Molekülen hin. Ein WT-ähnliches Verhalten zeigten lediglich TIMP3-Proteine mit den SFD-unabhängigen Mutationen S156M und S183C, sowie mit der spät einsetzenden SFD-Form verbundenen Mutation H158R. Überraschende Ergebnisse lieferte die SFD-Mutation S181C-TIMP3. Der Trypsinverdau übte keinen Einfluss auf die EZM-Bindefähigkeit dieses mutierten TIMP3-

Proteins aus. Um diesem Phänomen auf den Grund zu gehen und um vom TIMP3-Antikörper unabhängige Ergebnisse zu erzielen, wurden verschiedene TIMP3-Konstrukte mit einem 6xHis-markierten C-Terminus exprimiert und die entsprechenden EZMs einem Trypsinverdau unterzogen. Hierbei zeigte sich bezüglich wildtypischen TIMP3 und den TIMP3-Mutationskonstrukten S156C und E139K das bereits bekannte Bild. Während Wildtyp-TIMP3 durch den Trypsinverdau nicht aus der EZM gelöst werden konnte, waren die immunsensitiven Banden der S156C- und E139K-Konstrukte nach dem Enzymverdau nahezu vollständig aus der EZM entfernt. Die EZMs von S181C-TIMP3 exprimierenden Zellen zeigten nun ebenfalls eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Trypsinverdau. Die Ergebnisse von unmarkiertem und His-getagtem S181-TIMP3 konnten somit kein einheitliches Bild aufweisen. Die relativ großen Unterschiede der Western Blot Ergebnisse von getagtem und nichtgetagtem S181C-TIMP3 können nur schwer erklärt werden. Möglicherweise besitzt das His-markierte S181C-TIMP3 per se eine geringere Stabilität bzw. EZM-Bindungsstärke. Weitere Experimente, bei denen die restlichen TIMP3-Mutationskonstrukte mit einem His-Tag versehen werden könnten und quantitativen Analyse der Trypsinverdauexperimente mit den bereits vorhandenen His-TIMP3-Expressionsplasmiden könnten dabei helfen, die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse weiter zu vertiefen und die Diskrepanz im Bezug auf die S181C-Mutation aufzuklären.

Zusammenfassend konnten in der vorliegenden Arbeit verstärkte oder veränderte EZM-Bindungen der meisten SFD-assoziierten TIMP3-mutierten Proteine, die vor allem durch Trypsinverdau der EZM deutlich wurden, ermittelt werden. Diese stärkeren bzw. unspezifischen Bindungen die durch die SFD-artigen Aminosäureveränderungen in den TIMP3-Molekülen ausgelöst werden, könnten die bisher bekannten Teilaspekte des SFD-Pathomechanismus weiter unterstützen und untermauern. Die postulierte Hypothese, wonach ein großer Teil der TIMP3-Punktmutation zu einem ungepaarten Cysteinrest führt, was wiederum eine veränderte bzw. erhöhte Anreicherung der TIMP3-Proteine in der BM von SFD-Patienten bewirkt, konnte durch die Experimente zur EZM-Wechselwirkung von endogenem TIMP3 bzw. von murinen TIMP3-Expressiononstrukten teilweise bestätigt und weiter untermauert werden.

#### **6.1.6 Molekulare Mechanismen der *TIMP3*-assoziierten Sorsby Fundusdystrophie**

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Teilaspekte, die möglicherweise eine Rolle im Pathomechanismus der SFD spielen könnten, untersucht. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf eine Beteiligung einer erhöhten *Timp3*-Genexpression an der TIMP3-Akkumulation in der

BM. Ultrastrukturelle Veränderungen im Bereich der BM, die eindeutig auf die S156C-Mutation in TIMP3 zurückzuführen wären, sowie Beeinträchtigungen des proteasomalen Abbauwegs durch eine Anreicherung von fehlerhaft gefalteten S156C-TIMP3 Molekülen *in vitro* konnten ebenfalls nicht ermittelt werden. Möglicherweise für den Pathomechanismus relevante Veränderung in der EZM-Homöostase aufgrund einer heterozygoten S156C-Mutation in TIMP3 konnten ebenso beobachtet werden, wie eine veränderte, womöglich durch unspezifische Bindung hervorgerufene EZM-Assoziation von, endogenem S156C-mutiertem TIMP3 bzw. von heterolog exprimierten TIMP3-Varianten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse stützen somit die Hypothesen wonach die TIMP3-Mutationen zu einer Akkumulation, möglicherweise aufgrund einer unbekannten Zugewinnmutation, von fehlerhaftem TIMP3 in der BM von SFD-Patienten führt, die im weiteren Verlauf zur Verdickung und zur Manifestierung der SFD-assoziierten phänotypischen Konsequenzen beiträgt.

## **6.2 Projekt 2: Aufklärung der erblichen Netzhautdegeneration Retinitis Pigmentosa (RP28) - Pathomechanismus und Funktion von FAM161A**

### **6.2.1 Lokalisierung von humanem und murinem FAM161A im Verbindungszilium und dem Basalkörper der Photorezeptoren**

FAM161A-Lokalisierungsexperimente innerhalb der murinen und humanen Retina ergaben eine Präsenz des Proteins hauptsächlich im Innensegment der Photorezeptoren, sowie in der äußeren plexiformen Schicht der Retina (Zach et al. 2012). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit einer weiteren Studie (Di Gioia et al. 2012) und konnten zuvor durchgeführte Experimente bestätigen (Langmann et al. 2010, Bandah-Rozenfeld et al. 2010). Zur Validierung und weiteren, detaillierteren Darstellung der sub-zellulären Eingrenzung von FAM161A wurden Ko-Lokalisierungsexperimente mit bekannten Markerproteinen, verschiedene Fixiermethoden für die Immunfluoreszenzfärbungen, sowie immunelektronenmikroskopische Untersuchungen getestet (Zach et al. 2012). Vor allem aufgrund der kompletten Ko-Lokalisierung von FAM161A mit Centrin-3 ergab sich aus diesen Experimenten, übereinstimmend mit der parallel durchgeführten Studie (Di Gioia et al. 2012), eine Lokalisierung von FAM161A im Verbindungszilium der Photorezeptoren, im Basalkörper und in der anliegenden Zentriolenstruktur (Zach et al. 2012).

In den Photorezeptoren der Wirbeltiere lokalisieren die Centrine in Bereich des Übergangsziliums und des Basalkörpers (Trojan et al. 2008). In kultivierten Zellen mit primärem Zilium, beispielsweise hTERT-RPE-1 Zellen sind Centrine ausnahmslos an der Basis des Ziliums zu finden (Trojan et al. 2008). Diese entspricht exakt der Lokalisierung, die FAM161A in Photorezeptoren, sowie in Zellen mit primärem Zilium zeigt (Di Gioia et al. 2012, Zach et al. 2012). Bindungsexperimente in Photorezeptoren zeigten eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Assoziation der Centrine mit dem  $\beta\gamma$ -Heterodimer des G-Proteins Transducin (Giessl et al. 2006, Trojan et al. 2008). Unter anderem aufgrund dieser Interaktion fungieren Centrine in Photorezeptoren als Regulatoren der Translokation von Transducin durch das Verbindungszilium und erfüllen somit eine wichtige Rolle in der korrekten Funktion der Photorezeptorzellen (Trojan et al. 2008). Durch die Ähnlichkeiten in der Lokalisation von FAM161A und Centrin 3 in den Photorezeptoren könnte sich ein struktureller und funktioneller Zusammenhang im Verbindungszilium der Photorezeptoren ergeben.

Das Verbindungszilium der Photorezeptoren stellt ein Äquivalent der Übergangszone („transition zone“) in primären Zilien dar (Czarnecki & Shah 2012). Die Mikrotubulistrukturen von primären Zilien entspringen dem Basalkörper in einer 9x3

Anordnung (A-, B- und C-Röhre) (Czarnecki & Shah 2012). Sogenannte Übergangsfasern, die an den B-Röhren der Mikrotubuli und der periziliären Membran verankert sind, umspannen dabei in einer Propeller-ähnlichen Anordnung die Mikrotubulischienen (Czarnecki & Shah 2012). Im Mittelbereich der Übergangszone befinden sich die Mikrotubuli in einer 9x2 Struktur (A- und B-Röhre) und werden durch Y-förmige Verbindungen, die das sogenannte ziliäre Band („ciliary necklace“) bilden, an der ziliären Membran verankert (Czarnecki & Shah 2012). Durch diese Architektur und durch Proteine an der Basis des Ziliums bildet die Übergangszone der Zilien mit Hilfe der Übergangsfasern eine Barriere für unkontrollierte Membrandiffusionen und etabliert damit ein eigenes, vom Zytoplasma getrenntes ziliäres Kompartiment (Hu & Nelson 2011, Reiter et al. 2012). An der Ausbildung der Diffusionsbarriere und der Basis des Ziliums sind Septine in der ziliären Membran beteiligt (Hu & Nelson 2011). Septine sind GTPasen, die zusammen mit anderen Familienmitgliedern größere geordnete Strukturen, z.B. Ringe bilden können (Hu & Nelson 2011, Reiter et al. 2012). Die Anreicherung und eingeschränkte Verteilung von Proteinen und Lipiden in der Membran des Ziliums bildet somit eine von der Plasmamembran physikalisch und funktionell abgetrennte Einheit (Hu & Nelson 2011, Chih et al. 2012). Die potentiellen FAM161A-Interaktionspartner OFD1 und CEP290 (Di Gioia et al. 2012) sind Bestandteile der Zentriole bzw. der Y-Verbindungen (Reiter et al. 2012). Lebercilin, ein weiterer FAM161A-Interaktionspartner (Di Gioia et al. 2012), lokalisiert in der Übergangszone, wirkt vermutlich am Andocken von IFT-Partikeln mit und ist für die Belieferung der Außensegmente mit Opsin von Nöten (Reiter et al. 2012). Aus dem Aufbau der Übergangszone ergibt sich eine regulierbare Schranke für Proteine, die für das ziliäre Kompartiment bestimmt sind (Reiter et al. 2012). Der Aufbau und die Aufrechterhaltung der Übergangszone werden durch die Genprodukte der Ziliopathie-assoziierten Gene der NPHP-/JBTS-/MKS-Familien bestimmt (Czarnecki & Shah 2012). Etwa 30 Proteine, die in vier miteinander kommunizierende Proteininteraktionsmodule klassifiziert werden können (NPHP 1-4-8, MKS/B9, NPHP5-6 und Inversin-Bereich), konnten bisher im Abschnitt zwischen dem Basalkörper und der Duplettzone des Übergangsbereichs gefunden werden (Chih et al. 2012, Czarnecki & Shah 2012). Diese Proteine sind an der Regulierung der Ziliogenese, sowie der Membranzusammensetzung des Ziliums beteiligt (Chih et al. 2012, Garcia-Gonzalo et al. 2011). Y2H-Interaktionsstudien zur Identifikation von direkten Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten die Proteine lebercilin (*LCA5*), CEP290, OFD1 und SDCCAG8 als FAM161A-Bindungspartner identifizieren (Di Gioia et al. 2012). CEP290, OFD1 und SDCCAG8 sind Komponenten der angesprochenen Proteininteraktionsmodule zwischen Basalkörper und Übergangszone des Photorezeptorziliums (Czarnecki & Shah 2012). Aufgrund der

Lokalisation (Zach et al. 2012) und der identifizierten Interaktionspartner (Di Gioia et al. 2012) könnte FAM161A ein funktioneller Bestandteil der Proteinnetzwerke im Bereich des Basalkörpers und der Übergangszone sein. Aus der ermittelten Lokalisation von FAM161A in den Photorezeptoren (Zach et al. 2012) könnten sich weitere Rückschlüsse auf die Funktion des Proteins ergeben. So wäre es denkbar, dass FAM161A an Transportprozessen entlang der Mikrotubulischienen des Verbindungsziliums der Photorezeptoren beteiligt ist.

Der Transport von Ladung entlang der Mikrotubulistrukturen im Photorezeptorzilium über das Axonem bis hin zur Ziliusspitze und zurück wird durch den Mechanismus des intraflagellaren Transports (IFT) bewerkstelligt (Rosenbaum et al. 1999). Der IFT-Prozess ist essentiell für die Ausbildung, die Aufrechterhaltung und die Funktion von beweglichen und nicht beweglichen primären Zilien (Rosenbaum & Witman 2002). IFT-Transportprozesse von Komponenten der Phototransduktion durch das Verbindungszilium der Photorezeptoren sind unabdingbar für die Ausbildung und Aufrechterhaltung der Außensegmente der Photorezeptoren (Insinna & Besharse 2008). Während des IFT-basierten ziliären Transports werden Partikel konstant entlang der axonemalen Mikrotubuliduplettstrukturen unterhalb der Membran des Ziliums entlang geschoben (Rosenbaum & Witman 2002). Dadurch werden Moleküle, die zum Aufbau und Erhalt des Ziliums benötigt werden in Richtung Ziliusspitze geliefert (Rosenbaum & Witman 2002). An der Spitze ändert sich die Transportrichtung, woraufhin die IFT-Moleküle zurück zur Basis des Ziliums transportiert werden (Rosenbaum & Witman 2002). Die IFT-Transportpartikel werden in die IFT-Komplexe der Kategorie A (IFT 144, 140, 139, 122, 121, 43) und B (IFT 172, 88, 81, 80, 74/72, 70, 57, 54, 52, 46, 27, 25, 22, 20) zusammengefasst (Ishikawa & Marshall 2011). Eine systematische Lokalisierungsstudie der verschiedenen Komponenten der IFT-Komplexe konnte eine unterschiedliche Präsenz der Proteine in sub-ziliären, sowie in nicht-ziliären Kompartimenten der Photorezeptoren verdeutlichen (Sedmak & Wolfrum 2010). Darüber hinaus wurden IFT-Proteine auch in den dendritischen Enden von nicht-zilierten Neuronen gefunden, was auf eine generelle Beteiligung im intrazellulären Vesikeltransport in Eukaryoten hindeutet (Sedmak & Wolfrum 2010). Die Verteilung der IFT-Proteine erinnert teilweise an die Lokalisierung von FAM161A in Photorezeptoren und anderen Neuronen der Retina (Zach et al. 2012). Dies könnte auf einen funktionellen Zusammenhang von FAM161A mit IFT-Komponenten hindeuten. Erste Interaktionsstudien mit IFT20 in der vorliegenden Arbeit ergaben jedoch keine physikalische Assoziation mit FAM161A. Die Bindungsstudien von Di Gioia und Mitarbeitern konnten ebenfalls keine Interaktionen von FAM161A mit den IFT-Komponenten 27, 43, 52, 57, 74, 81 und 140 nachweisen (Di Gioia et al. 2012). Lediglich zwischen FAM161A und IFT20 bzw.

IFT88 konnten schwache bis mittlere Interaktionssignale identifiziert werden (Di Gioia et al. 2012). Zusammenfassend ergibt sich somit zwar eine ähnliche Lokalisierung von FAM161A (Zach et al. 2012) und IFT-Komponenten (Sedmak & Wolfrum 2010), es konnte bisher jedoch keine spezifische Interaktion nachgewiesen werden.

Neben den IFT-Proteinen spielen Motorproteine eine wichtige Rolle in der Ausführung der IFT-Funktionen (Scholey 2008). IFTA und IFTB sind dadurch an den retrograden bzw. anterograden Transport gekoppelt (Scholey 2008). Kozminski und Mitarbeiter konnten 1995 das Protein FLA10 aus *Chlamydomonas* als Komponente des Kinesinmotors für den anterograden IFT-basierten Transport identifizieren (Kozminski et al. 1995). Hierbei handelt es sich um ein Orthologes von KIF3A, einem Bestandteil des heterotrimeren Kinesin-2. In Photorezeptoren konnten die Mitglieder der heterotrimeren Kinesin-2-Familie als essentiell für den IFT und die Ziliogenese identifiziert werden (Insinna et al. 2009). Darüber hinaus wird dem Motorprotein KIF17 eine nicht redundante Funktion in der Entstehung der Disks sowie im Aufbau der proximalen Außensegmente zugeordnet (Insinna et al. 2009, Verhey et al. 2011). Der anterograde Motor-basierte Transport von IFT-Partikeln in Richtung Minus-Ende der Mikrotubulustrukturen wird mit dem zytoplasmatischen Dyneinmotorprotein Dynein 1b (auch benannt als Dynein 2) in Verbindung gebracht (Scholey 2008). Dynein 1b ist ebenfalls am Zusammenbau des Ziliums essentiell beteiligt (Scholey 2008). Wichtige regulatorische Funktionen der Kinesin-II-Aktivität fallen einer Vielzahl an Kinasen zu. Hierzu zählen beispielsweise die MAP-Kinasen und NIMA-ähnliche Kinasen, die durch Phosphorylierung modulierend auf die Motoraktivität wirken können (Pedersen & Rosenbaum 2008). Weitere wichtige Regulationsprozesse können durch Modifikation des Zytoskelettnetzwerks auftreten. Hierbei können beispielsweise Acetylierungs- und Polyglutamylierungsmodifikationen Einfluss auf die Bindung und die Prozessivität des Motorkomplexes nehmen (Pedersen & Rosenbaum 2008). Darüber hinaus spielen BBS-Proteine eine Rolle im Zusammenhalt des Kinesin-II-Motors (Pedersen & Rosenbaum 2008). FAM161A könnte möglicherweise in diese Regulationsprozesse involviert sein. Durch Beeinflussung der Mikrotubulimodifikationen oder durch Interaktion mit Proteinen der Kinasekaskaden ergeben sich denkbare Angriffspunkte für eine funktionelle Bedeutung des neuen ziliären Proteins.

Neben der Lokalisierung im Verbindungszilium in Photorezeptoren (Zach et al. 2012) und einer dadurch möglichen Beteiligung von FAM161A an IFT-basierten Transportprozessen und deren Regulation ergeben sich durch die Lokalisierung des Proteins im Basalkörper der Photorezeptoren (Zach et al. 2012) weiterhin denkbare Funktionen in der Ausbildung des



primären Ziliums, der sogenannten Ziliogenese (Di Gioia et al. 2012). Auf molekulare Ebene sind vor allem Ziliopathie-assoziierte Proteine der MKS und JBTS Familien in der Ziliogenese involviert (Garcia-Gonzalo et al. 2011). So konnte beispielsweise das murine Protein Tctn1 als essentiell für die Ziliogenese in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen identifiziert werden (Garcia-Gonzalo et al. 2011). Tctn1 konnte weiterhin als Teil eines Ziliopathie-assoziierten Komplexes u.a. mit den Proteinen Mks1, Cep290, Cc2d2a, Tctn2, Tctn3 und B9d1 ermittelt werden (Garcia-Gonzalo et al. 2011). FAM161A wurde hier nicht als direkter Interaktionspartner von Tctn1 gefunden (Garcia-Gonzalo et al. 2011), könnte jedoch wiederum über eine indirekte Interaktion mit dem potentiellen Bindungspartner CEP290 (Di Gioia et al. 2012) an der Ziliogenese beteiligt sein. Unterstützt wird die Hypothese einer Beteiligung von FAM161A an der Ziliogenese durch die siRNA-vermittelte Herabregulierung von FAM161A, die in einer verminderten Ausbildung der primären Zilien in hTERT-RPE-1 Zellen resultierte (Di Gioia et al. 2012). Inwiefern dieses Resultat jedoch auf die Ziliogenese in Photorezeptoren übertragen werden kann, bleibt momentan noch im Dunkeln. Messungen der Ziliumlängen und -anzahlen in Photorezeptoren eines FAM161A-Knockout Tiermodells könnten hier von Nutzen sein.

An der Längenkontrolle des Ziliums sind die Meckel-Syndrom Proteine MKS1, MKS3 und Nephrocystin 4 beteiligt (Ishikawa & Marshall 2011). Die Länge der Zilien wird weiterhin durch die Proteine RP1 und MAK entscheidend beeinflusst (Omori et al. 2010). RP1 ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das im Axonembereich der Photorezeptoraußensegmente lokalisiert (Liu et al. 2004). Während RP1 die Verlängerung des Ziliums induziert, wird dieser Effekt durch MAK, womöglich durch Phosphorylierung von RP1 verhindert (Omori et al. 2010). Somit konnte MAK als unabdingbar für die Kontrolle der Länge des Ziliums und für dessen Erhaltung postuliert werden (Omori et al. 2010). Da FAM161A jedoch, wie durch die fehlende Überlappung mit RP1 in Immunlokalisierungsexperimenten gezeigt werden konnte, nicht im Außensegment der Photorezeptoren vorhanden ist (Zach et al. 2012), ist es sehr wahrscheinlich nicht an der RP1-basierten Längenkontrolle des Ziliums beteiligt.

Neben der hauptsächlichen Lokalisation im Basalkörper und dem Verbindungszilium der Photorezeptoren konnte FAM161A in geringeren Mengen im Zytoplasma und in der äußeren plexiformen Schicht gefunden werden (Zach et al. 2012). Eine Hypothese geht davon aus, dass die FAM161A Verteilung im Zytoplasma der Photorezeptorinnensegmente auf die entstehende, noch unreife Form von FAM161A zurückzuführen sei (Di Gioia et al. 2012). Die Lokalisierung von FAM161A in der äußeren plexiformen Schicht konnte, durch eine fehlende

Überlappung mit den RIBEYE-immunsensitiven Ribbonsynapsen der Photorezeptoren (tom Dieck et al. 2005), den Synapsen der Neuronen 2. Ordnung zugeordnet werden.

Der Verlust von FAM161A im Verbindungszilium und im Basalkörper der Photorezeptoren sowie in der OPL-Schicht aufgrund von Nullmutationen könnte somit zu einer Störung einer Vielzahl von möglichen Abläufen innerhalb der Retina führen. Dies könnte final zu einer fehlerhaften Lokalisierung von Transportmolekülen im Innensegment der Photorezeptoren oder zu einer gestörten synaptischen Übertragung kommen. Durch diese Prozesse könnte es möglicherweise zur RP-assoziierten retinalen Zelldegeneration und damit zur Beeinflussung der visuellen Funktion kommen. Eine Möglichkeit, diese Hypothesen zu untersuchen besteht in der Herstellung und Charakterisierung von Knockout Tiermodellen, die im vorliegenden Fall einer Verlustfunktion des FAM161A-Proteins besonders gut geeignet erscheinen würden.

## **6.2.2 Mikrotubuli-Lokalisierung und Eigenschaften von überexprimiertem FAM161A**

### **6.2.2.1 Ko-Lokalisierung von FAM161A mit $\alpha$ -, $\gamma$ - und acetyliertem $\alpha$ -Tubulin**

Zur Charakterisierung des FAM161A-Protein wurden u.a. Lokalisierungsversuche von heterolog exprimierten Proteinen in kultivierten Säugetierzelllinien durchgeführt. In der zilierten Linie LLC-PK1 wurde das rekombinante FAM161A-Protein nach Transfektion und Expression an der Basis des primären Ziliums im Bereich des Basalkörpers und der Übergangszone gefunden. Sowohl endogenes als auch heterolog exprimiertes FAM161A konnte übereinstimmend auch in ARPE19- und hTERT-RPE-1-Zellen an der Basis des primären Ziliums lokalisiert werden (Di Gioia et al. 2012). Endogenes FAM161A in LLC-PK1 konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. FAM161A spielt womöglich in dieser Zelllinie keine essentielle Rolle an der Ausbildung des primären Ziliums. Weiterhin konnte eine Ko-Lokalisierung von FAM161A mit  $\gamma$ -Tubulin im Bereich der Zentrosomen, den Organisationszentren der Mikrotubuli (MTOC), in Zellen, die noch keine Zilienstrukturen ausgebildet hatten, nachgewiesen werden. Das Protein  $\gamma$ -Tubulin ist ein zentrosomales Protein, das für die Zellzyklus-abhängige Mikrotubulikeimbildung von Bedeutung ist (Joshi et al. 1992) und auch in Basalkörpern von postmitotischen, zilierten Zellen, wie etwa den Photorezeptoren im Bereich des MTOCs zu finden ist (Muresan et al. 1993). Der Basalkörper der Photorezeptor ist bekanntermaßen als Äquivalent der Zentrosomenstruktur definiert (Moser et al. 2010). Die Lokalisierungsstudien von FAM161A, in denen eine Basalkörperlokalisierung entdeckt worden war, werden durch eine kürzlich durchgeführte proteomische Studie, bei der FAM161A als Bestandteil humaner Zentrosomen

in der Lymphoblastenzelllinie KE37 identifiziert wurde (Jakobsen et al. 2011), weiter untermauert. Neben FAM161A konnten viele bekannte Bestandteile von sensorischen Zilien, wie z.B. BBS7 und RAB8A, in der Zentrosomenfraktion der humanen Lymphoblastenzelllinie nachgewiesen werden (Jakobsen et al. 2011). Das ziliäre Protein FAM161A konnte somit sowohl im Zellkultursystem als auch in den Photorezeptoren als Zentrosomen- bzw. Basalkörperbestandteil charakterisiert werden (Di Gioia et al. 2012, Zach et al. 2012). FAM161A gliedert sich damit in eine Vielzahl von Komponenten des Basalkörpers ein, die in verschiedene Formen der Ziliopathien und in erbliche Netzhautdegenerationen involviert sind (den Hollander et al. 2006, Arts et al. 2007, Gorden et al. 2008, Chakarova et al. 2011). Mutationen im zentrosomalen Protein CEP290 und dessen Interaktionspartner CC2D2A sind mit LCA bzw. mit dem Joubert-Syndrom assoziiert (den Hollander et al. 2006, Gorden et al. 2008). Weitere Beispiele für zentrosomale Proteine, die an erblichen Netzhautdegenerationen beteiligt sind, stellen RPGRIP1L (Arts et al. 2007) und TOPORS (Chakarova et al. 2011) dar. TOPORS, ein Bindeprotein der Topoisomerase I, konnte kürzlich mit der *RP31*-assoziierten autosomal dominanten Retinitis Pigmentosa (adRP) assoziiert werden (Chakarova et al. 2011). Es lokalisiert im Basalkörper und der anliegenden Zentriole in Photorezeptoren und zeigt u.a. Interaktionen mit  $\gamma$ -Tubulin und dem potentiellen FAM161A-Interaktionsprotein p150<sup>Glued</sup> (Chakarova et al. 2011).

Die Lokalisierung von FAM161A im Basalkörper von nicht retinalen Zelltypen (Di Gioia et al. 2012, Zach et al. 2012) legt eine generelle Beteiligung in der Zentrosomenbiologie nahe. Obwohl *FAM161A* auf mRNA-Ebene hauptsächlich in Retina und Testis vorhanden ist, könnte es somit auch in weiteren zilierten Zelltypen und Organen von funktioneller Bedeutung sein. FAM161A konnte beispielsweise auch in primären Zilien von Nierenzellen gefunden werden (Di Gioia et al. 2012). Weitere Anhaltspunkte für eine globalere Funktion von FAM161A könnten die leichten Hörbeschwerden eines RP28-assoziierten Patienten liefern (Langmann et al. 2010). In den mechanosensorischen Haarzellen der Cochlea ist die Ausbildung der Aktin-basierten Stereozilienbündel abhängig von einem einzelnen, transienten Mikrotubuli-haltigem Kinozilium (Frolenkov et al. 2004). Hierdurch könnte sich die Beteiligung der *FAM161A*-assoziierten Retinitis Pigmentosa als Teil einer syndromischen Erkrankung ergeben. Ob die Expression und Funktion von *FAM161A* in weiteren humanen Geweben und Zelltypen nachgewiesen werden kann und inwiefern die *FAM161A*-Mutationen in mögliche Funktionsstörungen diverser primärer Zilien verstrickt sind, muss jedoch erst durch weiterführende und vertiefende Experimente geklärt werden.

Die Überexpression von FAM161A sowohl in der zilierten Zelllinie LLC-PK1 als auch in den Kulturen der nicht-zilierten Zellen HEK293-EBNA und COS-7 ergab eine Ko-Lokalisierung von FAM161A mit dem zytoplasmatischen Mikrotubulinetzwirk (Zach et al. 2012). Diese Beobachtungen konnte weiterhin durch Überexpression des FAM161A-Proteins in HeLa-Zellen bestätigt werden (Di Gioia et al. 2012). Aus dieser sub-zellulären Verteilung des Proteins konnte, in Verbindung mit den Resultaten der direkten Bindungsstudie von FAM161A und Mikrotubuli, auf eine unmittelbare physikalische Interaktionsfähigkeit der FAM161A-Moleküle an zytoplasmatische Mikrotubuli geschlossen werden. Durch die Mikrotubuli-basierte Umverteilung des FAM161A-Proteins während der Mitose wurde diese Präferenz für Mikrotubulistrukturen weiter verdeutlicht (Daten in Zach et al. 2012). Inwiefern dieses Verhalten des Proteins eine *in vivo* Funktion im Bereich des zytoplasmatischen Mikrotubulinetzwirks in zilierten und nicht-zilierten Zellen erfüllt, muss durch weiterführende Experimente geklärt werden. Hypothesen gehen davon aus, dass FAM161A durch die Bindung an die Mikrotubuli das Potential besitzt, weitere Mikrotubuli-assoziierte Proteine an das Netzwerk zu rekrutieren, was indirekt zu einer Bündelung der Mikrotubuli führen könnte (Di Gioia et al. 2012). FAM161A wäre demnach nicht direkt an der Stabilisierung der Mikrotubuli beteiligt, sondern auf die Integrität des Netzwerks angewiesen. Durch Depolymerisierungsversuche mit 10  $\mu$ M Nocodazol konnte dies nachgewiesen werden (Di Gioia et al. 2012). Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Depolymerisierungsexperimente mit 10  $\mu$ M Nocodazol in COS-7-Zellen durchgeführt, die in Einklang mit den Ergebnissen von Di Gioia und Mitarbeitern zu einer Zerstörung des Mikrotubulinetzwirks und zu einer Umverteilung von FAM161A ins Zytoplasma von COS-7-Zellen führten. Eine mildere Behandlung der Zellen mit 2,5  $\mu$ M Nocodazol zeigte jedoch eine eindeutig stabilisierende Wirkung von FAM161A auf das Mikrotubulinetzwirk von FAM161A-transfizierten Zellen. Ob der stabilisierende Effekt von FAM161A und die Lokalisierung an das Mikrotubulinetzwirk im Zytoplasma *in vivo* von Bedeutung sind, bleibt offen. Alternativ zu einer funktionellen Bedeutung die sich aus der FAM161A-Assoziation mit zytoplasmatischen Mikrotubulistrukturen ergeben könnten, sind auch Szenarien bekannt, die es zentrosomalen Proteinen erlauben, vor allem nach Überexpression auch in nicht-zilierten Zellen an zytoplasmatische Mikrotubuli zu binden, obwohl keine zusätzlichen Funktionen dieser Proteine im Bezug auf des Mikrotubulinetzwirk *in vivo* gefunden wurden. Lebercilin, das Genprodukt von *LCA5* und potentieller Interaktionspartner von FAM161A (Di Gioia et al. 2012), zeigt beispielsweise eine FAM161A-ähnliche Lokalisation im Bereich des Basalkörpers und des Verbindungsziliums der Photorezeptoren (den Hollander et al. 2007). Weiterhin bindet überexprimiertes Lebercilin an zytoplasmatische Mikrotubuli, Zentriolen und

primären Zilien in Säugetierzellkulturen und führt zu einer gestörten Mikrotubulidynamik durch Bündelung der Mikrotubulifasern (den Hollander et al. 2007). Diese Bündelung, die beispielsweise auch nach Überexpression des zentrosomalen Proteins CEP170 und der Dyneinuntereinheit p150<sup>Glued</sup> zu beobachten ist (Quintyne et al. 1999, Guarguaglini et al. 2005), ähnelt den Mikrotubulistrukturen, die durch Überexpression von FAM161A in COS-7-Zellen in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurden. Die gebündelten Mikrotubulistrukturen als Resultat der FAM161A-Expression legen somit einen Einfluss von FAM161A auf die Mikrotubulidynamik nahe.

Die Ergebnisse der Lokalisierungsexperimente von überexprimierten FAM161A in kultivierten Zellen, in denen FAM161A gebunden an Zentrosomenstrukturen und zytoplasmatische Mikrotubuli gefunden werden konnte, unterstützen die Lokalisierung von FAM161A im Basalkörper bzw. der anliegenden Zentriole sowie im Verbindungszilium, den entsprechenden Mikrotubulistrukturen der Photorezeptoren (Zach et al. 2012). In FAM161A-transfizierten Zellen, sowie im Verbindungszilium der Photorezeptoren konnte FAM161A weiterhin teilweise überlappend mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin detektiert werden (Zach et al. 2012). Da acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin in stabilisierten Mikrotubulistrukturen wie dem Basalkörper bzw. des Verbindungsziliums auftritt (Arikawa & Williams 1993), wäre eine Beteiligung von FAM161A am Mechanismus der Stabilisierung des Mikrotubulinetzwerks im Zytoplasma von kultivierten Zellen oder im Bereich des Verbindungsziliums der Photorezeptoren denkbar.

#### **6.2.2.2 Physikalische Interaktion von FAM161A mit Mikrotubuli**

Im Zuge der vorliegenden Dissertation konnte FAM161A eine direkte physikalische Bindung an polymerisierte Mikrotubuli und damit ein wichtiges Merkmal von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAPs) zugeordnet werden (Dehmelt & Halpain 2004). Der Mikrotubulibindungsereich des FAM161A-Moleküls konnte auf die Aminosäuren 230-543 der UPF0564-Domäne eingeschränkt werden. Weitere Hinweise auf eine funktionelle Relevanz der Mikrotubuli-bindenden Eigenschaft von FAM161A *in vivo* wurden durch die enge Assoziation von FAM161A mit zytoplasmatischen Mikrotubuli in transfizierten Säugetierzelllinien und mit den Mikrotubuliduplettstrukturen des Verbindungsziliums in Photorezeptoren erhalten (Zach et al. 2012).

In eukaryotischen Zellen entwickelten sich verschiedene Typen von MAPs, darunter Mikrotubulimotoren (Kinesine, Dyneine), zentrosomale Proteine ( $\gamma$ -TuRC), Mikrotubuli-stabilisierende Protein, Bindeproteine der Plus-Enden der Mikrotubuli und strukturelle MAPs

(Dehmelt & Halpain 2004). Die hauptsächlich vorhandenen (strukturellen) MAP-Spezies in neuronalen Geweben stellen die Proteine MAP1A, MAP1B und MAP2, allesamt Proteine mit hochmolekularer Masse, sowie das mit Alzheimer assoziierte Protein tau dar (Takemura et al. 1992). Diese Proteine sind in der Lage an Mikrotubuli zu binden und diese mit Hilfe mehrerer Mikrotubulibindedomänen untereinander zu vernetzen und zu bündeln (Dehmelt & Halpain 2004). Der Mikrotubulibindebereich der MAP2/tau-Familie, zu der neben den neuronalen Proteinen MAP2 und tau das nicht ubiquitär in neuronalen Zellen exprimierte MAP4 gezählt wird, besteht aus mehreren Wiederholungen eines Mikrotubulibindungsmotivs, jeweils mit der konservierten und phosphorylierbaren Aminosäureabfolge KXGS, am C-terminalen Ende der Proteine (Lewis et al. 1988, Dehmelt & Halpain 2004). MAP4 ist in einer Vielzahl von Geweben exprimiert und wurde mit der Regulation der Mikrotubulidynamik während der Zellteilung in Verbindung gebracht (Kremer et al. 2005). FAM161A und die Proteine der MAP/tau-Familie zeigen keine signifikanten Aminosäuresequenzhomologien im Bereich der Mikrotubulibindedomäne, wodurch FAM161A strukturell nicht zu dieser Proteinfamilie gerechnet werden kann. Die diversen bekannten Mikrotubulibindeproteine verbindet jedoch nicht zwangsläufig eine homologe Aminosäuresequenz oder strukturelle Ähnlichkeit (Chu et al. 2010). Dagegen besitzt eine Vielzahl von Mikrotubulibindeproteinen sogenannte intrinsisch ungeordnete Domänen („intrinsically disordered domain“, IDD), die nativ ungefaltet vorliegen, distinkte Interaktionen mit unterschiedlichen Partnern bilden und dadurch variable zelluläre Funktionen ausführen können (Chu et al. 2010). Beispiele hierfür liefern neben MAP2/tau (Dehmelt & Halpain 2004) die Proteine RP1 (Kim et al. 2003), TPPP/p25 (Ovádi & Orosz 2009),  $\alpha$ -Synuclein (Wersinger & Sidhu 2005) oder die  $\gamma$ -Untereinheit der Phosphodiesterase PDE6 (Chu et al. 2010). Das retinale Protein PDE $\gamma$  beispielsweise ist durch Inhibierung der PDE6 kritisch für die Regulation der Phototransduktion in der Retina von Wirbeltieren (Guo & Ruohu 2008). Die PDE $\gamma$ -Untereinheit spielt weiterhin verschiedene Rollen in Signalwegen, die nicht photorezeptorspezifisch sind und besitzt daher eine Vielzahl zusätzlicher Interaktionspartner (Guo & Ruohu 2008). Hypothesen bringen diese Fähigkeit mit der IDD von PDE $\gamma$  in Zusammenhang. IDDs sind durch eine auffällige Sequenzsignatur mit einem hohen Anteil an den polaren und geladenen Aminosäuren Gln (Q), Ser (S), Pro (P), Glu (E), Arg (R) und Lys (K) gekennzeichnet und können durch die somit erlangte strukturelle Anpassungsfähigkeit verschiedenste Proteininteraktionen ausbilden (Dyson & Wright 2005, Guo & Ruohu 2008). Die Aminosäuren 230-543 der UPF0564-Domäne von FAM161A, die für die Bindung an Mikrotubuli von Nöten sind, enthalten einen außergewöhnlich hohen Anteil der Aminosäuren K (13,4%), E (11,1%), R (9,9%) und P (8,9%), was zu einem sehr hohen isoelektrischen Punkt (pI) von 9,76 in diesem Bereich führt. Hierdurch könnte sich

womöglich eine Ähnlichkeit zu den bekannten IDDs ergeben, aus der sich die Bindung von FAM161A an Mikrotubuli, sowie an eine Vielzahl unterschiedlicher Interaktionspartner, darunter weitere FAM161A-Moleküle, FAM161B und diverse potentielle Kandidatenproteine des Hefe-2-Hybrid Experiments (Di Gioia et al. 2012, 6.2.4) erklären ließe. Experimente zur Ermittlung der Proteinstruktur und eine vertiefte bioinformatische Charakterisierung des FAM161A-Proteins könnten hierzu weitere Anhaltspunkte liefern.

Neben der Bindung an Mikrotubuli werden strukturelle MAPs durch die Förderung der Tubulinpolymerisationsrate und -ausbeute gekennzeichnet (Cassimeris & Spittle 2001). Beispiele hierfür sind die Proteine MAP2 und tau (Sandoval & Vandekerckhove 1981, Ainsztein & Purich 1994), sowie CEP57 (Momotani et al. 2008) oder das retinale Protein RP1 (Liu et al. 2004). MAP2 fördert dabei eine höhere Rate sowie Ausbeute an Mikrotubulipolymerisierung als tau (Sandoval & Vandekerckhove 1981). Die Phosphorylierung von MAP2 durch Proteinkinasen (A und C) inhibiert die Bindung an Mikrotubuli sowie die Ausbildung einer erhöhten Tubulinpolymerisationsrate (Ainsztein & Purich 1994). Hierdurch ergeben sich Regulationsmöglichkeiten für die MAPs. Durch die Bindung und Bündelung der Mikrotubuli mit Hilfe der Ausbildung von Querverbindungen, z.B. durch die Proteine MAP2 und CEP57, erhöht sich die Tubulinpolymerisationsrate und die Stabilität der gebildeten Mikrotubulistrukturen gegenüber Behandlung mit Nocodazol (Takemura et al. 1992, Momotani et al. 2008). Die Beeinflussung des Aufbauprozesses der Mikrotubuli durch FAM161A *in vitro* wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines Tubulinpolymerisationsassay und dem GST-FAM161A-Proteinfragment mit den Aminosäuren 230-543 (UPF0564) getestet. Hierbei ergab sich kein direkter Effekt der UPF0564-Domäne auf den Verlauf der Tubulinpolymerisation. FAM161A könnte somit *in vivo* primär eher an der Mikrotubulistabilisierung als an der Beeinflussung des Aufbaus der Mikrotubulistrukturen beteiligt sein. Weiterhin wäre auch denkbar, dass das Fusionsprotein mit den Aminosäuren 230-543 des FAM161A-Proteins nicht ausreichend für eine Beeinflussung der Polymerisationsprozesse war. Inwiefern die N-, sowie C-terminalen FAM161A-Proteinbereiche an der Regulation oder Ausbildung einer veränderten Tubulinpolymerisierung beteiligt sein könnten, wurde noch nicht geklärt. Die bekannten MAPs besitzen, wie bereits erwähnt, in der Mehrzahl diverse Mikrotubulibindebereiche und können somit durch Quervernetzung einzelner Mikrotubulistränge zu einer Erhöhung der Polymerisationsrate führen. Mit Hilfe einer detaillierteren Charakterisierung der Mikrotubulibindedomäne innerhalb der FAM161A-Aminosäuren 230-543 könnte es gelingen, die Anzahl der möglichen Mikrotubulibindestellen zu bestimmen. Eine Erklärung für die

fehlende Tubulinpolymerisationsfähigkeit könnte sich demnach für den Fall ergeben, dass nur eine einzelne Mikrotubulibindedomäne im FAM161A-Molekül lokalisiert werden könnte.

Mikrotubulibindeproteine können in verschiedenen retinalen Zelltypen bzw. in Photorezeptoren lokalisiert werden und sind somit von funktioneller Bedeutung in der Retina (Okabe et al. 1989). Die Mikrotubuli-assoziierten Proteine MAP1A und MAP2 z.B. konnten in retinalen Schnitten von Rattenaugen in der inneren plexiformen Schicht sowie in der Ganglienzellschicht detektiert werden (Okabe et al. 1989). Anti-MAP2-Antikörper zeigten weiterhin immunsensitive Signale im Bereich der Innensegmente sowie schwächere Signale im Verbindungszilium der Photorezeptoren (Okabe et al. 1989, Chakarova et al. 2011). Das retinale Protein RP1, assoziiert mit Retinitis Pigmentosa, ist ein weiteres Beispiel für MAPs im Bereich des Photorezeptors (Liu et al. 2004). RP1 ko-lokalisiert im Bereich des Außensegments der Photorezeptoren mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin, dem Markerprotein für stabilisierte axonemale Mikrotubuli (Liu et al. 2004). Die RP1-Lokalisierung (Liu et al. 2004) zeigt keine Überlappungen mit FAM161A, das im Bereich des Verbindungsziliums proximal zu RP1 zu finden ist (Zach et al. 2012). Neben der direkten Mikrotubulibindung mit Hilfe einer Doublecortin-ähnlichen Domäne (DCX), die im humanen MAP Doublecortin zu finden ist, konnte dem RP1-Protein weiterhin eine Mikrotubuli-stabilisierende Wirkung und ein positiver Effekt auf die Tubulinpolymerisation zugeschrieben werden (Liu et al. 2004). RP1 ist ebenfalls an der Längen- und Stabilitätskontrolle des Photorezeptoraxonems im Bereich der Photorezeptoraußensegmente beteiligt (Liu et al. 2004). FAM161A könnte aufgrund RP-ähnlicher Eigenschaften, z.B. durch die Bindung an Mikrotubulistrukturen und durch die Möglichkeit von homo- und heterotypischen Proteininteraktionen ähnliche Gerüstfunktionen, anders als RP1 jedoch im Bereich des Verbindungsziliums, ausbilden. FAM161A könnte ebenfalls vergleichbare Funktionen in der Stabilisierung der Mikrotubuli im Bereich des Verbindungsziliums übernehmen. Möglicherweise ergeben sich die Unterschiede in der Lokalisierung der Proteine in den Photorezeptoren aufgrund unterschiedlicher Mikrotubulibindedomänen und somit aufgrund der verschiedenen Bindungseigenschaften an die speziellen Mikrotubulistrukturen von Verbindungszilium und distalem Axonem.

Durch die direkte physikalische Interaktion von FAM161A mit Mikrotubuli könnten sich möglicherweise Hinweise auf Teilaspekte des Pathomechanismus der RP28-assoziierten Retinitis Pigmentosa ergeben. Potentielle FAM161A-Funktionen in der Bindung und Stabilisierung von Mikrotubulistrukturen, etwa im Bereich des Verbindungsziliums der Photorezeptoren könnten somit verhindert werden. Die fehlende Stabilisierung der Kinesin



und Dyneinschienen könnte möglicherweise den IFT zwischen Außen- und Innensegmenten stören und somit in letzter Konsequenz zum Zelltod der Photorezeptoren führen.

Aufgrund der Homologien im Bereich der UPF0564-Domäne der FAM161-Proteine könnte FAM161B sehr wahrscheinlich ebenfalls ein Mikrotubuli-bindendes Protein darstellen. Überexprimiertes FAM161B ist weiterhin an die Mikrotubulistrukturen in primären Zellkulturen lokalisiert. Inwiefern diese Assoziation an Mikrotubuli auf eine direkte physikalische Interaktion zurückzuführen ist, müsste durch *in vitro* Bindungsversuche geklärt werden. Die Expression von *FAM161B* in retinalem Gewebe könnte auf eine funktionelle Bedeutung des Proteins in der Netzhaut hinweisen. Denkbar wäre eine redundante Funktion der FAM161-Proteine. Alternativ könnte sich ebenfalls eine Funktion von FAM161A und FAM161B zu verschiedenen Zeitpunkten der retinalen Entwicklung bzw. an unterschiedlichen Orten der adulten Netzhaut ergeben. Um dies zu klären, könnten Lokalisierungsversuche von FAM161B in den retinalen Schnitten, sowie Expressionsstudien des *FAM161B*-Gens, beispielsweise im Verlauf der murinen Embryonalentwicklung, durchgeführt werden.

#### **6.2.2.3 FAM161A-vermittelte Erhöhung des Mikrotubuliacetylierungslevels**

Als Konsequenz der FAM161A-Überexpression in HEK293-EBNA- und COS-7-Zellen hatte sich eine statistisch signifikante Erhöhung des Acetylierungslevels der Mikrotubuli gezeigt (Zach et al. 2012). Aus den FAM161A-induzierten Modifikationen des Mikrotubulinetzwerks könnten sich möglicherweise Effekte auf verschiedene, Mikrotubuli-basierte Mechanismen ergeben. Zur kontrollierbaren Regulation ihrer Eigenschaften und Funktionen unterliegen die Mikrotubulstrukturen mehreren posttranslationalen Modifikationen wie z.B. Acetylierung, Polyglutamylierung oder Polyglycylierung (Janke & Bulinski 2012).

Die posttranslationale Modifikation von  $\alpha$ -Tubulin mit Acetylgruppen kann trotz der Lokalisierung im Inneren der Mikrotubulipolymere, möglicherweise durch Induzierung von Veränderungen in der Konformation der  $\alpha/\beta$ -Tubulindimere, vielfältige biochemische und zelluläre Funktion beeinflussen (Janke & Bulinski 2012). Die Mikrotubuliacetylierung konnte generell mit stabilisierten Mikrotubulstrukturen in Verbindung gebracht werden (Takemura et al. 1992). Acetylierte Mikrotubulifasern treten parallel mit einer erhöhten Stabilität gegenüber der Behandlung mit Mikrotubuli-destabilisierenden Reagenzien, wie z.B. Nododazol, auf (Takemura et al. 1992). Als weiterer Effekt konnte der posttranslationalen Acetylierung eine Beeinflussung der Bindungsfähigkeit der molekularen Motoren KIF5 und Dynein an das Mikrotubulinetzwerk zugeordnet werden (Reed et al. 2006, Dompierre et al. 2007). Die

Eliminierung der Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin führte hierbei u.a. zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit des Kinesinmotors und somit zu einer Reduzierung des Kinesin-basierten Transports in *Tetrahymena* (Reed et al. 2006). Die Acetylierung von Mikrotubuli konnte somit mit einer erhöhten Geschwindigkeit des anterograden Transports durch Kinesinmotoren in Verbindung gebracht werden (Reed et al. 2006, Bulinski 2007). Speziell in axonemalen Mikrotubulistrukturen (L'Hernault & Rosenbaum 1983, Piperno & Fuller 1985), sowie in Zentriolen bzw. Basalkörpern (Piperno et al. 1987) ist die Tubulinacetylierung sehr stark erhöht. Ein bedeutendes Merkmal der axonemalen Mikrotubuli des Verbindungsziliums, sowie des Basalkörpers in Photorezeptoren und vergleichbaren primären Zilien ist die vergleichsweise hohe Stabilität (Arikawa & Williams 1993). Diese ist notwendig für die Ausbildung der stabilen Gleise, auf denen sich der intraflagellare Transport abspielt (Janke & Bulinski 2012). Durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ergaben sich Hinweise auf einen Einfluss von FAM161A auf die posttranslationale Acetylierung von Mikrotubuli. Inwiefern mögliche Effekte von FAM161A auf die Mikrotubuliacetylierung durch die Lokalisierung im Bereich des Verbindungsziliums der Photorezeptoren (Zach et al. 2012) zum Tragen kommen, muss durch weiterführende Experimente untersucht werden. Das Zusammenspiel der Acetylierung und Deacetylierung von Mikrotubuli hat ebenfalls Konsequenzen auf die Ausbildung und Verlängerung axonemaler Mikrotubuli der Zilien (Loktev et al. 2008). Eine verringerte Acetylierung der Mikrotubuli konnte mit einem verlangsamtem Zusammenbau von primären Zilien assoziiert werden (Shida et al. 2010). FAM161A besitzt einen Einfluss auf die Ausbildung des primären Ziliums in hTERT-RPE-1-Zellen (Di Gioia et al. 2012), der sich womöglich durch die Beeinflussung der Mikrotubuliacetylierung ergeben könnte.

Der Acetylierung der Mikrotubuli erfolgt primär an  $\alpha$ -Tubulinuntereinheiten der Position Lys40 und wird durch die korrespondierende Aktivität bestimmter Acetyltransferasen- und deacetylase reguliert (Janke & Bulinski 2012). Deacetylaseaktivität gegenüber  $\alpha$ -Tubulin und anderen zytoplasmatischen Substraten konnten den beiden Histondeacetylasehomologen HDAC6 und Sirtuin 2 zugeordnet werden (Matsuyama et al. 2002, Hubbert et al. 2002, North et al. 2003). Die Acetylierung der Aminosäure Lys40 wird mit dem Enzym  $\alpha$ -TAT1 ( $\alpha$ -Tubulin Acetyltransferase, MEC-17 in *C. elegans*) in Verbindung gebracht (Shida et al. 2010, Akella et al. 2010). Mehrere weitere Acetyltransferasen, darunter ARD1-NAT1 („arrest-defective 1-amino-terminal,  $\alpha$ -amino, acetyltransferase 1“), ELP („elongator protein complex“) und GCN5 („general control of amino acid synthesis 5“) konnten mit der Beeinflussung der Acetylierung von Lys40 korreliert werden (Janke & Bulinski 2012).

Zur Ausbildung einer Beeinflussung der posttranslationalen Mikrotubuliacylierung durch FAM161A sind grundsätzlich mehrere mögliche Szenarien denkbar. Als Folge der Bindung von FAM161A an Mikrotubuli könnte es zur Inhibierung der Deacetylierungsenzyme, allen voran der Histondeacetylase 6 (HDAC6) kommen. Hierbei handelt es sich um ein Protein der HDAC-Familie mit Deacetylaseaktivität, das sich aufgrund seiner zytoplasmatischen Lokalisation von den namensgebenden kernlokalisierten Histondeacetylaseen unterscheidet (Hubbert et al. 2002). Der HDAC6 konnte eine Assoziation mit Mikrotubuli, eine Ko-Lokalisation mit p150<sup>glued</sup> (DCTN1), einer Komponente des Dynein-Dynaktin Motorkomplexes, sowie eine Deacetylaseaktivität gegenüber polymerisierten Mikrotubuli nachgewiesen werden (Hubbert et al. 2002). Darüber hinaus konnte den Proteinen Dysferlin, TPPP/p25 und tau eine direkte physikalische Interaktion mit HDAC6 und eine Verminderung der HDAC6-Enzymaktivität nachgewiesen werden, wodurch es zu einer erhöhten Acetylierung von Mikrotubuli kam (Takemura et al. 1992, Tokési et al. 2010, Di Fulvio et al. 2011, Ding 2008 et al., Perez et al. 2009). Ein weiterer direkter Interaktionspartner der HDAC6 ist die BBIP10-Untereinheit des BBsoms, der eine Mikrotubulibindefähigkeit und eine daraus folgende Erhöhung des Acetylierungsstatus nachgewiesen werden konnte (Loktev et al. 2008). Es sind somit verschiedene Proteine bekannt, die durch direkte HDAC6-Bindung eine Veränderung der Mikrotubuliacylierung bewirken können. FAM161A konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch keine direkte Interaktion mit dem Enzym HDAC6 nachweisen werden. Es könnte sich zum einen um eine relativ schwache Interaktion handeln, die mit den verwendeten Parametern nicht nachzuweisen war. Alternativ könnte FAM161A die Beeinflussung der HDAC6-Aktivität *in vivo* indirekt über andere Interaktionspartner ausbilden. Trotz des fehlenden Nachweises einer direkten Interaktion könnten Versuche zur Klärung einer direkten Beeinflussung der HDAC6-Enzymaktivität durch FAM161A durchgeführt werden.

Die FAM161A-abhängige Regulation des Acetylierungsstatus könnte möglicherweise alternativ auch durch eine Beeinflussung der Enzymaktivität der Acetyltransferase  $\alpha$ TAT-1 ausgebildet werden. Denkbar wäre hier beispielsweise eine Funktion in der Rekrutierung des Enzyms an die Mikrotubulistrukturen oder eine Verstärkung der Acetylierungsaktivität von  $\alpha$ TAT-1. Ein möglicher Einfluss von FAM161A auf die Aktivität von Acetyltransferasen könnte analog zur HDAC6 durch *in vitro* Acetylierungsexperimente ermittelt werden.

Neben einer Inhibierung der Deacetylaseen oder einer Verstärkung der Acetylaseen könnte FAM161A theoretisch eine intrinsische Enzymaktivität zur Acetylierung von Mikrotubuli

besitzen. Da FAM161A jedoch soweit bekannt keine Sequenzhomologien zu den bereits identifizierten Acetyltransferasen aufweist, erscheint diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich. Um diese Theorie auszuschließen, könnten jedoch *in vitro* Enzymaktivitätsexperimente durchgeführt werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Beeinflussung des Acetylierungslevels der Mikrotubuli durch FAM161A könnte bereits durch die direkte Interaktion beider Proteine erklärt werden. Ähnlich den Proteinen MAP1B, MAP2 und tau (Takemura et al. 1992), könnte FAM161A allein durch die Bindung an Mikrotubuli zu einer Stabilisierung und gleichzeitigen Acetylierung führen. Weiterhin sind Szenarien bekannt, in denen Mikrotubulinbindende Proteine durch ihre Interaktionspartner phosphoryliert werden und somit die Mikrotubulistabilität und -acetylierung beeinflussen. Das retinale Protein RP1 wird beispielsweise mit Hilfe der Phosphorylierung durch Pak inaktiviert, wodurch die Länge des Ziliums reguliert werden kann (Omori et al. 2010). RP1- und FAM161A-transfizierte Zellen zeigen gleichermaßen eine Erhöhung des Acetylierungslevels und eine erhöhte Resistenz der Mikrotubuli gegenüber destabilisierenden Reagenzien (Liu et al. 2004, vorliegende Arbeit). FAM161A könnte durch seine Mikrotubulinbindung möglicherweise weitere Mikrotubuli-assoziierte Proteine an das Netzwerk rekrutieren und deren Einfluss auf den Acetylierungsgrad der Mikrotubuli steuern oder beeinflussen.

Mikrotubulistrukturen unterliegen, wie zuvor bereits angedeutet, neben der Acetylierung weiteren posttranslationalen Modifikation, wie etwa der Polyglutamylierung oder der Detyronisation, die deren Eigenschaften entscheidend modulieren (Janke & Bulinski 2012). Die Detyronisation beispielsweise steht in Verbindung mit langlebigen Mikrotubulistrukturen (Janke & Bulinski 2012). Detyronisierte Mikrotubuli sind in Zentriolen, Basalkörpern, axonemalen Mikrotubuli und Zilien angereichert und können die Bindung von molekularen Motoren an die Mikrotubulischienen regulieren (Janke & Bulinski 2012). Die Polyglutamylierung, die ebenfalls in Zilien und Basalkörpern zu finden ist, wird für den Aufbau von Zilien und möglicherweise für die Regulation des intraflagellaren Transports benötigt (Janke & Bulinski 2012). Da die Polyglutamylierungs- und Detyronisationsprozesse oftmals gemeinsam mit der Acetylierung auftreten (Janke & Bulinski 2012), könnte sich die FAM161A-Überexpression in kultivierten Zellen oder die Lokalisierung des Proteins *in vivo* möglicherweise ebenfalls auf diese Arten der Mikrotubulimodifikation auswirken. Eine Untersuchung der Veränderungen dieser Mikrotubulisignaturen, z.B. durch ICC-Experimente in FAM161A-transfizierten Zellkulturen, könnte hierzu Anhaltspunkte liefern.

### 6.2.3 UPF0564-vermittelte Interaktionen der FAM161-Proteine

Die bisher durchgeführten Experimente zur Ermittlung direkter physikalischer FAM161A-Interaktionspartner ergaben eine Vielzahl verschiedenster Protein-Protein-Wechselwirkungen, die allesamt durch den C-terminalen Proteinanteil, inklusive der UPF0564 Domäne, vermittelt werden. Neben der direkten Bindung an Mikrotubuli konnte der UPF0564-Domäne eine homotypische sowie eine heterotypischen Interaktion mit dem Orthologen FAM161B zugeordnet werden. Der Bindungsbereich wurde weiterhin auf die Aminosäuren 280-413 im 1. Teil der UPF0564-Domäne, mit den für die Bindung besonders kritischen Resten P288, F327 und P361, eingeschränkt. Verschiedene Hefe-2-Hybrid Ansätze ergaben darüber hinaus potentielle Interaktionen mit diversen Mikrotubuli- (KIF3A, KIF21B, KIF1A, DCTN1, MAPK8IP3) bzw. Ziliopathie-assoziierten (lebercin, CEP290, OFD1, SDCCAG8) Proteinen, die allesamt ohne den N-terminalen Bereich des Proteins ausgebildet werden konnten (Di Gioia et al. 2012, vorliegende Arbeit). Diese Ergebnisse legen demnach eine mögliche Beteiligung des FAM161A-Proteins an vielen verschiedenen zellulären Prozessen nahe. Weiterhin stellt sich die Frage, ob diese große Anzahl an unterschiedlichen Interaktionen *in vivo* zur selben Zeit ausgebildet werden können und wie sich die Proteinwechselwirkungen in der zellulären Umgebung steuern und kontrollieren lassen. Als Beispiel wäre hier das Wechselspiel zwischen der homotypischen FAM161A-Interaktion und der Bindung an das Mikrotubulinetzwerk zu nennen. Ob beide Wechselwirkungen gleichzeitig ablaufen können, oder die homotypischen Interaktionen nach Bindung an die Mikrotubuli aufgelöst werden, könnte von funktioneller Bedeutung sein. Zur Klärung dieser Fragestellungen und damit zur noch detaillierteren Ermittlung von Anhaltspunkten des FAM161A-assoziierten RP-Pathomechanismus sind weiterführende Interaktionsexperimente von Nöten. Einen zweiten noch offenen experimentellen Ansatz stellt eine mögliche homotypische Wechselwirkung von FAM161B dar. Aufgrund der Homologien zu FAM161A und dessen UPF0564-vermittelten Eigenschaften ist eine Interaktionen zwischen verschiedenen FAM161B-Molekülen als sehr wahrscheinlich einzustufen und könnte durch direkte Interaktionsassays untersucht werden.

### 6.2.4 Heterotypische Interaktionen von FAM161A mit Y2H-Kandidaten

Der Y2H-Screen und die sich anschließenden bisher durchgeführten Validierungsversuche ergaben die fünf Kandidatenproteine KIF3A, KIF1A, KIF21B, DCTN1 und MAPK8IP3 als mögliche direkte FAM161A-Interaktionspartner. Die Ergebnisse der GST-Pulldown- und IP-basierten Bindungsexperimente waren jedoch zum Teil nicht eindeutig. Verbesserungen könnten hier durch die Klonierung eines FAM161A-Fusionsproteins voller Länge, das bisher

nicht erfolgreich aufgereinigt werden konnte, erreicht werden. Eine weitere denkbare Möglichkeit wäre die Herstellung von Fusionsproteinen mit C-terminalem Tag (Di Gioia et al. 2012), da ein N-terminaler GST-Tag möglicherweise zu einer Destabilisierung des Proteins oder zu einer Maskierung des FAM161A-Interaktionsbereich geführt haben könnte. Mit einem FAM161A-Protein, das den kodierenden Bereich aller Exone umfasst, könnten ergänzende IP- oder Pulldown-Experimente durchgeführt werden. Zusätzliche Protein-Interaktionsstudien mit endogen exprimierten Proteinen, z.B. aus murinen Retinalysaten, könnten die bisher erzielten Ergebnisse verbessern und möglicherweise eindeutigere Resultate erzielen. Ein weiterer denkbarer Ansatz wäre die Etablierung von Reaktionsbedingungen, die eine Interaktion von GST-FAM161A-Fusionsproteinen mit den bekannten FAM161A-Interaktionspartnern, z.B. den Proteinen lebercilin (*LCA5*) oder CEP290 (Di Gioia et al. 2012), nachweisen können. Die Ziliopathie-assoziierten Proteine Lebercilin (*LCA5*) und CEP290 waren zusammen mit OFD1 und SDCCAG8 in einer parallel zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Studie mit einer FAM161A-Interaktion in Verbindung gebracht worden (Di Gioia et al. 2012). Beide Experimente zeigten somit keine Überlappungen in den ermittelten Kandidatenproteine (Di Gioia et al. 2012, vorliegende Arbeit). Dies könnte zum Teil durch die verschiedene Herangehensweise mit unterschiedlichen Köderbibliotheken erklärt werden. Bei den Studien von Di Gioia und Mitarbeitern handelte es sich um einen gezielteren Ansatz, da mögliche Beuteproteine in einer Vorauswahl aus bekannten Ziliopathie-assoziierten Proteinen bestimmt worden waren (Di Gioia et al. 2012). Somit wäre es nicht möglich gewesen, die Proteine KIF3A, KIF1A, KIF21B, DCTN1 und MAPK8IP3 in diesen Experimenten als FAM161A-Interaktionspartner zu identifizieren und zu bestätigen. Die im Zuge dieser Arbeit verwendete, humane Retinaproteine umfassende Köderbibliothek müsste jedoch theoretisch in der Lage gewesen sein, die Proteine lebercilin, CEP290, OFD1 und SDCCAG8 als FAM161A-Interaktionspartner zu ermitteln. Übereinstimmende Ergebnisse beider Experimente zeigten sich in der identifizierten FAM161A-Interaktionsdomäne, durch die eine Assoziation mit den verschiedenen Kandidatenproteinen ausgebildet wurde. Sämtliche Protein-Interaktionen konnten dem C-terminalen FAM161A-Bereich (Di Gioia et al.: Aminosäuren [AS] 211-660, vorliegende Studie: AS 230-543) zugeordnet werden. Der N-terminale Proteinbereich (Di Gioia et al.: AS 1-219, vorliegende Arbeit: AS 1-229), dessen Funktion bisher ungeklärt ist, war für die Ausbildung der Protein-Protein-Interaktionen *in vitro* nicht von Bedeutung. In der Folge sollen nun, durch eine genauere Betrachtung der Funktionen und Eigenschaften der potentiellen FAM161A-Interaktionsproteine KIF3A, KIF1A, KIF21B, DCTN1 und MAPK8IP3, Möglichkeiten und Wahrscheinlichkeiten eines funktionellen Zusammenhangs der einzelnen Proteine und FAM161A ermittelt und bewertet werden.

#### 6.2.4.1 Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF3A

KIF3A konnte ursprünglich durch Aufreinigung aus Seeigelleiern und Mausgehirn als neues Mitglied der Kinesinsuperfamilie charakterisiert werden (Cole et al. 1993, Kondo et al. 1994). Der N-Terminus von KIF3A bildet eine Motordomäne mit einem Durchmesser von etwa 10 nm (Kondo et al. 1994). Neben einer helikalen Mitteldomäne besitzt das Molekül weiterhin eine Prolin-reiche stäbchenförmige Domäne am C-Terminus (Kondo et al. 1994). KIF3A wurde zusammen mit KIF3B und einem Begleitprotein KAP3 („kinesin accessory protein“) als Teil des Nukleotid-sensitiven, Mikrotubuli-bindenden Kinesin-II (auch: Kinesin-2) Holoenzym, das sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,4  $\mu\text{m}/\text{sek}$  in Richtung des Plus-Endes der Mikrotubuli bewegt, gefunden (Yamazaki et al. 1995, Scholey 1996). Neben dem KIF3A/KIF3B Proteinkomplex konnte in Extrakten aus Hirngewebe der Ratte eine Assoziation von KIF3A mit KIF3C, einem weiteren homologen Protein der KIF3-Familie, gefunden werden (Muresan et al. 1998). KIF3C konnte angereichert in Gehirn, Retina und Lunge, detektiert werden (Muresan et al. 1998). In Retinagewebe wurde jedoch keine Überlappung mit KIF3A entdeckt, was auf eine zweite, von KIF3A unabhängige Funktion des KIF3C Motorproteins hindeutet (Muresan et al. 1998).

Die zu KIF3A-Orthologen in Seeigel (KRP[85/95]) und *Chlamydomonas* (FLA10), konnten in Lokalisierungsexperimenten in klassischen Zilien und Flagellen, konzentriert im Basalkörperbereich, gefunden werden (Vashishtha et al. 1996, Henson et al. 1995). Die Beteiligung des Kinesin-II Motors an anterograden IFT-Transportprozessen wurde durch Studien an Seeigelembryonen, Wirbeltierembryonen und in *Chlamydomonas*, in denen ein Kinesin-II Funktionsverlust erzielt worden war, verdeutlicht (Kozminski et al. 1995, Morris & Scholey 1997, Cole et al. 1998, Nonaka et al. 1998, Scholey 2008). Zur Ermittlung einer möglichen Funktion von KIF3A in IFT- und Mikrotubuli-basierten Transportprozessen der Wirbeltierretina wurden KIF3A-Lokalisierungsstudien mit Augengewebe aus Mensch, Affe, *Xenopus*, Rind, Ratte und Maus durchgeführt (Muresan et al. 1997, Muresan et al. 1999, Whitehead et al. 1999, tom Dieck et al. 2005, Omori et al. 2010). In *Xenopus*-Retina konnten die Proteine KIF3A und KIF3B konzentriert im Innensegment und Axonem der Photorezeptoren detektiert werden (Whitehead et al. 1999). KIF3A konnte weiterhin in Müllerzellen gefunden werden (Whitehead et al. 1999). KIF3A in Retinaschnitten aus Mensch- und Affen Augen wurden vor allem in Innensegmenten der Photorezeptoren, im Bereich des Basalkörpers und des Axonems, sowie in Müller- und Ganglienzellen lokalisiert (Whitehead et al. 1999). In Retinagewebe aus Ratten konnte KIF3A an zwei unterschiedlichen Stellen innerhalb des Photorezeptors gefunden werden (Muresan et al. 1999, tom Dieck et al.

2005). Neben der Lokalisation im Basalkörper und im proximalen Bereich des Verbindungsziliums der Photorezeptoren (Muresan et al. 1999), zeigte KIF3A in den plexiformen Schichten eine Ko-Lokalisierung u. a. mit dem Markerprotein RIBEYE (tom Dieck et al. 2005). KIF3A konnte somit als Bestandteil der Matrix und auf Vesikeln der Ribbonsynapsen identifiziert und als Komponente der präsynaptischen Ribbons in der OPL und IPL postuliert werden (Muresan et al. 1999, tom Dieck et al. 2005). Ähnliche Ergebnisse, darunter die Lokalisierung von KIF3A im Innensegment, im Axonem und in den Synapsen der Photorezeptoren, waren bei Verwendung von Retinaschnitten aus Rinderaugen erzielt worden (Muresan et al. 1997). In murinen Photorezeptoren überlappte die KIF3A-Färbung mit acetyliertem  $\alpha$ -Tubulin und zeigte eine Anreicherung im basalen Teilbereich des Ziliums (Omori et al. 2010). Durch die Lokalisierungsexperimente des Proteins in verschiedenen Spezies ergab sich somit zusammenfassend die Hypothese, dass KIF3A als Teil des Motors Kinesin-2 an Mikrotubuli-basierten Transportprozessen vom Basalkörper oder der periziliaren Region des Photorezeptorinnensegment, dem Ort der Proteinbiosynthese, in das Außensegment beteiligt ist und weiterhin eine Rolle an den Ribbonsynapsen der Photorezeptoren spielt.

Die Überprüfung der Hypothesen aus den Lokalisierungsstudien und die Ermittlung der Bedeutung und Funktion von KIF3A in der Retina wurde aus den Folgen des Funktionsverlust im Zuge verschiedener KIF3A-Knockout Studien abgeleitet (Marszalek et al. 1999a, Marszalek et al. 2000, Lin-Jones et al. 2003, Jimeno et al. 2006a, Jimeno et al. 2006b, Avasthi et al. 2009, Lopes et al. 2010, Trivedi et al. 2012, Malicki & Besharse 2012). Der konditionelle Knock-Out von *Kif3a* in murinen Photorezeptoren resultierte primär in einer Akkumulation von Opsin in den Innensegmenten und der Plasmamembran der Photorezeptoren (Marszalek et al. 2000, Jimeno et al. 2006). Die fehlerhafte Ansammlung von Opsin führte im weiteren Verlauf zum Zelltod der Photorezeptoren (Marszalek et al. 2000, Jimeno et al. 2006). Heterozygote *Kif3a*<sup>+/-</sup>- und *Kif3b*<sup>+/-</sup>- sowie homozygote *Kif3c*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die nicht embryonaler Letalität unterlagen, zeigten dagegen keine Degeneration der Photorezeptoren (Jimeno et al. 2006a). Der Funktionsverlust des Motors durch einen alternativen konditionellen *Kif3a*-Knockout spezifisch in Stäbchen konnte mit einer Akkumulation von Opsinmolekülen in den Innensegmenten und der Plasmamembran der Photorezeptoren in Verbindung gebracht werden (Lopes et al. 2010). Es wurde gezeigt, dass die Akkumulation und Fehllokalisation von Opsin in direktem Zusammenhang mit der sich anschließenden Degeneration der Photorezeptoren steht (Lopes et al. 2010). Spezifischer *Kif3a*-Knock-Out in Zapfen führte ebenfalls zur fehlerhaften Lokalisation des Sehpigments,



sowie weiterer Membran-assoziiierter Proteine und in letzter Konsequenz zur Degeneration der Zapfen (Avasthi et al. 2009). In Mäusephotorezeptoren konnte wildtypisches KIF3A durch weitere Experimente als essentiell für den standardmäßigen IFT-basierten Transport von Opsin durch Kinesin-2 entlang der ziliaren Plasmamembran identifiziert werden (Trivedi et al. 2012). Neben der Beteiligung im IFT-basierten Transport konnten KIF3A weitere Funktionen zugeordnet werden. Ein Konditionaler *Kif3a*-Knockout in verschiedenen Organen, z.B. in Niere oder Pankreas, demonstrierte die Notwendigkeit von *Kif3a* für die Ausbildung der Zilien während der Ziliogenese (Zhao et al. 2012). Direkte KIF3A-Interaktionen mit GRIP1 und PSD-95 in der OPL in muriner Retina deuten auf eine Lenkungsfunktion von KIF3A auf GRIP1 und PSD-95 und somit auf die Beteiligung von KIF3A an der Ausbildung von neuen Dendriten hin (Lin et al. 2012). Die Runterregulierung von KIF3A in HeLa-Zellen zeigte eine Fragmentierung des Golgi-Apparates, sowie einen enormen Anstieg an fehlerhaft lokalisiertem IFT20 (Evans et al. 2010).

Aufgrund der ähnlichen Lokalisation von KIF3A und FAM161A, sowie der im Zuge dieser Arbeit erhaltenen Hinweise auf eine direkte Interaktion, besteht die Möglichkeit eines funktionellen Zusammenhangs der Proteine im Bereich des Basalkörpers und des Verbindungsziliums der Photorezeptoren. Es wäre somit denkbar, dass FAM161A über eine Interaktion mit KIF3A beispielsweise an Transportprozessen von Molekülen aus den Innensegmenten in die Außensegmente, oder an weiteren KIF3A-basierten Funktionen beteiligt ist. Die Störung einer potentiellen KIF3A-FAM161A-Interaktion durch FAM161A-Nullmutationen könnte somit zu ähnlichen Konsequenzen wie der Funktionsverlust im Zuge der KIF3A-Defizienz führen. Der SID-Bereich, definiert als potentielle Interaktionsdomäne von KIF3A mit FAM161A, im C-Terminus des Proteins (416-699) umfasst mehrere Coiled-Elemente, zeigt jedoch keine Überlappungen mit der Kinesinmotordomäne.

#### **6.2.4.2 Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF21B**

KIF21B wurde als erstes somatodendritisches Kinesinmolekül, das, im Vergleich zu Zellkörper und Axon, stark angereichert in Dendriten vorliegt, identifiziert (Marszalek et al. 1999b). KIF21B und der nächste Verwandte KIF21A zeigen eine Gesamtaminosäureidentität von 61% und damit, im Vergleich mit anderen Mitgliedern der Kinesinsuperfamilie, Sequenzähnlichkeiten auch außerhalb der Motordomäne (Marszalek et al. 1999b). Trotz der Aminosäureüberlappungen, vor allem im C-terminalen Bereich mit einer gemeinsamen Protein-Protein Interaktionsdomäne aus insgesamt sieben WD40-Wiederholungen, unterliegen KIF21B und KIF21A einer unterschiedlichen Lokalisierung in Dendriten bzw. Axonen und

besitzen keine direkte Interaktion zueinander (Marszalek et al. 1999b). Mitglieder der KIF21-Familie konnten als Mikrotubuli-bindende Proteine und in Richtung Plus-Ende zugewandte Mikrotubulinmotoren, mit einer Geschwindigkeit von 0,1-0,3  $\mu\text{m/s}$ , identifiziert werden (Marszalek et al. 1999b). KIF21B-Transkripte konnten in murinen Gehirn-, Augen- und Milzgewebe nachgewiesen werden (Marszalek et al. 1999b). Auf Proteinebene fand sich KIF21B ebenfalls in Retinaextrakten sowie in diversen neuronalen Geweben (Marszalek et al. 1999b). Lokalisierungsexperiment von KIF21B in muriner Retina konnten das Protein in den Innensegmenten der Photorezeptoren, der äußeren plexiformen Schicht sowie in der Ganglienzellschicht nachweisen (Marszalek et al. 1999b). Das Lokalisierungsmuster von KIF21B erinnerte dabei stark an die Färbung von FAM161A in PFA-fixierter muriner Retina aus Abbildung 6A der vorliegenden Arbeit (Zach et al. 2012). Trotz des Fehlens weiterer genauerer Daten, wäre ein funktioneller Zusammenhang von KIF21B und FAM161A, aufgrund der nahezu identischen Lokalisierung in muriner Retina, durchaus denkbar. So könnte beispielsweise FAM161A, das in der OPL als Teil der postsynaptischen Enden der Neuronen 2. Ordnung nachgewiesen wurde (Zach et al. 2012), durch eine Interaktion mit KIF21B an Transportprozessen entlang der Mikrotubulischienen in die Dendritenspitzen der Nervenzellen involviert sein. Die potentielle Interaktionsdomäne innerhalb des KIF21B-Moleküls umfasst mit den Aminosäuren 861-1215 mehrere Coiled-Bereiche und befindet sich außerhalb der WD40-Wiederholungen sowie der Kinesinmotordomäne.

#### **6.2.4.3 Potentielle Interaktion von FAM161A mit dem Kinesinprotein KIF1A**

KIF1A, ein weiteres Mitglied der Kinesinsuperfamilie, bildet zusammen mit KIF1B $\beta$  die Kinesin-3-Familie (Hirokawa 2011). KIF1A wurde als Neuronen-spezifisches Mitglied der Kinesinfamilie entdeckt und ursprünglich als anterograder Motor mit einer monomeren, globulären Motordomäne charakterisiert, der bei hohen Konzentrationen jedoch zur Dimerisierung neigt (Lee et al. 2004). KIF1A wurde eine Funktion im Transport von synaptischen Vesikelvorläufern zugeschrieben (Okada et al. 1995). In *D. melanogaster*, *C. elegans* und verschiedenen Säugetieren wird der KIF1A-Motor zusammenfassend für den anterograden Transport von sogenannten DCVs („dense core vesicle“) in den Axonen von Neuronen benötigt (Hirokawa 2011, Lo et al. 2011). Weiterhin konnte eine anhaltende Assoziation von KIF1A während des retrograden Rücktransport mit den DCVs beobachtet werden (Lo et al. 2011). Durch einen Knockout des KIF1A-Proteins in einem Mausmodell konnte die ursprünglich postulierte Funktion von KIF1A im Transport von synaptischen Vesikelvorläufern ebenfalls bestätigt werden (Yonekawa et al. 1998). Weiterhin wurde eine kritische Beteiligung von KIF1A am axonalen Transport und damit an der

Überlebensfähigkeit, Aufrechterhaltung und Funktion vor allem von ausgereiften Neuronen gezeigt (Yonekawa et al. 1998). Interessanterweise wurden Wechselwirkungen des KIF1A-Homologen in *C. elegans* mit den weiteren potentiellen FAM161A-Interaktionspartnern DCTN1 und MAPK8IP3 gefunden (Hsu et al. 2011). DCTN1 und MAPK8IP3 dienen hierbei, neben anderen Adaptorproteinen, wie z.B. Liprin- $\alpha$ , als Regulatoren der KIF1A-Verteilung und -motilität in Neuronen (Hsu et al. 2011). Die im Y2H-Experiment dieser Arbeit identifizierte mögliche FAM161A-Interaktionsdomäne innerhalb des KIF1A-Proteins erstreckt sich über die Aminosäuren 595-735. Dieser Bereich befindet sich, wie bereits bei den Kinesinproteinen KIF3A und KIF21B beobachtet, außerhalb der Kinesinmotordomäne (2-396). Es bleibt somit festzuhalten, dass die mögliche Interaktion von FAM161A mit verschiedenen Kinesinproteinen nicht aufgrund der hohen Homologie dieser Proteine im Bereich des Motors verursacht sein kann. Die SID von KIF1A befindet sich in unmittelbarer Nachbarschaft zur sogenannten „Forkhead“-assoziierten (FHA)-Domäne, die durch die Aminosäuren 487-596 ausgebildet wird (Lee et al. 2004). Die FHA-Domäne ist ein Phosphoproteinbindemodul und negativer Regulator der Dimerisierung und Prozessivität des KIF1A-Motors durch intramolekulare Wechselwirkung mit einem Coiled-Coil-Bereich (CC2) (Lee et al. 2004). Neben den GST-Pulldown-Experimenten mit KIF1A voller Länge und GST-FAM161A-Fusionsproteinen, die keine Interaktion identifizieren konnten, waren im Zuge dieser Arbeit Interaktionsstudien mit einer FHA-Deletionsvariante von KIF1A durchgeführt worden (Daten nicht gezeigt). Hierbei sollte die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass KIF1A mit FAM161A direkt assoziieren könnte, sich diese Interaktion aufgrund der intramolekularen Wechselwirkungen der KIF1A-Domänen FHA und CC2 jedoch *in vitro* nicht ausbilden kann. Diese Experimente konnten jedoch die mit Hilfe der Hefe-2-Hybrid-Untersuchungen ermittelte potentielle Interaktion zwischen KIF1A und FAM161A ebenfalls nicht verifizieren (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der negativen Ergebnisse der Interaktionsstudien von KIF1A und FAM161A muss nach momentanem Stand von einem falsch positiven Kandidatenprotein des Hefe-2-Hybrid-Experiments ausgegangen werden. Auch die bisher bekannten Funktionen von KIF1A geben keine ernsthaften Hinweise auf eine mögliche spezifische Verbindung mit FAM161A in der Retina oder den Photorezeptoren.

#### 6.2.4.4 Potentielle Interaktion von FAM161A mit DCTN1

Dynaktin 1 (DCTN1), auch bekannt unter p150<sup>Glued</sup>, ist eine Hauptuntereinheit des Dynaktinkomplexes, der zusammen mit Dynein im Transport in Richtung des Minus-Endes der Mikrotubulischienen der Nervenzellaxone fungiert (Lloyd et al. 2012). Das Protein p150<sup>Glued</sup> besitzt eine CAP-Gly („cytoskeleton-associated protein, Gly-rich“) Mikrotubuli-

bindedomäne, sowie eine Dyneininteraktionsdomäne (Deacon et al. 2003). Durch eine direkte, kompetitive Bindungsfähigkeit der Aminosäuren 600-811 des p150<sup>Glued</sup>-Proteins sowohl an Dynein als auch an die KAP-Untereinheit des Kinesin-II Motors wurde die Beteiligung von p150<sup>Glued</sup> an der Koordination der entgegengesetzten Mikrotubulomotoren Dynein und Kinesin-II beim Transport von Melanosomen in *Xenopus laevis* postuliert (Deacon et al. 2003). Da das p150<sup>Glued</sup>-Protein die physikalische Verbindung zwischen Dynein und Dynaktin bildet, wirkt es als Schlüsselfaktor für die Funktions- und Ladungskontrolle des Dyneinmotors (Vale 2003, Kim et al. 2004). Obwohl der Dyneinmotor teilweise in der Lage ist, selbstständig an Membran-basierte Ladung zu binden, scheint die Ausbildung einer funktionsfähigen Dyneinladung mehrheitlich abhängig von einer Interaktion mit Dynaktin zu sein (Schroer 2004). Eine Beteiligung von p150<sup>Glued</sup> an der retinalen Degeneration, die Teil des Bardet-Biedl-Syndroms ist, konnte durch direkte Wechselwirkungen von p150<sup>Glued</sup> und BBS4 postuliert werden (Kim et al. 2004). BBS4, das in den Zentriolensatelliten der Zentrosomen und Basalkörper in primären Zilien lokalisiert ist, könnte als Adapter für die p150<sup>Glued</sup>-Untereinheit des Dynaktinkomplexes fungieren (Kim et al. 2004). Dadurch könnte das Protein PCM1 („pericentriolar material 1“) und dessen assoziierte Ladung zu den Satelliten transportiert werden (Kim et al. 2004). Die normale Funktion des Proteins PCM1 in den Satelliten erstreckt sich dabei von der Biogenese und Funktion bis zur Aufrechterhaltung von Zentrosomen und Zilien (Kim et al. 2004). Ein kürzlich durchgeführtes Hefe-2-Hybrid Experiment mit p150<sup>Glued</sup> ergab eine direkte Interaktion mit TBCB („tubulin-binding cofactor B“), einem Protein, das eine Rolle in der Biosynthese von Mikrotubuli bzw. in der Ausbildung der  $\alpha$ -Tubulin-Faltung spielt (Kuh et al. 2012). Diese Erkenntnis deutet auf einen funktionellen Zusammenhang des Tubulin-abhängigen Transportmechanismus mit dem Aufbau der Mikrotubuli hin (Kuh et al. 2012). Inwiefern weitere, potentielle direkte Interaktionspartner von DCTN1 im Zuge dieser Studie gefunden wurden, wird in dieser Studie nicht deutlich (Kuh et al. 2012). Dies wäre jedoch im Zusammenhang mit einer potentiellen Interaktion mit FAM161A von großem Interesse. Die Interaktion von DCTN1 mit FAM161A wird laut Ergebnis des Y2H-Experiments der vorliegenden Arbeit durch den Aminosäurebereich 264-468, der mit einer großen Coiled-Coil-Region überlappt, ausgebildet. Die Aminosäuren 264-468 sind unabhängig von den Proteinbereichen, die für die Interaktion mit Mikrotubuli, Dynein und Kinesin-II gezeigt worden waren (Deacon et al. 2003). Berücksichtigt man die bisher ermittelten DCTN1-Funktionen, könnte eine potentielle Interaktion von DCTN1 mit FAM161A eine Rolle in der Zentrosomenbiologie oder in der Regulation des Dynein- und Kinesin-basierten Transports entlang der Mikrotubulischienen spielen. Eine weitere Möglichkeit für eine FAM161A-Funktion durch eine Interaktion mit DCTN1 könnte sich

durch den funktionellen Zusammenhang von DCTN1 mit der Mikrotubulideacetylase HDAC6, der durch die Ko-Lokalisation der beiden Proteine am Mikrotubulinetzwerk von A549-Zellen postuliert wurde, ergeben (Hubbert et al. 2002).

#### 6.2.4.5 Potentielle Interaktion von FAM161A mit MAPK8IP3

MAPK8IP3 (JIP3/JSAP1, SYD [*D. melanogaster*], UNC-16 [*C. elegans*]) ist ein Mitglied der JIP-Proteinfamilie, die Interaktionspartner der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNKs oder MAPKs [Mitogen-aktivierte Proteinkinasen]) sind und somit als Gerüstproteine für die JNK/MAPK-Signalwege fungieren (Koushika 2008). JIP3 konnte als Transkript in Mausretina gefunden werden und ist ausnahmslos in neuronalen Zellen exprimiert (Brand et al. 2007). JIPs binden an JNKs, MKKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinasen) und an diverse MAPKKKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasekinasekinasen) (Ito et al. 1999). Bindungsexperimente zeigten eine JIP3 Interaktion mit allen drei Kinasen des JNK-Signalwegs und identifizierten die höchste Affinität zur Jun-Kinase JNK3, wodurch somit JIP3 als Gerüstprotein für die JNK3-Kaskade postuliert wurde (Ito et al. 1999, Kelkar et al. 2000). Die Hauptaufgabe der MAPK-Kaskaden ist die Verbindung einer Vielzahl von extrazellulären Stimulationen an eine intrazelluläre Antwort, beispielsweise an Änderung in der Genexpression zu koppeln (Ito et al. 1999). In Bindungsexperimenten konnte die leichte Kette des konventionellen Kinesins-I (KLC) als Interaktionspartner von JIP3 bzw. der orthologen Proteine UNC-16 (*C. elegans*) und SYD (*D. melanogaster*) identifiziert werden (Bowmann et al. 2000, Verhey et al. 2001, Byrd et al. 2001). Zusätzlich wurde dem JIP3-Orthologen SYD eine davon unabhängige direkte Bindung an die schwere Kinesinkette (KHC) nachgewiesen (Sun et al. 2011). Unter anderem durch diese Ergebnisse wurden die Proteine der JIP-Familie als Adaptoren, die verschiedene Arten von Ladungen mit Kinesin-I verknüpfen und möglicherweise durch eine Aktivierung der JNK-Kaskade diese wieder entladen können, definiert (Koushika 2008). Kinesin-I, bestehend aus schweren und leichten Kinesinketten (KHC und KLC) ist der Hauptmotor für axonalen Transport (Koushika 2008). In Retinaschnitten aus Augen von Mensch und Rind konnten die Komponenten des konventionellen Kinesin-I KIF5C und KIF5A, ähnlich wie FAM161A in murinen und humanen Schnitten, in der Region des Verbindungsziliums sowie des Basalkörpers der Photorezeptoren lokalisiert werden (Mavlyatov et al. 2002, Zach et al. 2012). UNC-16 und SYD konnten in Bindungsexperimenten weiterhin als Interaktionspartner der Dyneinuntereinheit DLI („dynein light intermediate chain“) bzw. von p150<sup>Glued</sup> ermittelt und damit als Linker zwischen Kinesin-1 und zytoplasmatischem Dynein identifiziert werden (Koushika 2008, Arimoto et al. 2011). JIP3 könnte somit ebenfalls eine Rolle im Dynein-

abhängigen retrograden Transportprozessen an Mikrotubuli spielen bzw. an der Regulation der Transportrichtung involviert sein (Hsu et al. 2011). Das JIP3-Interaktionsprotein JNK3 katalisiert die Phosphorylierung des Proteins tau, das Einfluss auf die Regulation der Mikrotubulidynamik nehmen kann (Reynolds et al. 1997, Koushika 2008).

Eine potentielle Interaktion von FAM161A mit MAPK8IP3 könnte somit eine Vielzahl von Mikrotubuli-basierten Prozessen beeinflussen. Denkbar wäre eine Funktion in der Regulation von Mikrotubulimodifikation, ähnlich beispielsweise der Inhibierung der HDAC6 durch tau. Durch eine potentielle Interaktion mit MAPK8IP3 könnte FAM161A somit in der Regulation dieses Prozesses involviert sein. Weiterhin könnte eine Beteiligung von FAM161A an der Koordinierung der Transportrichtung der Kinesin- und Dyneinmotoren durch die Interaktion mit den Schlüsselproteinen DCTN1 (p150<sup>Glued</sup>) und MAPK8IP3 (JIP3) vermutet werden. Die potentielle Interaktionsdomäne von MAPK8IP3 (AS 35-357) mit FAM161A befindet sich laut Ergebnis des Y2H-Experiments dieser Arbeit im N-terminalen Bereich, der eine großen Coiled-Coil-Region (66-168) umfasst.

#### **6.2.5 Molekular Mechanismen der RP28-vermittelten Retinitis Pigmentosa**

Durch die funktionelle Charakterisierung des neuen ziliären Proteins FAM161A und mit Hilfe der in der vorliegenden Arbeit ermittelten, potentiellen FAM161A-Bindungspartner ergeben sich denkbare Teilaspekte des RP28-Pathomechanismuses. Die FAM161A-Lokalisierungsexperimente legen eine Beteiligung an der Zentrosomen- bzw. Basalkörperbiologie, sowie an neuronalen Mikrotubuli-basierten IFT-Transportprozessen nahe (Zach et al. 2012). Die Expressionsstudien von heterologem FAM161A und die *in vitro* Experimente ergaben ein Mikrotubuliassoziations- und Stabilisierungspotential von FAM161A. Protein-Protein-Bindungsexperimente konnten der UPF0564-Domäne der FAM161-Familienmitglieder, in der sich alle bisher bekannten RP28-assoziierten Patientenmutationen befinden, eine Vielzahl von homo- und heterotypischen Interaktionen nachweisen. Aus diesem breiten Spektrum der FAM161A-Funktionen, die dem wildtypischen Protein zugeordnet werden konnten, ergeben sich viele Angriffspunkte, die durch FAM161A-Nullmutationen gestört sein könnten. FAM161A-Mutationen könnten beispielsweise zu einer fehlenden Mikrotubulibindung führen und somit möglicherweise die Mikrotubuli-basierten FAM161A-Funktionen beeinträchtigen. Die RP-assoziierten FAM161A-Nullmutationen könnten weiterhin die homo- und heterotypische Interaktionsfähigkeit verhindern. Eine Beteiligung an der korrekten Ausbildung und Aufrechterhaltung von primären Zilien beinhaltet weiterhin die Möglichkeit eines defekten Photorezeptorverbindungszipfels als Folge der FAM161A-Nullmutationen.

## 7 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte die molekularen Pathomechanismen der beiden erblichen retinalen Degenerationen der Sorsby Fundusdystrophie (SFD), sowie der RP28-vermittelten Retinitis Pigmentosa (RP) zum Thema. Durch die funktionelle Charakterisierung der jeweiligen Proteine TIMP3 und FAM161A, sowie den Krankheits-assoziierten Mutationen sollten die zuvor postulierten Pathomechanismen erweitert (SFD) bzw. neue Teilaspekte (RP28) ermittelt werden.

Punktmutationen des BM-gebundenen Proteins TIMP3 können zur Sorsby Fundusdystrophie führen. Pathologisch veränderte Proteineigenschaften, vor allem aufgrund von ungepaarten Cysteinresten, können die Akkumulation von TIMP3 und eine Verdickung im Bereich der BM bewirken. In dieser Arbeit wurden im Zuge von *Timp3*-Genexpressionsstudien keine Hinweise auf eine erhöhte mRNA-Menge als Folge der S156C-Mutation gefunden. Ultrastrukturelle und histologische Experimente mit Retinaschnitten der Augen von Mäusen der Genotypen *Timp3*<sup>+/+</sup>, *Timp3*<sup>S156C/+</sup> und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup> eines CD1-Albinohintergrunds, sowie Proteasomaktivitätstests mit isolierten Fibroblasten und primären RPE-Zellen aus *Timp3*<sup>-/-</sup>, *Timp3*<sup>+/+</sup>-, *Timp3*<sup>S156C/+</sup>- und *Timp3*<sup>S156C/S156C</sup>-Mäusen lieferten ebenfalls keine Anzeichen auf Veränderungen der untersuchten phänotypischen Aspekte (S156C-TIMP3 induzierte Entzündungsprozesse, TIMP3-Fehllokalisierung, gestörte Proteasomaktivitäten) als Folge der TIMP3-Mutation S156C. Radioaktive Fütterungsstudien von Fibroblasten- und RPE-Zellkulturen konnten eine erhöhte EZM-Produktion als Folge der heterozygoten Mutation S156C-TIMP3 verdeutlichen. Im Verlauf von Interaktionsstudien mit Fibroblasten- und HEK293-EBNA-Zellen mit EZM-gebundenen endogen bzw. heterolog exprimierten TIMP3-Varianten konnte der Einfluss verschiedener TIMP3-Punktmutation auf die Assoziation mit Trypsin-sensitiven Komponenten der EZM nachgewiesen werden. Die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Resultate bezüglich des Pathomechanismus der autosomal dominant vererbten SFD legen somit eine Zugewinnfunktion der mutierten TIMP3-Proteine nahe.

Homozygote Nullmutationen in FAM161A konnten kürzlich als Ursache für die RP28-vermittelte Retinitis Pigmentosa identifiziert werden. Die vorliegende Arbeit zielte auf eine anfängliche Charakterisierung des neuen ziliären Proteins ab. Zur sub-zellulären Lokalisierung von FAM161A in retinalen Dünnschnitten wurden zwei Antikörperseren gegen homologe FAM161A-Versionen hergestellt und erfolgreich aufgereinigt. Lokalisierungsstudien in murinen und humanen Netzhäuten konnten FAM161A im Verbindungszilium sowie im Basalkörper und der anliegenden Zentriole in den Photorezeptoren nachweisen (Zach et al.

2012). Außerhalb der Photorezeptoren konnte FAM161A im Bereich der äußeren Körnerschicht, sowie der Ganglienzellschicht lokalisiert werden (Zach et al. 2012). Immunelektronenmikroskopische Experimente bestätigten die FAM161A-Präsenz im Verbindungszilium und im Basalkörper und deuteten auf eine direkte Assoziation mit Mikrotubulistrukturen hin (Zach et al. 2012). Durch die heterologe Expression von FAM161A in HEK293-EBNA-, COS7- und den zilierten LLC-PK1-Zellen, sowie durch immunologische Lokalisierung konnte eine Anlagerung des rekombinanten Proteins an zytoplasmatische und zentrosomale Mikrotubulistrukturen ermittelt werden. Die Assoziation von FAM161A an Mikrotubuli, die durch *in vitro* Bindungsexperimente als direkte physikalische Interaktion charakterisiert werden konnte, bewirkte einen erhöhten Acetylierungslevel der  $\alpha$ -Tubulinuntereinheiten der Mikrotubuli und eine gesteigerte Stabilisierung des Netzwerks gegenüber einer Behandlung mit dem depolymerisierenden Reagenz Nocodazol. Rekombinantes GST-FAM161A<sub>230-543</sub> hatte *in vitro* keinen Einfluss auf den Polymerisierungsprozess von monomerem Tubulin zu Mikrotubulistrukturen. *In vitro* Interaktionsstudien ergaben homo- und heterotypische FAM161A-FAM161A- bzw. FAM161A-FAM161B-Interaktionen, die eine mögliche Gerüstproteinfunktion der FAM161-Proteine vermitteln könnten. Ein Hefe-2-Hybrid-Experiment zur Ermittlung direkter FAM161A-Interaktionspartner lieferte die potentiellen Wechselwirkungen mit den Kandidatenproteinen KIF3A, KIF1A, KIF21B, DCTN1 und MAPK8IP3, mit deren Validierung in der vorliegenden Dissertation begonnen wurde. Durch die vielfältigen Funktion und Bindungspartner des FAM161A-Proteins ergeben sich diverse Ansatzpunkte für die Aufklärung des RP28-assoziierten Pathomechanismus. Aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs und der bisher erzielten Ergebnisse ist weiterhin, entsprechend den Erwartungen, von einem Verlust der Proteinfunktion als Folge der FAM161A-Mutationen in RP28-Patienten auszugehen. Zusammenfassend eröffnen die Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten funktionellen Charakterisierung des RP-assoziierten Proteins FAM161A mehrere Ansatzpunkte für dessen weiterführende Charakterisierung und eine noch detaillierte Aufklärung des durch FAM161A-Nullmutationen induzierten RP28-Pathomechanismus.



## 8 Literaturverzeichnis

- Ainsztein A.M. & Purich D.L.** (1994) Stimulation of tubulin polymerization by MAP-2. Control by protein kinase C-mediated phosphorylation at specific sites in the microtubule-binding region. *J. Biol. Chem.*, **269**, 28465-28471.
- Akella J.S.**, Wloga D., Kim J., Starostina N.G., Lyons-Abbott S., Morrisette N.S., Dougan S.T., Kipreos E.T. & Gaertig J. (2010) MEC-17 is an alpha-tubulin acetyltransferase. *Nature*, **467**, 218-222.
- Ambati J. & Fowler B.J.** (2012) Mechanisms of age-related macular degeneration. *Neuron*, **75**, 26-39.
- Amour A.**, Slocombe P.M., Webster A., Butler M., Knight C.G., Smith B.J., Stephens P.E., Shelley C., Hutton M., Knäuper V., et al. (1998) TNF-alpha converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3. *FEBS Lett.*, **435**, 39-44.
- Anand-Apte B.**, Bao L., Smith R., Iwata K., Olsen B.R., Zetter B. & Apte S.S. (1996) A review of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) and experimental analysis of its effect on primary tumor growth. *Biochem. Cell Biol.*, **74**, 853-862.
- Anand-Apte B.**, Pepper M.S., Voest E., Montesano R., Olsen B., Murphy G., Apte S.S. & Zetter B. (1997) Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitor of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **38**, 817-823.
- Arikawa K. & Williams D.S.** (1993) Acetylated alpha-tubulin in the connecting cilium of developing rat photoreceptors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **34**, 2145-2149.
- Arimoto M.**, Koushika S.P., Choudhary B.C., Li C., Matsumoto K. & Hisamoto N. (2011) The *Caenorhabditis elegans* JIP3 protein UNC-16 functions as an adaptor to link kinesin-1 with cytoplasmic dynein. *J. Neurosci.*, **31**, 2216-2224.
- Arris C.E.**, Bevirt D.J., Mohamed J., Li Z., Langton K.P., Barker M.D., Clarke M.P. & McKie N. (2003) Expression of mutant and wild-type TIMP3 in primary gingival fibroblasts from Sorsby's fundus dystrophy patients. *Biochim. Biophys. Acta*, **1638**, 20-28.
- Arts H.H.**, Doherty D., van Beersum S.E., Parisi M.A., Letteboer S.J., Gordon N.T., Peters T.A., Märker T., Voeselek K., Kartono A., et al. (2007) Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat. Genet.*, **39**, 882-888.
- Avasthi P.**, Watt C.B., Williams D.S., Le Y.Z., Li S., Chen C.K., Marc R.E., Frederick J.M. & Baehr W. (2009) Trafficking of membrane proteins to cone but not rod outer segments is dependent on heterotrimeric kinesin-II. *J. Neurosci.*, **29**, 14287-14298.
- Ayuso C. & Millan J.M.** (2010) Retinitis pigmentosa and allied conditions today: a paradigm of translational research. *Genome Med.*, **2**, 34.
- Bailey T.A.**, Alexander R.A., Dubovy S.R., Luthert P.J. & Chong N.H. (2001) Measurement of TIMP-3 expression and Bruch's membrane thickness in human macula. *Exp. Eye. Res.*, **73**, 851-858.
- Bandah-Rozenfeld D.**, Mizrahi-Meissonnier L., Farhy C., Obolensky A., Chowers I., Pe'er J., Merin S., Ben-Yosef T., Ashery-Padan R., Banin E. & Sharon D. (2010) Homozygosity mapping reveals null mutations in FAM161A as a cause of autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 382-391.
- Barbazetto I.A.**, Hayashi M., Klais C.M., Yannuzzi L.A. & Allikmets R. (2005) A novel TIMP3 mutation associated with Sorsby fundus dystrophy. *Arch. Ophthalmol.*, **123**, 542-543.
- Blenis J. & Hawkes S.P.** (1983) Transformation-sensitive protein associated with the cell substratum of chicken embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **80**, 770-774.
- Blenis J. & Hawkes S.P.** (1984) Characterization of a transformation-sensitive protein in the extracellular matrix of chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, **259**, 11563-11570.

- Bond M.**, Murphy G., Bennett M.R., Amour A., Knauper V., Newby A.C. & Baker A.H. (2000) Localization of the death domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 to the N terminus. Metalloproteinase inhibition is associated with proapoptotic activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 41358-41363.
- Booiij J.C.**, Baas D.C., Beisekeeva J., Gorgels T.G. & Bergen A.A. (2010) The dynamic nature of Bruch's membrane. *Prog. Retin. Eye Res.*, **29**, 1-18.
- Bowman A.B.**, Kamal A., Ritchings B.W., Philp A.V., McGrail M., Gindhart J.G. & Goldstein L.S. (2000) Kinesin-dependent axonal transport is mediated by the sunday driver (SYD) protein. *Cell*, **103**, 583-594.
- Brand C.**, Schaeffel F. & Feldkaemper M.P. A microarray analysis of retinal transcripts that are controlled by image contrast in mice. *Mol. Vis.*, **13**, 920-932.
- Bringmann A.**, Pannicke T., Grosche J., Francke M., Wiedemann P., Skatchkov S.N., Osborne N.N. & Reichenbach A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.*, **25**, 397-424.
- Brown M.K. & Naidoo N.** (2012) The endoplasmic reticulum stress response in aging and age-related diseases. *Front. Physiol.*, **3**, epub 2012 Jul. 16.
- Bulinski J.C.** (2007) Microtubule modification: acetylation speeds anterograde traffic flow. *Curr. Biol.*, **17**, R18-R20.
- Butler G.S.**, Apte S.S., Willenbrock F. & Murphy G. (1999) Human tissue inhibitor of metalloproteinases 3 interacts with both the N- and C-terminal domains of gelatinases A and B. Regulation by polyanions. *J. Biol. Chem.*, **274**, 10846-10851.
- Byrd D.T.**, Kawasaki M., Walcoff M., Hisamoto N., Matsumoto K. & Jin Y. (2001) UNC-16, a JNK-signaling scaffold protein, regulates vesicle transport in *C. elegans*. *Neuron*, **32**, 787-800.
- Campbell N.A. & Reece J.B.** (2003) Biologie.
- Capon M.R.**, Marshall J., Krafft J.I., Alexander R.A., Hiscott P.S. & Bird A.C. (1989) Sorsby's fundus dystrophy. A light and electron microscopic study. *Ophthalmology*, **96**, 1769-1777.
- Cassimeris L. & Spittle C.** (2001) Regulation of microtubule-associated proteins. *Int. Rev. Cytol.*, **210**, 163-226.
- Chakarova C.F.**, Khanna H., Shah A.Z., Patil S.B., Sedmak T., Murga-Zamalloa C.A., Papaioannou M.G., Nagel-Wolfrum K., Lopez I., Munro P., et al. (2011) TOPORS, implicated in retinal degeneration, is a cilia-centrosomal protein. *Hum. Mol. Genet.*, **20**, 975-987.
- Chen W.**, Stambolian D., Edwards A.O., Branham K.E., Othman M., Jakobsdottir J., Tosakulwong N., Pericak-Vance M.A., Campochiaro P.A., Klein M.L., et al. (2010) Genetic variants near TIMP3 and high-density lipoprotein-associated loci influence susceptibility to age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **107**, 7401-7406.
- Chih B.**, Liu P., Chinn Y., Chalouni C., Komuves L.G., Hass P.E., Sandoval W. & Peterson A.S. (2012) A ciliopathy complex at the transition zone protects the cilia as a privileged membrane domain. *Nat. Cell Biol.*, **14**, 61-72.
- Chong N.H.**, Alexander R.A., Gin T., Bird A.C. & Luthert P.J. (2000) TIMP-3, collagen, and elastin immunohistochemistry and histopathology of Sorsby's fundus dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**, 898-902.
- Chong N.H.**, Kvant A., Seregard S., Bird A.C., Luthert P.J. & Steen B. (2003) TIMP-3 mRNA is not overexpressed in Sorsby fundus dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.*, **136**, 954-955.
- Chu U.B.**, Song J., Mavlyutov T.A. & Guo L.W. (2010) In vitro interaction of tubulin with the photoreceptor cGMP phosphodiesterase gamma-subunit. *Neurosci. Lett.*, **482**, 225-229.
- Cole C.**, Barber J.D. & Barton G.J. (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids. Res.*, **36**, W197-W201.

- Cole D.G.**, Chinn S.W., Wedaman K.P., Hall K., Vuong T. & Scholey J.M. (1993) Novel heterotrimeric kinesin-related protein purified from sea urchin eggs. *Nature*, **366**, 268-270.
- Cole D.G.**, Diener D.R., Himelblau A.L., Beech P.L., Fuster J.C. & Rosenbaum J.L. (1998) Chlamydomonas kinesin-II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.*, **141**, 993-1008.
- Cruz-Muñoz W.**, Kim I. & Khokha R. (2006a) TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*, **25**, 650-655.
- Cruz-Muñoz W.**, Sanchez O.H., Di Grappa M., English J.L., Hill R.P. & Khokha R. (2006b) Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in *timp-3*<sup>-/-</sup> mice. *Oncogene*, **25**, 6489-6496.
- Czarnecki P.G. & Shah J.V.** (2012) The ciliary transition zone: from morphology and molecules to medicine. *Trends Cell Biol.*, **22**, 201-210.
- Deacon S.W.**, Serpinskaya A.S., Vaughan P.S., Lopez Fanarraga M., Vernos I., Vaughan K.T. & Gelfand V.I. (2003) Dynactin is required for bidirectional organelle transport. *J. Cell Biol.*, **160**, 297-301.
- Dehmelt L. & Halpain S.** (2005) The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol.*, **6**, 204.
- den Hollander A.I.**, Koenekoop R.K., Mohamed M.D., Arts H.H., Boldt K., Towns K.V., Sedmak T., Beer M., Nagel-Wolfrum K., McKibbin M., et al. (2007) Mutations in LCA5, encoding the ciliary protein lebercilin, cause Leber congenital amaurosis. *Nat. Genet.*, **39**, 889-895.
- den Hollander A.I.**, Koenekoop R.K., Yzer S., Lopez I., Arends M.L., Voesenek K.E., Zonneveld M.N., Strom T.M., Meitinger T., Brunner H.G., et al. (2006) Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am. J. Hum. Genet.*, **79**, 556-561.
- Di Fulvio S.**, Azakir B.A., Therrien C. & Sinnreich M. (2011) Dysferlin interacts with histone deacetylase 6 and increases alpha-tubulin acetylation. *PLoS One*, **6**, e28563.
- Di Gioia S.A.**, Letteboer S.J., Kostic C., Bandah-Rozenfeld D., Hetterschijt L., Sharon D., Arsenijevic Y., Roepman R. & Rivolta C. (2012) FAM161A, associated with retinitis pigmentosa, is a component of the cilia-basal body complex and interacts with proteins involved in ciliopathies. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 5174-5184.
- Ding H.**, Dolan P.J. & Johnson G.V. (2008) Histone deacetylase 6 interacts with the microtubule-associated protein tau. *J. Neurochem.*, **106**, 2119-2130.
- Dompierre J.P.**, Godin J.D., Charrin B.C., Cordelières F.P., King S.J., Humbert S. & Saudou F. (2007) Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J. Neurosci.*, **27**, 3571-3583.
- Douglas D.A.**, Shi Y.E. & Sang Q.A. (1997) Computational sequence analysis of the tissue inhibitor of metalloproteinase family. *J. Protein Chem.*, **16**, 237-255.
- Dowling J.E. & Dubin M.W.** (2011) The vertebrate retina. *Compr. Physiol.*, 317-339.
- Dryja T.P.**, McGee T.L., Hahn L.B., Cowley G.S., Olsson J.E., Reichel E., Sandberg M.A. & Berson E.L. (1990) Mutations within the rhodopsin gene in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *N. Engl. J. Med.*, **323**, 1302-1307.
- Dyson H.J. & Wright P.E.** (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 197-208.
- Evans R.J.**, Schwarz N., Nagel-Wolfrum K., Wolfrum U., Hardcastle A.J. & Cheetham M.E. (2010) The retinitis pigmentosa protein RP2 links pericentriolar vesicle transport between the Golgi and the primary cilium. *Hum. Mol. Genet.*, **19**, 1358-1367.

- Fariss R.N.**, Apte S.S., Luthert P.J., Bird A.C. & Milam A.H. (1998) Accumulation of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in human eyes with Sorsby's fundus dystrophy or retinitis pigmentosa. *Br. J. Ophthalmol.*, **82**, 1329-1334.
- Fedak P.W.**, Smookler D.S., Kassiri Z., Ohno N., Leco K.J., Verma S., Mickle D.A., Watson K.L., Hojilla C.V., Cruz W., et al. (2004) TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation*, **110**, 2401-2409.
- Felbor U.**, Stöhr H., Amann T., Schönherr U. & Weber B.H. (1995) A novel Ser156Cys mutation in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in Sorsby's fundus dystrophy with unusual clinical features. *Hum. Mol. Genet.*, **4**, 2415-2416.
- Felbor U.**, Stöhr H., Amann T., Schönherr U., Apfelstedt-Sylla E. & Weber B.H. (1996) A second independent Tyr168Cys mutation in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in Sorsby's fundus dystrophy. *J. Med. Genet.*, **33**, 233-236.
- Felbor U.**, Suvanto E.A., Forsius H.R., Eriksson A.W. & Weber B.H. (1997) Autosomal recessive Sorsby fundus dystrophy revisited: molecular evidence for dominant inheritance. *Am. J. Hum. Genet.*, **60**, 57-62.
- Ferrari S.**, Di Iorio E., Barbaro V., Ponzin D., Sorrentino F.S. & Parmeggiani F. Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. (2011) *Curr. Genomics*, **12**, 238-249.
- Fogarasi M.**, Janssen A., Weber B.H. & Stöhr H. (2008) Molecular dissection of TIMP3 mutation S156C associated with Sorsby fundus dystrophy. *Matrix Biol.*, **27**, 381-392.
- Follit J.A.**, Tuft R.A., Fogarty K.E. & Pazour G.J. (2006) The intraflagellar transport protein IFT20 is associated with the Golgi complex and is required for cilia assembly. *Mol. Biol. Cell*, **17**, 3781-3792.
- Francis P.J. & Klein M.L.** (2011) Update on the role of genetics in the onset of age-related macular degeneration. *Clin. Ophthalmol.*, **5**, 1127-1133.
- Frolenkov G.I.**, Belyantseva I.A., Friedman T.B. & Griffith A.J. (2004) Genetic insights into the morphogenesis of inner ear hair cells. *Nat. Rev. Genet.*, **5**, 489-498.
- Garcia-Gonzalo F.R.**, Corbit K.C., Sirerol-Piquer M.S., Ramaswami G., Otto E.A., Noriega T.R., Seol A.D., Robinson J.F., Bennett C.L., Josifova D.J., et al. (2011) A transition zone complex regulates mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat. Genet.*, **43**, 776-784.
- Giessl A.**, Trojan P., Rausch S., Pulvermüller A. & Wolfrum U. (2006) Centrin, gatekeepers for the light-dependent translocation of transducin through the photoreceptor cell connecting cilium. *Vision Res.*, **46**, 4502-4509.
- Gill S.E.**, Pape M.C., Khokha R., Watson A.J. & Leco K.J. (2003) A null mutation for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (Timp-3) impairs murine bronchiole branching morphogenesis. *Dev. Biol.*, **261**, 313-323.
- Glögl M.** (2011) Charakterisierung von Protein-Protein Interaktionen des Retinitis Pigmentosa Proteins FAM161A. Bachelorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg.
- Gluzman Y.** (1981) SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*, **23**, 175-182.
- Gómez-Baldó L.**, Schmidt S., Maxwell C.A., Bonifaci N., Gabaldón T., Vidalain P.O., Senapedis W., Kletke A., Rosing M., Barnekow A., et al. (2010) TACC3-TSC2 maintains nuclear envelope structure and controls cell division. *Cell Cycle*, **9**, 1143-1155.
- Gorden N.T.**, Arts H.H., Parisi M.A., Coene K.L., Letteboer S.J., van Beersum S.E., Mans D.A., Hikida A., Eckert M., Knutzen D., et al. (2008) CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. *Am. J. Hum. Genet.*, **83**, 559-571.
- Graham F.L.**, Smiley J., Russell W.C. & Nairn R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.*, **36**, 59-74.

- Gu S.**, Kumaramanickavel G., Srikumari C.R., Denton M.J. & Gal A. (1999) Autosomal recessive retinitis pigmentosa locus RP28 maps between D2S1337 and D2S286 on chromosome 2p11-p15 in an Indian family. *J. Med. Genet.*, **36**, 705-707.
- Guarguaglini G.**, Duncan P.I., Stierhof Y.D., Holmström T., Duensing S. & Nigg E.A. (2005) The forkhead-associated domain protein Cep170 interacts with Polo-like kinase 1 and serves as a marker for mature centrioles. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 1095-1107.
- Guo L.W. & Ruoho A.E.** (2008) The retinal cGMP phosphodiesterase gamma-subunit - a chameleon. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **9**, 611-625.
- Hashimoto G.**, Aoki T., Nakamura H., Tanzawa K. & Okada Y. (2001) Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett.*, **494**, 192-195.
- Henson J.H.**, Cole D.G., Terasaki M., Rashid D. & Scholey J.M. (1995) Immunolocalization of the heterotrimeric kinesin-related protein KRP(85/95) in the mitotic apparatus of sea urchin embryos. *Dev. Biol.*, **171**, 182-194.
- Hirokawa N.** (2011) From electron microscopy to molecular cell biology, molecular genetics and structural biology: intracellular transport and kinesin superfamily proteins, KIFs: genes, structure, dynamics and functions. *J. Electron Microsc. (Tokyo)*, **60**, S63-S92.
- Hong D.H.**, Pawlyk B., Sokolov M., Strissel K.J., Yang J., Tulloch B., Wright A.F., Arshavsky V.Y. & Li T. (2003) RPGR isoforms in photoreceptor connecting cilia and the transitional zone of motile cilia. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 2413-2421.
- Horst C.J.**, Johnson L.V. & Besharse J.C. (1990) Transmembrane assemblage of the photoreceptor connecting cilium and motile cilium transition zone contain a common immunologic epitope. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **17**, 329-344.
- Hsu C.C.**, Moncaleano J.D. & Wagner O.I. (2011) Sub-cellular distribution of UNC-104(KIF1A) upon binding to adaptors as UNC-16(JIP3), DNC-1(DCTN1/Glued) and SYD-2(Liprin- $\alpha$ ) in *C. elegans* neurons. *Neuroscience*, **176**, 39-52.
- Hu Q. & Nelson W.J.** (2011) Ciliary diffusion barrier: the gatekeeper for the primary cilium compartment. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **68**, 313-324.
- Hubbert C.**, Guardiola A., Shao R., Kawaguchi Y., Ito A., Nixon A., Yoshida M., Wang X.F. & Yao T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.
- Insinna C. & Besharse J.C.** (2008) Intraflagellar transport and the sensory outer segment of vertebrate photoreceptors. *Dev. Dyn.*, **237**, 1982-1992.
- Insinna C.**, Humby M., Sedmak T., Wolfrum U. & Besharse J.C. (2009) Different roles for KIF17 and kinesin II in photoreceptor development and maintenance. *Dev. Dyn.*, **238**, 2211-2222.
- Ishikawa H. & Marshall W.F.** (2011) Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 222-234.
- Ito M.**, Yoshioka K., Akechi M., Yamashita S., Takamatsu N., Sugiyama K., Hibi M., Nakabeppu Y., Shiba T. & Yamamoto K.I. (1999) JSAP1, a novel jun N-terminal protein kinase (JNK)-binding protein that functions as a Scaffold factor in the JNK signaling pathway. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 7539-7548.
- Jacobson S.G.**, Cideciyan A.V., Bennett J., Kingsley R.M., Sheffield V.C. & Stone E.M. (2002) Novel mutation in the TIMP3 gene causes Sorsby fundus dystrophy. *Arch. Ophthalmol.*, **120**, 376-379.
- Jacobson S.G.**, Cideciyan A.V., Regunath G., Rodriguez F.J., Vandenburg K., Sheffield V.C. & Stone E.M. (1995) Night blindness in Sorsby's fundus dystrophy reversed by vitamin A. *Nat. Genet.*, **11**, 27-32.
- Jakobsen L.**, Vanselow K., Skogs M., Toyoda Y., Lundberg E., Poser I., Falkenby L.G., Bennetzen M., Westendorf J., Nigg E.A., et al. (2011) Novel asymmetrically localizing components of human centrosomes identified by complementary proteomics methods.

- Janke C. & Bulinski J.C.** (2011) Post-translational regulation of the microtubule cytoskeleton: mechanisms and functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **12**, 773-786.
- Janssen A.** (2008) Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der beiden Makulopathien Sorsby Fundusdystrophie und X-gebundene juvenile Retinoschisis. Dissertation am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg.
- Janssen A.,** Hoellenriegel J., Fogarasi M., Schrewe H., Seeliger M., Tamm E., Ohlmann A., May C.A., Weber B.H. & Stöhr H. (2008) Abnormal vessel formation in the choroid of mice lacking tissue inhibitor of metalloprotease-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **49**, 2812-2822.
- Jimeno D.,** Feiner L., Lillo C., Teofilo K., Goldstein L.S., Pierce E.A. & Williams D.S. (2006b) Analysis of kinesin-2 function in photoreceptor cells using synchronous Cre-loxP knockout of Kif3a with RHO-Cre. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **47**, 5039-5046.
- Jimeno D.,** Lillo C., Roberts E.A., Goldstein L.S. & Williams D.S. (2006a) Kinesin-2 and photoreceptor cell death: requirement of motor subunits. *Exp. Eye Res.*, **82**, 351-353.
- Joshi H.C.,** Palacios M.J., McNamara L. & Cleveland D.W. (1992) Gamma-tubulin is a centrosomal protein required for cell cycle-dependent microtubule nucleation. *Nature*, **356**, 80-83.
- Kalmus H. & Seedburgh D.** (1976) Probable common origin of a hereditary fundus dystrophy (Sorsby's familial pseudoinflammatory macular dystrophy) in an English and Australian family. *J Med Genet*, **13**, 271-276.
- Kamei M. & Hollyfield J.G.** (1999) TIMP-3 in Bruch's membrane: changes during aging and in age-related macular denegeration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **40**, 2367-2375.
- Kang K.H.,** Park S.Y., Rho S.B. & Lee J.H. (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc. Res.*, **79**, 150-160.
- Kapphahn R.J.,** Bigelow E.J & Ferrington D.A. (2007) Age-dependent inhibition of proteasome chymotrypsin-like activity in the retina. *Exp. Eye Res.*, **84**, 646-654.
- Katoh K.,** Kuma K., Toh H. & Miyata T. (2005) MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Res.*, **33**, 511-518.
- Kelkar N.,** Gupta S., Dickens M. & Davis R.J. (2000) Interaction of a mitogen-activated protein kinase signaling module with the neuronal protein JIP3. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 1030-1043.
- Kim J.C.,** Badano J.L., Sibold S., Esmail M.A., Hill J., Hoskins B.E., Leitch C.C., Venner K., Ansley S.J., Ross A.J., et al. (2004) The Bardet-Biedl protein BBS4 targets cargo to the pericentriolar region and is required for microtubule anchoring and cell cycle progression. *Nat. Genet.*, **36**, 462-470.
- Kim M.H.,** Cierpicki T., Derewenda U., Krowarsch D., Feng Y., Devedjiev Y., Dauter Z., Walsh C.A., Otlewski J., Bushweller J.H. & Derewenda Z.S. (2003) The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 324-333.
- Kolb H.,** Nelson R., Fernandez E. & Jones B. (2011) Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet].
- Kondo S.,** Sato-Yoshitake R., Noda Y., Aizawa H., Nakata T., Matsuura Y. & Hirokawa N. (1994) KIF3A is a new microtubule-based anterograde motor in the nerve axon. *J. Cell Biol.*, **125**, 1095-1107.
- Koushika S.P.** (2008) "JIP"ing along the axon: the complex roles of JIPs in axonal transport. *Bioessays*, **30**, 10-14.
- Kozminski K.G.,** Beech P.L. & Rosenbaum J.L. (1995) The Chlamydomonas kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.*, **131**, 1517-1527.
- Kremer B.E.,** Haystead T. & Macara I.G. (2005) Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol. Biol. Cell*, **16**, 4648-4659.

- Kuh G.F.**, Stockmann M., Meyer-Ohlendorf M., Linta L., Proepper C., Ludolph A.C., Bockmann J., Boeckers T.M. & Liebau S. (2012) Tubulin-binding cofactor B is a direct interaction partner of the dynactin subunit p150(Glued). *Cell Tissue Res.*, **350**, 13-26.
- Kumar A.**, Shetty J., Kumar B. & Blanton S.H. (2004) Confirmation of linkage and refinement of the RP28 locus for autosomal recessive retinitis pigmentosa on chromosome 2p14-p15 in an Indian family. *Mol. Vis.*, **10**, 399-402.
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Langmann T.**, Di Gioia S.A., Rau I., Stöhr H., Maksimovic N.S., Corbo J.C., Renner A.B., Zrenner E., Kumaramanickavel G., Karlstetter M. et al. (2010) Nonsense mutations in FAM161A cause RP28-associated recessive retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet.*, **87**, 376-381.
- Langton K.P.**, Barker M.D. & McKie N. (1998) Localization of the functional domains of human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 and the effects of a Sorsby's fundus dystrophy mutation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 16778-16781.
- Langton K.P.**, McKie N., Curtis A., Goodship J.A., Bond P.M., Barker M.D. & Clarke M. (2000) A novel tissue inhibitor of metalloproteinases-3 mutation reveals a common molecular phenotype in Sorsby's fundus dystrophy. *J. Biol. Chem.*, **275**, 27027-27031.
- Langton K.P.**, McKie N., Smith B.M., Brown N.J. & Barker M.D. Sorsby's fundus dystrophy mutations impair turnover of TIMP-3 by retinal pigment epithelial cells. (2005) *Hum. Mol. Genet.*, **14**, 3579-3586.
- Leco K.J.**, Waterhouse P., Sanchez O.H., Gowing K.L., Poole A.R., Wakeham A., Mak T.W. and Khokha R. (2001) Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J. Clin. Invest.*, **108**, 817-829.
- Lee J.R.**, Shin H., Choi J., Ko J., Kim S., Lee H.W., Kim K., Rho S.H., Lee J.H., Song H.E., et al. (2004) An intramolecular interaction between the FHA domain and a coiled coil negatively regulates the kinesin motor KIF1A. *EMBO J.*, **23**, 1506-1515.
- Lee M.H.**, Atkinson S. & Murphy G. (2007) Identification of the extracellular matrix (ECM) binding motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and effective transfer to TIMP-1. *J. Biol. Chem.*, **282**, 6887-6898.
- Lewis S.A.**, Wang D.H. & Cowan N.J. (1988) Microtubule-associated protein MAP2 shares a microtubule binding motif with tau protein. *Science*, **242**, 936-939.
- L'Hernault S.W. & Rosenbaum J.L.** (1983) Chlamydomonas alpha-tubulin is post-translationally modified in the flagella during flagellar assembly. *J. Cell Biol.*, **97**, 258-263.
- Lin R.J.**, Blumenkranz M.S., Binkley J., Wu K. & Vollrath D. (2006) A novel His158Arg mutation in TIMP3 causes a late-onset form of Sorsby fundus dystrophy. *Am. J. Ophthalmol.*, **142**, 839-848.
- Lin Y.**, Jones B.W., Liu A., Vazquez-Chona F.R., Lauritzen J.S., Ferrell W.D. & Marc R.E. (2012) Rapid glutamate receptor 2 trafficking during retinal degeneration. *Mol. Neurodegener.*, **7**, 7.
- Lin-Jones J.**, Parker E., Wu M., Knox B.E. & Burnside B. (2003) Disruption of kinesin II function using a dominant negative-acting transgene in *Xenopus laevis* rods results in photoreceptor degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **44**, 3614-3621.
- Liu Q.**, Tan G., Levenkova N., Li T., Pugh E.N. Jr, Rux J.J., Speicher D.W. & Pierce E.A. (2007) The proteome of the mouse photoreceptor sensory cilium complex. *Mol. Cell Proteomics*, **6**, 1299-1317.
- Liu Q.**, Zuo J. & Pierce E.A. (2004) The retinitis pigmentosa 1 protein is a photoreceptor microtubule-associated protein. *J. Neurosci.*, **24**, 6427-6436.
- Lloyd T.E.**, Machamer J., O'Hara K., Kim J.H., Collins S.E., Wong M.Y., Sahin B., Imlach W., Yang Y., Levitan E.S., et al. (2012) The p150(Glued) CAP-Gly domain regulates initiation of retrograde transport at synaptic termini. *Neuron*, **74**, 344-360.

- Lo K.Y.**, Kuzmin A., Unger S.M., Petersen J.D. & Silverman M.A. (2011) KIF1A is the primary anterograde motor protein required for the axonal transport of dense-core vesicles in cultured hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, **491**, 168-173.
- Loechel F.**, Fox J.W., Murphy G., Albrechtsen R. & Wewer U.M. (2000) ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **278**, 511-515.
- Loktev A.V.**, Zhang Q., Beck J.S., Searby C.C., Scheetz T.E., Bazan J.F., Slusarski D.C., Sheffield V.C., Jackson P.K., Nachury M.V. (2008) A BBSome subunit links ciliogenesis, microtubule stability, and acetylation. *Dev. Cell*, **15**, 854-865.
- Lopes V.S.**, Jimeno D., Khanobdee K., Song X., Chen B., Nusinowitz S. & Williams D.S. (2010) Dysfunction of heterotrimeric kinesin-2 in rod photoreceptor cells and the role of opsin mislocalization in rapid cell death. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 4076-4088.
- Mahmoodi M.**, Sahebjam S., Smookler D., Khokha R. & Mort J.S. (2005) Lack of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 results in an enhanced inflammatory response in antigen-induced arthritis. *Am. J. Pathol.*, **166**, 1733-1740.
- Majid M.A.**, Smith V.A., Easty D.L., Baker A.H. & Newby A.C. (2002) Adenovirus mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces death in retinal pigment epithelial cells. *Br. J. Ophthalmol.*, **86**, 97-101.
- Majid M.A.**, Smith V.A., Matthews F.J., Newby A.C. & Dick A.D. (2006) Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 differentially binds to components of Bruch's membrane. *Br. J. Ophthalmol.*, **90**, 1310-1315.
- Majid M.A.**, Smith V.A., Newby A.C. & Dick A.D. (2007) Matrix bound SFD mutant TIMP-3 is more stable than wild type TIMP-3. *Br. J. Ophthalmol.*, **91**, 1073-1076.
- Malemud C.J.** (2006) Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview. *Front. Biosci.*, **11**, 1696-1701.
- Malicki J. & Besharse J.C.** (2012) Kinesin-2 family motors in the unusual photoreceptor cilium. *Vision Res.*, **75**, 33-36.
- Marszalek J.R.**, Liu X., Roberts E.A., Chui D., Marth J.D., Williams D.S. & Goldstein L.S. (2000) Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin-II in mammalian photoreceptors. *Cell*, **102**, 175-187.
- Marszalek J.R.**, Ruiz-Lozano P., Roberts E., Chien K.R. & Goldstein L.S. (1999a) Situs inversus and embryonic ciliary morphogenesis defects in mouse mutants lacking the KIF3A subunit of kinesin-II. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, **96**, 5043-5048.
- Marszalek J.R.**, Weiner J.A., Farlow S.J., Chun J. & Goldstein L.S. (1999b) Novel dendritic kinesin sorting identified by different process targeting of two related kinesins: KIF21A and KIF21B. *J. Cell Biol.*, **145**, 469-479.
- Masland R.H.** (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci.*, **4**, 877-886.
- Matsuyama A.**, Shimazu T., Sumida Y., Saito A., Yoshimatsu Y., Seigneurin-Berny D., Osada H., Komatsu Y., Nishino N., Khochbin S., et al. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.*, **21**, 6820-6831.
- Mavlyutov T.A.**, Cai Y. & Ferreira P.A. (2002) Identification of RanBP2- and kinesin-mediated transport pathways with restricted neuronal and subcellular localization. *Traffic*, **3**, 630-640.
- Mohammed F.F.**, Smookler D.S., Taylor S.E., Fingleton B., Kassiri Z., Sanchez O.H., English J.L., Matrisian L.M., Au B., Yeh W.C. & Khokha R. (2004) Abnormal TNF activity in Timp3<sup>-/-</sup> mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. *Nat. Genet.*, **36**, 969-977.
- Momotani K.**, Khromov A.S., Miyake T., Stukenberg P.T. & Somlyo A.V. (2008) Cep57, a multidomain protein with unique microtubule and centrosomal localization domains. *Biochem. J.*, **412**, 265-273.



- Morris R.L. & Scholey J.M.** (1997) Heterotrimeric kinesin-II is required for the assembly of motile 9+2 ciliary axonemes on sea urchin embryos. *J. Cell Biol.*, **138**, 1009-1022.
- Moser J.J., Fritzler M.J., Ou Y. & Rattner J.B.** (2010) The PCM-basal body/primary cilium coalition. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **21**, 148-155.
- Muresan V., Abramson T., Lyass A., Winter D., Porro E., Hong F., Chamberlin N.L. & Schnapp B.J.** (1998) KIF3C and KIF3A form a novel neuronal heteromeric kinesin that associates with membrane vesicles. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 637-652.
- Muresan V., Bendala-Tufanisco E., Hollander B.A. & Besharse J.C.** (1997) Evidence for kinesin-related proteins associated with the axoneme of retinal photoreceptors. *Exp. Eye Res.*, **64**, 895-903.
- Muresan V., Joshi H.C. & Besharse J.C.** (1993) Gamma-tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia. *J. Cell Sci.*, **104**, 1229-1237.
- Muresan V., Lyass A. & Schnapp B.J.** (1999) The kinesin motor KIF3A is a component of the presynaptic ribbon in vertebrate photoreceptors. *J. Neurosci.*, **19**, 1027-1037.
- Murphy G., Willenbrock F., Crabbe T., O'Shea M., Ward R., Atkinson S., O'Connell J. & Docherty A.** (1994) Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **732**, 31-41.
- Nonaka S., Tanaka Y., Okada Y., Takeda S., Harada A., Kanai Y., Kido M. & Hirokawa N.** (1998) Randomization of left-right asymmetry due to loss of nodal cilia generating leftward flow of extraembryonic fluid in mice lacking KIF3B motor protein. *Cell*, **95**, 829-837.
- North B.J., Marshall B.L., Borra M.T., Denu J.M. & Verdin E.** (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol. Cell*, **11**, 437-444.
- Okabe S., Shiomura Y. & Hirokawa N.** (1989) Immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins 1A and 2 in the rat retina. *Brain Res.*, **483**, 335-346.
- Okada Y., Yamazaki H., Sekine-Aizawa Y. & Hirokawa N.** (1995) The neuron-specific kinesin superfamily protein KIF1A is a unique monomeric motor for anterograde axonal transport of synaptic vesicle precursors. *Cell*, **81**, 769-780.
- Omori Y., Chaya T., Katoh K., Kajimura N., Sato S., Muraoka K., Ueno S., Koyasu T., Kondo M. & Furukawa T.** (2010) Negative regulation of ciliary length by ciliary male germ cell-associated kinase (Mak) is required for retinal photoreceptor survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 22671-22676.
- Ovádi J. & Orosz F.** (2009) An unstructured protein with destructive potential: TPPP/p25 in neurodegeneration. *Bioessays*, **31**, 676-686.
- Pedersen L.B. & Rosenbaum J.L.** (2008) Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.*, **85**, 23-61.
- Perez M., Santa-Maria I., Gomez de Barreda E., Zhu X., Cuadros R., Cabrero J.R., Sanchez-Madrid F., Dawson H.N., Vitek M.P., Perry G., et al.** (2009) Tau--an inhibitor of deacetylase HDAC6 function. *J. Neurochem.*, **109**, 1756-1766.
- Piperno G. & Fuller M.T.** (1985) Monoclonal antibodies specific for an acetylated form of alpha-tubulin recognize the antigen in cilia and flagella from a variety of organisms. *J. Cell Biol.*, **101**, 2085-2094.
- Piperno G., LeDizet M. & Chang X.J.** (1987) Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell Biol.*, **104**, 289-302.
- Qi J.H., Dai G., Luthert P., Chaurasia S., Hollyfield J., Weber B.H., Stöhr H. & Anand-Apte B.** (2009) S156C mutation in tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces increased angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, **284**, 19927-19936.

- Qi J.H.**, Ebrahim Q., Moore N., Murphy G., Claesson-Welsh L., Bond M., Baker A. & Anand-Apte B. (2003) A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. *Nat. Med.*, **9**, 407-415.
- Quintyne N.J.**, Gill S.R., Eckley D.M., Crego C.L., Compton D.A. & Schroer T.A. (1999) Dynactin is required for microtubule anchoring at centrosomes. *J. Cell Biol.*, **147**, 321-334.
- Reed N.A.**, Cai D., Blasius T.L., Jih G.T., Meyhofer E., Gaertig J. & Verhey K.J. (2006) Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr. Biol.*, **16**, 2166-2172.
- Reiter J.F.**, Blacque O.E. & Leroux M.R. (2012) The base of the cilium: roles for transition fibres and the transition zone in ciliary formation, maintenance and compartmentalization. *EMBO Rep.*, **13**, 608-618.
- Reynolds C.H.**, Utton M.A., Gibb G.M., Yates A. & Anderton B.H. (1997) Stress-activated protein kinase/c-jun N-terminal kinase phosphorylates tau protein. *J. Neurochem.*, **68**, 1736-1744.
- Rio Frio T.**, Panek S., Iseli C., Di Gioia S.A., Kumar A., Gal A. & Rivolta C. (2009) Ultra high throughput sequencing excludes MDH1 as candidate gene for RP28-linked retinitis pigmentosa. *Mol. Vis.*, **15**, 2627-2633.
- Rosenbaum J.L.**, Cole D.G. & Diener D.R. (1999) Intraflagellar transport: the eyes have it. *J. Cell Biol.*, **144**, 385-388.
- Rosenbaum J.L. & Witman G.B.** (2002) Intraflagellar transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 813-825.
- Sahel J.**, Bonnel S., Mrejen S. & Paques M. (2010) Retinitis pigmentosa and other dystrophies. *Dev. Ophthalmol.*, **47**, 160-167.
- Saihan Z.**, Li Z., Rice J., Rana N.A., Ramsden S., Schlottmann P.G., Jenkins S.A., Blyth C., Black G.C., McKie N. & Webster A.R. (2009) Clinical and biochemical effects of the E139K missense mutation in the TIMP3 gene, associated with Sorsby fundus dystrophy. *Mol. Vis.*, **15**, 1218-1230.
- Sandoval I.V. & Vandekerckhove J.S.** (1981) A comparative study of the in vitro polymerization of tubulin in the presence of the microtubule-associated proteins MAP2 and tau. *J. Biol. Chem.*, **256**, 8795-8800.
- Schoenberger S.D. & Agarwal A.** (2012) A novel mutation at the N-terminal domain of the TIMP3 gene in Sorsby fundus dystrophy. *Retina*, (Epub ahead of print).
- Scholey J.M.** (1996) Kinesin-II, a membrane traffic motor in axons, axonemes, and spindles. *J. Cell Biol.*, **133**, 1-4.
- Scholey J.M.** (2008) Intraflagellar transport motors in cilia: moving along the cell's antenna. *J. Cell Biol.*, **180**, 23-29.
- Schroer T.A.** (2004) Dynactin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **20**, 759-779.
- Sedmak T. & Wolfrum U.** (2010) Intraflagellar transport molecules in ciliary and nonciliary cells of the retina. *J. Cell Biol.*, **189**, 171-186.
- Shida T.**, Cueva J.G., Xu Z., Goodman M.B. & Nachury M.V. (2010) The major alpha-tubulin K40 acetyltransferase alphaTAT1 promotes rapid ciliogenesis and efficient mechanosensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **107**, 21517-21522.
- Soboleva G.**, Geis B., Schrewe H. & Weber B.H. (2003) Sorsby fundus dystrophy mutation Timp3(S156C) affects the morphological and biochemical phenotype but not metalloproteinase homeostasis. *J. Cell Physiol.*, **197**, 149-156.
- Sorsby A. & Mason M.E.** (1949) A fundus dystrophy with unusual features. *Br. J. Ophthalmol.*, **33**, 67-97.
- Sparrow J.R.**, Hicks D. & Hamel C.P. (2010) The retinal pigment epithelium in health and disease. *Curr. Mol. Med.*, **10**, 802-823.
- Strauss O.** (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol. Rev.*, **85**, 845-881.

- Studier F.W. & Moffatt B.A.** (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**, 113-130.
- Sun F., Zhu C., Dixit R. & Cavalli V.** (2011) Sunday Driver/JIP3 binds kinesin heavy chain directly and enhances its motility. *EMBO J.*, **30**, 3416-3429.
- Sundaram V., Moore A.T., Ali R.R. & Bainbridge J.W.** (2012) Retinal dystrophies and gene therapy. *Eur. J. Pediatr.*, **171**, 757-765.
- Tabata Y., Isashiki Y., Kamimura K., Nakao K. & Ohba N.** (1998) A novel splice site mutation in the tissue inhibitor of the metalloproteinases-3 gene in Sorsby's fundus dystrophy with unusual clinical features. *Hum. Genet.*, **103**, 179-182.
- Takeda S., Yonekawa Y., Tanaka Y., Okada Y., Nonaka S. & Hirokawa N.** (1999) Left-right asymmetry and kinesin superfamily protein KIF3A: new insights in determination of laterality and mesoderm induction by kif3A<sup>-/-</sup> mice analysis. *J. Cell Biol.*, **145**, 825-836.
- Takemura R., Okabe S., Umeyama T., Kanai Y., Cowan N.J. & Hirokawa N.** (1992) Increased microtubule stability and alpha tubulin acetylation in cells transfected with microtubule-associated proteins MAP1B, MAP2 or tau. *J. Cell Sci.*, **103**, 953-964.
- Tanaka K., Mizushima T. & Saeki Y.** (2012) The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol. Chem.*, **393**, 217-234.
- Tokési N., Lehotzky A., Horváth I., Szabó B., Oláh J., Lau P. & Ovádi J.** TPPP/p25 promotes tubulin acetylation by inhibiting histone deacetylase 6. *J. Biol. Chem.*, **285**, 17896-17906.
- tom Dieck S., Altrock W.D., Kessels M.M., Qualmann B., Regus H., Brauner D., Fejtová A., Bracko O., Gundelfinger E.D. & Brandstätter J.H.** (2005) Molecular dissection of the photoreceptor ribbon synapse: physical interaction of Bassoon and RIBEYE is essential for the assembly of the ribbon complex. *J. Cell Biol.*, **168**, 825-836.
- Towbin H., Staehelin T. & Gordon J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **76**, 4350-4354.
- Trivedi D., Colin E., Louie C.M. & Williams D.S.** (2012) Live-cell imaging evidence for the ciliary transport of rod photoreceptor opsin by heterotrimeric kinesin-2. *J. Neurosci.*, **32**, 10587-10593.
- Trojan P., Krauss N., Choe H.W., Giessl A., Pulvermüller A. & Wolfrum U.** (2008) Centrins in retinal photoreceptor cells: regulators in the connecting cilium. *Prog. Retin. Eye Res.*, **27**, 237-259.
- Umkehrer C.** (2012) Untersuchungen zur Funktion des Retinitis Pigmentosa Proteins FAM161A. Bachelorarbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg.
- Vale R.D.** (2003) The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell*, **112**, 467-480.
- Vashishtha M., Walther Z. & Hall J.L.** (1996) The kinesin-homologous protein encoded by the Chlamydomonas FLA10 gene is associated with basal bodies and centrioles. *J. Cell Sci.*, **109**, 541-549.
- Verhey K.J., Dishinger J. & Kee H.L.** (2011) Kinesin motors and primary cilia. *Biochem. Soc. Trans.*, **39**, 1120-1125.
- Verhey K.J., Meyer D., Deehan R., Blenis J., Schnapp B.J., Rapoport T.A. & Margolis B.** (2001) Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. *J. Cell Biol.*, **152**, 959-970.
- Weber B.H., Lin B., White K., Kohler K., Soboleva G., Herterich S., Seeliger M.W., Jaissle G.B., Grimm C., Reme C., et al.** (2002) A mouse model for Sorsby fundus dystrophy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **43**, 2732-2740.
- Weber B.H., Vogt G., Pruett R.C., Stöhr H. & Felbor U.** (1994) Mutations in the tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3) in patients with Sorsby's fundus dystrophy. *Nat. Genet.*, **8**, 352-356.

- Wersinger C. & Sidhu A.** (2005) Disruption of the interaction of alpha-synuclein with microtubules enhances cell surface recruitment of the dopamine transporter. *Biochemistry*, **44**, 13612-13624.
- Whitehead J.L., Wang S.Y., Bost-Usinger L., Hoang E., Frazer K.A. & Burnside B.** (1999) Photoreceptor localization of the KIF3A and KIF3B subunits of the heterotrimeric microtubule motor kinesin II in vertebrate retina. *Exp. Eye Res.*, **69**, 491-503.
- Willenbrock F. & Murphy G.** (1994) Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **150**, S165-S170.
- Williamson R.A., Marston F.A., Angal S., Koklitis P., Panico M., Morris H.R., Carne A.F., Smith B.J., Harris T.J. & Freedman R.B.** (1990) Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J.*, **268**, 267-274.
- Yamada E.** (1969) Some structural features of the fovea centralis in the human retina. *Arch. Ophthalmol.*, **82**, 151-159.
- Yamazaki H., Nakata T., Okada Y. & Hirokawa N.** (1995) KIF3A/B: a heterodimeric kinesin superfamily protein that works as a microtubule plus end-directed motor for membrane organelle transport. *J. Cell Biol.*, **130**, 1387-1399.
- Yeow K.M., Kishnani N.S., Hutton M., Hawkes S.P., Murphy G. & Edwards D.R.** (2002) Sorsby's fundus dystrophy tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) mutants have unimpaired matrix metalloproteinase inhibitory activities, but affect cell adhesion to the extracellular matrix. *Matrix Biol.*, **21**, 75-88.
- Yonekawa Y., Harada A., Okada Y., Funakoshi T., Kanai Y., Takei Y., Terada S., Noda T. & Hirokawa N.** (1998) Defect in synaptic vesicle precursor transport and neuronal cell death in KIF1A motor protein-deficient mice. *J. Cell Biol.*, **141**, 431-441.
- Young J.M., Cheadle C., Foulke J.S. Jr., Drohan W.N. & Sarver N.** (1988) Utilization of an Epstein-Barr virus replicon as a eukaryotic expression vector. *Gene*, **62**, 171-185.
- Yu W.H., Yu S., Meng Q., Brew K. & Woessner J.F. Jr.** (2000) TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *J. Biol. Chem.*, **275**, 31226-31232.
- Zach F., Grassmann F., Langmann T., Soroush N., Wolfrum U. & Stöhr H.** (2012) The retinitis pigmentosa 28 protein FAM161A is a novel ciliary protein involved in intermolecular protein interaction and microtubule association. *Hum. Mol. Genet.*, **21**, 4573-4586.
- Zhao H., Bernardo M.M., Osenkowski P., Sohail A., Pei D., Nagase H., Kashiwagi M., Soloway P.D., DeClerck Y.A. & Fridman R.** (2004) Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.*, **279**, 8592-8601.
- Zhao C., Omori Y., Brodowska K., Kovach P. & Malicki J.** (2012) Kinesin-2 family in vertebrate ciliogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **109**, 2388-2393.
- Zobor D. & Zrenner E.** (2012) Retinitis pigmentosa - a review. Pathogenesis, guidelines for diagnostics and perspectives. *Ophthalmologie*, **109**, 501-514.

## 9 Anhang

### 9.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
A	Adenosin
AB	<i>Applied Biosystems</i>
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a disintegrine and metalloproteinase</i>
ADAMTS	<i>ADAM with thrombospondin motifs</i>
adRP	<i>autosomal dominant RP</i>
AGTR2	<i>angiotensin II receptor type 2</i>
AMD	altersabhängige Makuladegeneration
APS	Ammoniumpersulfat
arRP	<i>autosomal recessive RP</i>
BB	<i>basal body</i>
BBS	Bardet Biedl Syndrom
BM	Bruchsche Membran
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
c	Chromosom
ca.	circa
CC	<i>connecting cilium</i>
cDNA	<i>complementary DANN</i>
CEP290	<i>centrosomal protein 290 kDa</i>
ChIP-Seq	<i>chromatin immunoprecipitation-sequencing</i>
cM	Centimorgan
cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CRX	<i>cone-rod homeobox</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol
dd	<i>dideoxy</i>
del	Deletion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether-) N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>enzym linked immunosorbent assay</i>
ERG	Elektroretinogramm
EZM	extrazelluläre Matrix
F	<i>forward</i>
FAM161	<i>family with sequence similarity 161</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
fs	<i>frameshift</i>
G	Guanosin
g	Gramm, Erdbeschleunigung
GCL	<i>ganglion cell layer</i>
GST	Glutathion-S-Transferase

Abkürzung	Bedeutung
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDAC6	Histondeacetylase 6
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hz	Hertz
IHC	Immunhistochemie
ICC	Immunzytochemie
IFT	intraflagellarer Transport
ILM	<i>inner limiting membrane</i>
INL	<i>inner nuclear layer</i>
IP	Immunpräzipitation
IPL	<i>inner plexiform layer</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
IS	<i>inner segments</i>
JBTS	Joubert-Syndrom
kDa	Kilodalton
KI	Knockin, Komplexinhibitor
KIF	<i>kinesin family</i>
KO	Knockout
l	Liter
LB	Luria-Bertani
LCA	<i>Leber congenital amaurosis</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK8IP3	<i>mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3</i>
Mb	Megabasen
MBP	Maltosebindeprotein
MBq	Megabecquerel
mCi	Millicurie
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MT	Mikrotubuli
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NPHP	Nephronophthise
NRL	<i>neural retina leucine zipper</i>
OCT	<i>optical coherence tomography</i>
OD	optische Dichte
OLM	<i>outer limiting membrane</i>
ONL	<i>outer nuclear layer</i>
OPL	<i>outer plexiform layer</i>
OS	<i>outer segments</i>
p	Protein, Chromosomenregion
p.a.	<i>per analysis</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglycol
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
PIPES	Piperazin-1,4-bis-(2-ethansulfonsäure)
PK1	<i>porcine kidney 1</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid

Abkürzung	Bedeutung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative real time RT-PCR
R	<i>reverse</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RP	Retinitis Pigmentosa
RPE	retinales Pigmentepithel
RT	Reverse Transkription, Raumtemperatur, <i>real time</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
sek	Sekunde
SFD	Sorsby Fundusdystrophie
SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TACC3	<i>transforming acidic coiled-coil</i>
TACE	<i>TNF-<math>\alpha</math>-cleaving enzyme</i>
Taq	<i>thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSC2	<i>tuberous sclerosis complex 2</i>
U	<i>units</i>
u.a.	unter anderem
UHTs	<i>ultra high throughput sequencing</i>
ü.N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR2	VEGF Rezeptor-2
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsprozent)
WB	Western Blot
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
XIRP	<i>X-linked Retinitis Pigmentosa</i>
z.B.	zum Beispiel

Tab. 49: Häufig verwendete Abkürzungen.

## 9.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Schematische Darstellung des menschlichen Auges und Übersicht der Zusammensetzung und des Aufbaus der retinalen Schichten .....	1
Abb. 2:	Stäbchen- und Zapfendichte der Fovea centralis .....	3
Abb. 3:	Kontaktbereich zwischen Photorezeptor- und RPE-Zellschicht .....	4
Abb. 4:	Schematische Darstellung des Photorezeptorziliums und des intraflagellaren Transports in primären Zilien.....	6
Abb. 5:	Lokalisierung von mFAM161A in PFA-fixierten murinen Retinaschnitten.....	17
Abb. 6:	Lokalisierung von FAM161A in murinen und humanen Retinaschnitten .....	18
Abb. 7:	Sub-zelluläre FAM161A-Lokalisation in murinen Retinaschnitten im Vergleich zu verschiedenen Markerproteinen .....	19
Abb. 8:	Immunelektronenmikroskopische FAM161A-Lokalisierung in retinalen Photorezeptorzellen .....	20
Abb. 9:	Bandenmuster der verwendeten Molekularmassenstandards.....	28
Abb. 10:	Genotypisierung von <i>Timp3</i> -KI-Mäusen und -Fibroblasten .....	49
Abb. 11:	Relative <i>Timp3</i> -Expression in Zellen aus Wildtyp- und S156C-TIMP3-Mäusen.....	69
Abb. 12:	Elektronenmikroskopische Analysen des BM/RPE-Bereichs von wildtypischen und <i>Timp3-S156C</i> -Knockin-Mäusen.....	70
Abb. 13:	Proteasomaktivitätstests mit Zelllysaten aus Fibroblasten- und RPE-Zelllinien .....	73
Abb. 14:	<i>De novo</i> EZM-Produktion von Fibroblasten- und RPE-Zellen.....	74
Abb. 15:	Wechselwirkungen von endogenem TIMP3 mit Komponenten der EZM in Fibroblasten.....	76
Abb. 16:	Quantifizierung von Matrix-gebundenem TIMP3 in Fibroblasten-EZMs nach Trypsinverdau .....	78
Abb. 17:	Wechselwirkungen von überexprimierten TIMP3-Varianten mit EZM-Komponenten von HEK293-EBNA-Zellen .....	80
Abb. 18:	Quantifizierung von Matrix-gebundenem TIMP3 in transient mit verschiedenen TIMP3-Varianten transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.....	81
Abb. 19:	Trypsinverdau der EZMs von HEK293-EBNA-Zellen nach Überexpression mit TIMP3-6xHis-Konstrukten.....	82
Abb. 20:	Erkennungsbereiche der verschiedenen anti-FAM161A-Antikörper.....	84
Abb. 21:	Expression und Aufreinigung der FAM161A-Fusionsproteine zur Antikörperproduktion und -aufreinigung .....	84
Abb. 22:	Charakterisierung der durch die Immunisierung von Kaninchen erhaltenen Antikörperseren .....	85
Abb. 23:	Spezifität des Antikörperserums mFAM161A nach Affinitätschromatographischer Aufreinigung .....	86
Abb. 24:	Lokalisierung und Effekte von überexprimiertem FAM161A in COS-7-Zellen .....	87
Abb. 25:	Immunfluoreszenzlokalisierung von FAM161A in COS-7-Zellen nach Nocodazolbehandlung.....	88
Abb. 26:	Quantifizierung des Acetylierungslevels von pCEP4.1-1D4- bzw. pCEP4.1-FAM161A-1D4-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen.....	88
Abb. 27:	Experimente zur Untersuchung einer möglichen Interaktion der Proteine FAM161A und HDAC6.....	89
Abb. 28:	Überexpression von FAM161A-1D4 in LLC-PK1-Zellen .....	90
Abb. 29:	„Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit Positiv- und Negativkontrollen .....	91
Abb. 30:	„Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit Lysaten von FAM161A-1D4-transfizierten HEK293-EBNA-Zellen .....	91
Abb. 31:	„Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit den GST-Fusionsproteinen mFAM161A_226-644 und mFAM161A_226-700.....	92
Abb. 32:	„Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit den GST-Fusionsproteinen hFAM161A_1-229, hFAM161A_230-543 und hFAM161A_230-660 .....	93
Abb. 33:	Verbesserter „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assay“ mit dem GST-Fusionsprotein mFAM161A_226-644 murinen Ursprungs.....	93
Abb. 34:	Verbesserter „Microtubule Binding Protein Spin-Down Assays“ mit den GST-Fusionsproteinen FAM161A_1-229 und FAM161A_230-543 aus humanem Ursprung .....	94
Abb. 35:	Schematische Darstellung der für die Mikrotubulinbindungsversuche verwendeten FAM161A-Teilkonstrukte .....	95
Abb. 36:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Verteilung verschiedener FAM161A-Verkürzungs-konstrukte in COS-7-Zellen.....	95



Abb. 37: Tubulin-Polymerisationsassay mit den Proteinen GST und GST-FAM161A_230-543 .....	96
Abb. 38: GST-FAM161A-Fusionsproteine für den GST-Pulldown mit FAM161A-1D4 .....	97
Abb. 39: GST-Pulldown-Experiment zur Aufklärung der homotypischen FAM161A-Interaktion .....	98
Abb. 40.: GST- und MBP-markierte FAM161A-Fusionskonstrukte für die Pulldown-Experimente .....	99
Abb. 41: Etablierung der Reaktionsbedingungen des MBP-Pulldowns mit der Negativkontrolle MBP .....	99
Abb. 42: Homotypische Bindungsassays mit GST- und MBP-FAM161A-Fusionsproteinen .....	100
Abb. 43: Multiples Sequenzalignment und vergleichende Sekundärstrukturvorhersage der konservierten UPF0564-Domänen verschiedener orthologer und paraloger FAM161-Proteine .....	101
Abb. 44: Immunpräzipitationsexperimente mit Flag-FAM161A und FAM161B-1D4 .....	102
Abb. 45: Lokalisierung von Flag-FAM161A und FAM161B-1D4 in transfizierten COS-7-Zellen .....	103
Abb. 46: GST-Pulldown Experiment zur Aufklärung der heterotypischen Interaktion von FAM161A und FAM161B .....	103
Abb. 47: <i>FAM161B</i> -Expressionsprofil in verschiedenen humanen Geweben .....	104
Abb. 48: Expression und Aufreinigung verschiedener punktmutierter GST-FAM161A-Fusionskonstrukte .....	104
Abb. 49: Interaktion von FAM161A/B mit Punktmutationskonstrukten der UPF0564-Domäne .....	105
Abb. 50: GST-Fusionsproteine aus SIDs der potentiellen FAM161A-Interaktionspartner .....	107
Abb. 51: GST-Pulldown-Experimente zur Validierung der potentiellen FAM161A-Interaktionen aus dem Y2H-Screen .....	108
Abb. 52: Immunpräzipitationsexperimente von FAM161-Proteinen mit potentiellen Interaktionspartnern .....	109
Abb. 53: GST-Pulldown-Experimente mit GST-FAM161A-Fusionsproteinen und heterolog exprimierten potentiellen FAM161A-Interaktionspartnern .....	110
Abb. 54: Ko-Expression von FAM161-Proteinen mit potentiellen Interaktionspartnern in COS-7-Zellen .....	111

### 9.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Chemikalien: Bezugsquellen und Verwendung .....	24
Tab. 2:	Kit- und Reaktionssysteme: Bezugsquellen und Verwendung .....	25
Tab. 3:	Beads: Bezugsquellen und Verwendung.....	25
Tab. 4:	Enzyme: Bezugsquellen und Verwendung .....	25
Tab. 5:	DNA-Vektoren und Verwendung .....	26
Tab. 6:	cDNA-Klone: Bezeichnungen und Bezugsquellen .....	26
Tab. 7:	Primärantikörper: Typ, Spezies, Bezugsquellen und Verwendung.....	27
Tab. 8:	Sekundärantikörper: Spezies, Bezugsquellen und Verwendung.....	27
Tab. 9:	Molekularmassenstandards: Bezugsquellen und Verwendung .....	27
Tab. 10:	Oligonukleotide: Name und Sequenz. ....	30
Tab. 11:	Puffer und Lösungen: Zusammensetzungen, Mengen, Endkonzentrationen und Bezugsquellen .....	33
Tab. 12:	Medien: Zusammensetzungen, Mengen und Endkonzentrationen.....	34
Tab. 13:	Zelllinien und Bakterienstämme: Eigenschaften, Herkunft und Verwendung.....	34
Tab. 14:	Mauslinien: Genotypen und Verwendung. ....	35
Tab. 15:	Verbrauchsmaterialien: Bezugsquellen und Verwendung .....	35
Tab. 16:	Geräte: Hersteller und Verwendung .....	37
Tab. 17:	Software: Hersteller/Entwickler und Verwendung .....	37
Tab. 18:	DNA-Mengen zur Transfektion verschiedener Zellkulturplatten .....	41
Tab. 19:	Zusammensetzung des RPE-Dissoziationspuffers .....	43
Tab. 20:	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	46
Tab. 21:	Ansatz einer Standard-PCR .....	46
Tab. 22:	Programm einer Standard-PCR.....	47
Tab. 23:	Ansatz der Kolonie-PCR .....	47
Tab. 24:	Programm der Kolonie-PCR.....	47
Tab. 25:	Zusammensetzung des Verdaupuffers zur Isolierung genomischer DNA .....	48
Tab. 26:	Zusammensetzung der qRT-PCR-Reaktion.....	49
Tab. 27:	Ansatz der <i>in vitro</i> Mutagenese .....	50
Tab. 28:	Thermozyklerprogramm der <i>in vitro</i> Mutagenese .....	50
Tab. 29:	<i>DpnI</i> -Verdau methylierter Plasmid-DNA.....	50
Tab. 30:	Restriktionsverdauansatz .....	52
Tab. 31:	Ligationsansatz .....	52
Tab. 32:	Ligationsansatz bei Verwendung des Vektorsystems pGEM®-T .....	53
Tab. 33:	Reaktionsansatz der Sequenzierungsreaktion .....	53
Tab. 34:	Thermozyklerprogramm der Sequenzierungsreaktion.....	53
Tab. 35:	Reaktionsablauf der cDNA-Synthese aus RNA.....	55
Tab. 36:	Eigenschaften der verwendeten SDS-Polyacrylamidgele .....	56
Tab. 37:	Zusammensetzung der Trenngele für die SDS-PAGE.....	56
Tab. 38:	Zusammensetzung des Sammelgels für die SDS-PAGE .....	56
Tab. 39:	Towbin-Puffer für Proteinblot auf PVDF-Membran .....	57
Tab. 40:	Reaktionsschema des „Microtubule Binding Protein Spin-down Assay“.....	59
Tab. 41:	Ansatz der Reaktionspuffers des Tubulin Polymerisations Assays .....	61
Tab. 42:	Testkomponenten für den Tubulin Polymerisations Assay.....	61
Tab. 43:	Lysepuffer für Proteasomaktivitätstests .....	61
Tab. 44:	Exemplarisches Reaktionsschema des Proteasomaktivitätstests.....	62
Tab. 45:	Reaktionspuffer und Enzymlösungen für EZM-Verdau .....	62
Tab. 46:	Puffer für die Aufreinigung von polyklonalen Antikörperseren .....	64
Tab. 47:	Lumineszenzlösungen für den Western Blot .....	65
Tab. 48:	Übersichtstabelle der Interaktionskandidaten von FAM161A.....	106
Tab. 49:	Häufig verwendete Abkürzungen .....	165

## 9.4 Publikationen

**Zach F.** & Stöhr H. (2013) FAM161A, a novel centrosomal-ciliary protein implicated in autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, submitted. Mini-Review.

**Zach F.**, Grassmann F., Langmann T., Soroush N., Wolfrum U. & Stöhr H. (2012) The retinitis pigmentosa 28 protein FAM161A is a novel ciliary protein involved in intermolecular protein interaction and microtubule association. *Human Molecular Genetics*, **21**, 4573-4586.

## 9.5 Tagungsbeiträge

### 2010

6<sup>th</sup> Pro Retina Research Colloquium, Potsdam

*Effect of the TIMP3 mutation S156C on proteasome activity (Poster)*

### 2011

7<sup>th</sup> Pro Retina Research Colloquium, Potsdam

*SFD-associated mutants affect the abundance and protease sensitivity of ECM-bound TIMP3 (Poster)*

### 2012

XV. International Symposium on Retinal Degeneration, Bad Gögging

*The C-terminal conserved domain of the retinitis pigmentosa 28 protein FAM161A is involved in dimerization and microtubule association (Poster)*

## 9.6 Lebenslauf

### Frank Zach, Diplom Biochemiker

\* 05. Januar 1986 in Cham

#### Promotion

seit 11/2009                    Institut für Humangenetik, Universität Regensburg  
„Molekulare Mechanismen der Retinadegeneration  
Aufklärung der erblichen Retinadegenerationen Sorsby  
Fundusdystrophie und Retinitis Pigmentosa (RP28) -  
Pathomechanismus und Funktion der beteiligten Proteine“

#### Studium

05/2009 bis 11/2009    Diplomarbeit AG Wirth, Lehrstuhl für Mikrobiologie,  
Universität Regensburg  
„Analyse von Glykoproteinen von *P. furiosus*“  
  
10/2005 bis 11/2009    Studium der Biochemie (Dipl.-Biochem. Univ.),  
Universität Regensburg

#### Schule

1996-2005                    Joseph-von-Fraunhofer-Gymnasium Cham, Abitur 2005

#### Stipendien

07/2012                    Reisestipendium der Pro Retina Deutschland e.V.,  
Retinal Degeneration Symposium, Bad Gögging

## 9.7 Danksagungen

Mein herzlicher Dank gilt...

Frau *PD Dr. Heidi Stöhr* für die intensive und gewissenhafte Betreuung der Dissertation. Vielen Dank für die stetige Bereitschaft, theoretisches und praktisches Wissen mit mir zu teilen. Ein großer Dank für die in mich investierte Zeit und Mühe, sowie das entgegengebrachte Vertrauen. Alles zusammen war mir während der letzten dreieinhalb Jahre eine große Hilfe, die gesteckten Ziele der Promotion zu erreichen.

Herrn *Prof. Dr. Ernst Tamm* für die Funktion des Supervisors bzw. des Erstkorrektors.

Herrn *Prof. Dr. Reinhard Wirth* und Herrn *Prof. Dr. Stephan Schneuwly* für die Übernahme der Funktionen des Prüfungsvorsitzenden und des Drittprüfers.

Herrn *Prof. Dr. Bernhard Weber* für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität Regensburg durchführen zu können und für die Möglichkeit der Teilnahme an sehr interessanten „Journal Clubs“ und „Labmeetings“.

Herrn *Prof. Dr. Uwe Wolfrum* vom Institut für Zoologie der Johannes Gutenberg Universität in Mainz für die elektronenmikroskopische und immunhistologische Unterstützung bei der Anfertigung der FAM161A-Publikation.

den ehemaligen und aktuellen Kollegen des Instituts für Humangenetik für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und die schöne gemeinsame Zeit. Ein besonderer Dank geht an *Kerstin Rückl* und *Andrea Milenkovic* für die Hilfe bei allen labortechnischen Fragestellungen und an *Daniela Hilfinger* für die erfolgreichen Verkopplungsversuche.

*Jürgen Kaschkötö* für die stetige Hilfsbereitschaft in allen technischen Fragen.

den Mitgliedern der AG Langmann (*Myriam, Thomas, Marcus & Alexander*), die sich bedauerlicherweise größtenteils in die zweitschönste Domstadt abgesetzt haben.

den zahlreichen Praktikanten und Bachelorstudenten, die mich in den letzten dreieinhalb Jahren im Labor unterstützt haben.

den Mitgliedern des täglichen „Mittagsstammtisches“ *Teresa, Kerstin R., Kerstin M., Yana, Julia, Katja, Yvonne und Christoph* für die lustigen und erholsamen Mittagspausen. Die Zeit ist leider viel zu schnell vergangen.

meinen Freunden und meiner Familie für die fortwährende Unterstützung und Geduld während des Studiums und der Doktorarbeit.

meiner Freundin *Kerstin Rückl* für die stetige und uneingeschränkte Unterstützung und das entgegengebrachte Verständnis während der Dissertation.