

SYSTEMISCHER SPLEIßFAKTORMANGEL IM ZEBRAFISCH *DANIO RERIO*

Etablierung und Charakterisierung eines
Tiermodells für Retinitis pigmentosa

Dissertation zur Erlangung des
Naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Bastian Linder
aus Wertheim am Main



Würzburg 2012

Eingereicht am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer

2. Gutachter : Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer

2. Prüfer : Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel

3. Prüfer : Prof. Dr. Manfred Gessler

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Ich studiere nicht das Leben, um es zu verpassen.

Marco Mank

Meiner Frau Tina

Inhalt

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	3
3	Einleitung.....	5
3.1	Die Augenkrankheit Retinitis pigmentosa.....	5
3.1.1	Die Genetik der RP	5
3.1.2	Aufbau der Retina	6
3.1.3	Aufbau und Funktion der Photorezeptoren.....	7
3.1.4	Mechanismen der Photorezeptordegeneration	8
3.2	Spleißen von prä-mRNA	10
3.2.1	Der Aufbau des Spleißosoms.....	10
3.2.2	Der spleißosomale Zyklus.....	11
3.2.3	Biogenese und Recycling des U4/U6.U5 tri-snRNPs	14
3.3	Das Gewebespezifitäts-Paradoxon	15
4	Problemstellung und Konzeption.....	17
5	Ergebnisse	19
5.1	Etablierung eines Zebrafischmodells für systemischen Spleißfaktormangel.....	19
5.2	Subletaler Knockdown von Prpf31 führt zu Defekten in der visuellen Wahrnehmung...	20
5.3	Prpf31-Mangel verursacht Defekte in der Morphologie der Photorezeptoren.....	22
5.4	Der subletale Knockdown von Prpf31 betrifft vor allem retinaspezifische Transkripte ..	23
5.5	Prpf4-Mangel verursacht einen Phänotyp, der dem des Prpf31 RP-Modells gleicht	26
5.6	Identifizierung einer Mutation im <i>PRPF4</i> -Gen eines RP-Patienten.....	28
5.7	p.R192H-Prpf4 ist nicht mehr funktionell	29
6	Diskussion.....	31
6.1.1	Der Zebrafisch als RP-Modell	31
6.1.2	Ein gestörter tri-snRNP-Metabolismus löst den RP-Pathomechanismus aus	32
6.1.3	Ineffizientes Spleißen von Photorezeptor-Transkripten als mögliche Ursache von RP .	33
6.1.4	Das Zebrafischmodell als Werkzeug zur Analyse des Spleißmusters.....	34
6.1.5	<i>PRPF4</i> ist ein neues Kandidatengen für RP	35
6.1.6	Hypothese: Spleißfaktorvermittelte RP als oligogene Erkrankung	36
7	Material & Methoden	39
7.1	Material	39
7.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	39

7.1.2	Lösungen, Puffer und Nährmedien	41
7.1.3	Oligos	47
7.1.4	Plasmide	49
7.1.5	Antikörper	49
7.1.6	Organismen und Zelllinien.....	50
7.2	Methoden.....	51
7.2.1	Molekularbiologie	51
7.2.2	Biochemie.....	54
7.2.3	Immunbiochemische Methoden	58
7.2.4	Zellkultur.....	60
7.2.5	Zebrafisch	60
8	Literatur.....	63
9	Abbildungsverzeichnis & Copyright.....	73
10	Anhang	75
10.1	ImageJ- und Excel-Skripte zur OKN-Analyse.....	75
10.1.1	Augenvermessung in ImageJ	75
10.1.2	Excel Datenauswertung.....	76
10.2	Charakterisierung des 1D4-Epitops.....	77
10.3	Listen der durch Prpf31-Mangel de-regulierten Transkripte	78
10.3.1	Herunterregulierte Transkripte	78
10.3.2	Heraufregulierte Transkripte.....	85
10.4	Das Tudor-Domänen Protein Tdrd3	89
11	Danksagung	101
12	Lebenslauf	105
13	Verzeichnis der Veröffentlichungen.....	101
14	Erklärung	107



1 Zusammenfassung

Retinitis pigmentosa (RP) ist eine vererbte Form der Erblindung, die durch eine progressive Degeneration von Photorezeptorzellen in der Retina verursacht wird. Neben „klassischen“ RP-Krankheitsgenen, die direkt oder indirekt mit dem Sehprozess und der Aufrechterhaltung der Photorezeptoren in Verbindung stehen, können auch Mutationen in Genen für konstitutive Spleißfaktoren zur Photorezeptordegeneration führen. RP kann daher als Paradebeispiel einer Erkrankung mit paradoxer Gewebespezifität angesehen werden: Defekte in essentiellen und ubiquitär exprimierten Genen führen zu einem Phänotyp, der nur wenige Zelltypen betrifft. Um Einblicke in diesen außergewöhnlichen Pathomechanismus zu erhalten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Tiermodell für Spleißfaktor-vermittelte RP im Zebrafisch *Danio rerio* etabliert.

Zunächst wurde gezeigt, dass eine RP verursachende Punktmutation des Spleißfaktors Prpf31 auch in dessen Zebrafisch-Homolog zu einem Verlust der physiologischen Aktivität führt. Als Modell für die Prpf31-Mangelsituation diente dann die durch ein Antisense-Morpholino induzierte partielle Reduktion der Prpf31-Expression in Zebrafischlarven. Konsistent mit einem RP-Phänotyp zeigte sich in diesen Larven eine starke Beeinträchtigung des Sehvermögens. Sie wurde – ebenfalls analog zu RP – durch defekte Photorezeptoren verursacht, die bei ansonsten normal entwickelter Retina eine deutlich veränderte Morphologie aufwiesen. Daraufhin konnten in einer genomweiten Transkriptomanalyse der Augen von Prpf31-defizienten Larven erstmals *in vivo* photorezeptorspezifische Gene identifiziert werden, deren Expression durch den Mangel an Prpf31 beeinträchtigt war.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob es neben den bereits bekannten RP-Krankheitsgenen weitere Spleißfaktoren gibt, deren Defekt die Degeneration von Photorezeptoren auslösen kann. Dazu wurde in Zebrafischlarven ein Mangel an Prpf4 erzeugt, einem Spleißfaktor, der bislang nicht mit RP in Verbindung gebracht worden war. Der Phänotyp dieser Fische war nicht von dem des Prpf31 RP-Modells zu unterscheiden. Dies lieferte einen Hinweis darauf, dass auch Defekte in Prpf4 in der Lage sein könnten, RP auszulösen. Tatsächlich konnte durch genetisches Screening ein RP-Patient mit einer Punktmutation in Prpf4 identifiziert werden (Kollaboration mit Hanno Bolz, Universität Köln). Die biochemische Analyse dieser Mutation zeigte, dass sie zu einem Defekt der Integration von Prpf4 in spleißosomale Untereinheiten und zu dessen Funktionsverlust *in vivo* führt.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten Tiermodell konnte zum ersten Mal *in vivo* ein von Spleißfaktor-Mutationen verursachter Pathomechanismus von Retinitis pigmentosa nachvollzogen werden. Die vom Prpf31-Mangel betroffenen Photorezeptortranskripte stellen vielversprechende Kandidaten für die Vermittlung der Gewebespezifität dar und unterstützen die Hypothese, dass ihre ineffiziente Prozessierung den RP-Phänotyp auslöst. Die Entdeckung eines weiteren Spleißfaktors, dessen Defizienz ebenfalls zu defekten Photorezeptoren führt, zeigt, dass offenbar der Funktionsverlust des Spleißosoms generell in der Lage ist, die Degeneration dieser Zellen zu verursachen. Dies ist nicht zuletzt auch von klinischer Relevanz, da vermutet werden kann, dass sich unter den vielen bisher nicht identifizierten RP-Krankheitsgenen weitere Spleißfaktoren befinden.

2 Summary

Retinitis pigmentosa (RP) is a hereditary eye disease marked by the progressive degeneration of photoreceptor cells in the retina. Typical RP disease gene products are involved in visual function or photoreceptor maintenance. However, also mutations in constitutive splicing factors have been shown to cause this type of photoreceptor degeneration. In humans, almost all transcripts need to be processed by the spliceosome and hence its constitutive components are considered to be essential in all cells of the body. RP therefore serves as a paradigm for diseases with a tissue specificity paradox: Defects in essential and ubiquitously expressed genes lead to a phenotype that affects only a small subset of cells or tissues. To gain insight into this unusual etiology, an animal model for splicing factor-linked RP was established in the zebrafish *Danio rerio*.

First, it was shown that an RP-causing missense mutation in the splicing factor Prpf31 leads to a loss of its physiological activity not only in humans, but likewise in zebrafish. The resulting splicing factor deficiency was then modeled in zebrafish embryos by the injection of an antisense morpholino that blocked Prpf31 translation. Consistent with an RP-like phenotype, partial silencing of Prpf31 led to a marked reduction in visual function. This was – again similar to what is observed in RP – caused by severe photoreceptor defects, as these cells presented a highly aberrant morphology in an otherwise normal retina. Consequently, a genome-wide transcriptome analysis of these animals for the first time resulted in the identification of photoreceptor-specific transcripts which show altered expression *in vivo* due to Prpf31 deficiency.

The second part of this work followed the hypothesis that mutations in other splicing factors may likewise elicit photoreceptor degeneration. Therefore, the splicing factor Prpf4, which was not linked to RP prior to this work, was silenced in zebrafish embryos by the injection of an antisense morpholino. The phenotype of these fish was indistinguishable from the Prpf31 RP-model. Defects in Prpf4 might hence be able to cause the degeneration of photoreceptors. Consistent with this, an RP patient with a missense mutation of Prpf4 was identified (in collaboration with Hanno Bolz, University of Cologne). The biochemical analysis of this mutation revealed that it leads to a defect in the integration of Prpf4 into spliceosomal subunits and to its loss of function *in vivo*.

The animal model established in this work for the first time allowed studying the etiology of splicing factor-linked RP in photoreceptors *in vivo*. The photoreceptor transcripts affected by Prpf31 deficiency are promising candidates for mediating the tissue-specificity of the disease and support the hypothesis that their inefficient processing triggers the RP-phenotype. The identification of another splicing factor, whose deficiency leads to defective photoreceptors, shows that a loss of spliceosomal function in general is able to cause the degeneration of these cells. This is also of clinical relevance, as it shows that the large list of unknown RP disease genes might include even more splicing factors.

3 Einleitung

3.1 Die Augenkrankheit Retinitis pigmentosa

Unter der Bezeichnung Retinitis pigmentosa (RP; MIM #268000) wird eine Reihe von Erkrankungen zusammengefasst, deren Hauptmerkmal das Absterben der Netzhaut oder Retina ist (Hartong et al., 2006). Namensgebend ist die charakteristische Ablagerung eines dunklen Pigments am Augenhintergrund (Abbildung 3.1), das aus Pigmentepithelzellen stammt die in die erkrankte Retina einwandern (Li et al., 1995). Mit einer Prävalenz von 1 in 4000 und weltweit über drei Millionen Erkrankten ist RP eine der häufigsten genetischen Ursachen für Erblindung im Erwachsenenalter (Haim, 2002). Zu den ersten Symptomen der Krankheit zählen Nachtblindheit und ein peripher eingeschränktes Gesichtsfeld (Abbildung 3.1; Hartong et al., 2006). Während des oft über Jahrzehnte andauernden progressiven Krankheitsverlaufs verstärkt sich diese Symptomatik und führt häufig zur kompletten Erblindung. Obwohl die Krankheit bereits vor über 150 Jahren erstmalig beschrieben wurde, gibt es bis heute keine Therapie, die diesen

Prozess nachhaltig aufhalten oder verlangsamen könnte.

3.1.1 Die Genetik der RP

Bei den 47 mit isolierter RP assoziierten Loci treten alle Mendel-Erbgänge (autosomal dominant [adRP], autosomal rezessiv [arRP] und X-Chromosomal [xLRP]) sowie mitochondriale Formen der Vererbung auf (RetNet, the Retinal Information Network). Zusätzlich zu diesen monogenen Erbgängen scheinen auch komplexe polygene Erbgänge eine bedeutende Rolle zu spielen, da in Segregationsanalysen eine Häufung von isolierten Fällen auftritt (Boughman & Fishman, 1983). Eine neue Klasse der Segregationsmuster, die „oligogene Vererbung“, wurde sogar durch die Entdeckung digenischer beziehungsweise triallelischer Erbgänge bei RP begründet (Kajiwara et al., 1994; Katsanis et al., 2001). Dieses Konzept, bei dem mehr als zwei mutierte Allele vorliegen müssen, um einen Phänotyp zu erzeugen, ist

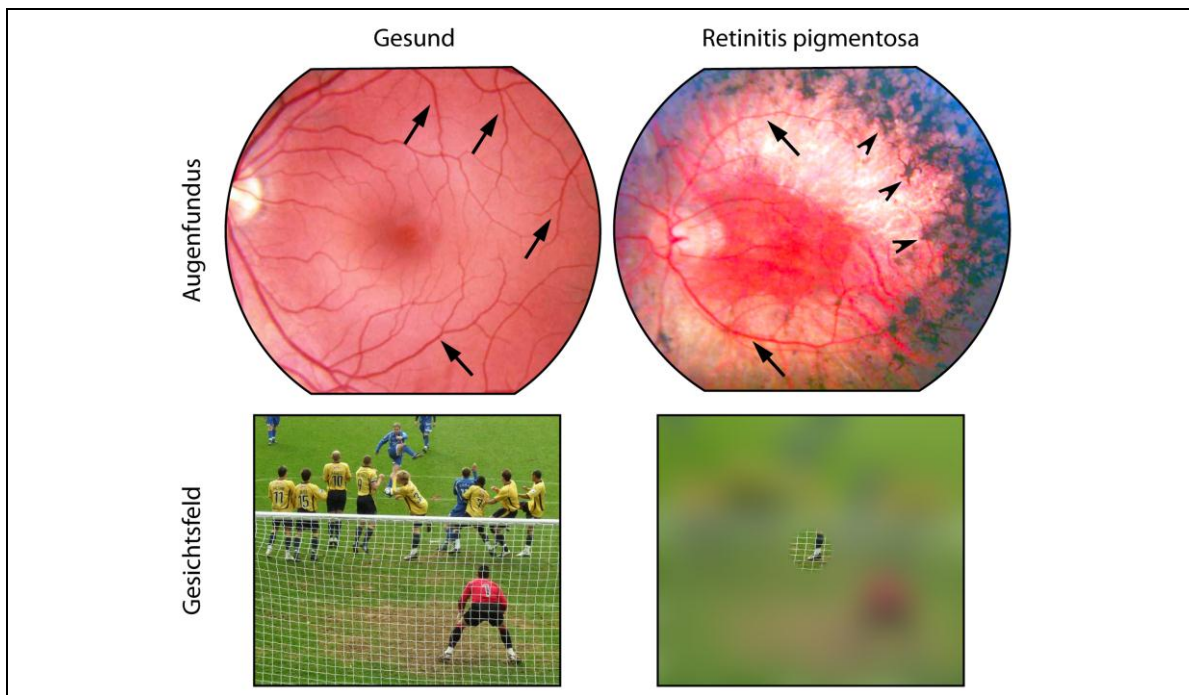


Abbildung 3.1: Krankheitsbild der Retinitis pigmentosa
Oben: Aufnahmen des Augenhintergrundes (Fundus) einer gesunden Person (links) und eines RP-Patienten (rechts; nach Hamel, 2006). Pfeile: Retinale Blutgefäße; Pfeilspitzen: RP-typische Pigmentablagerungen in der peripheren Retina.
Unten: Schematische Darstellung des eingeschränkten Gesichtsfeldes eines RP-Patienten (Tunnelblick).

von wachsender Bedeutung: Es wird nicht nur für immer mehr einst als monogen beschriebene Erkrankungen gezeigt, dass sie durch mehrere Loci verursacht oder beeinflusst werden; die genetischen Interaktionen erlauben auch Rückschlüsse auf die biochemischen Interaktionen der beteiligten Proteine (Badano & Katsanis, 2002). Mit der Komplexität der Vererbung geht eine erhebliche Variabilität in der Penetranz der mutierten Allele einher. So kann ein und dieselbe Mutation in der gleichen Familie zu unterschiedlich ausgeprägten Phänotypen führen. Dies reicht von abweichenden Zeitpunkten des Krankheitsausbruchs über verschieden schwere Verläufe bis hin zur „bimodalen Expressivität“, bei der manche Träger der Mutation überhaupt keine Symptome entwickeln (Evans et al., 1995).

Auch die Einteilung der RP-Krankheitsgene in funktionelle Kategorien ergibt ein vielseitiges Bild: Die meisten von ihnen kodieren für Proteine, die für die Phototransduktion selbst oder die Struktur und Funktion der Photorezeptoren und des Pigmentepithels wichtig sind (zur Übersicht siehe Bolz, 2005). Dementsprechend ist auch ein Großteil dieser Gene spezifisch in der Retina exprimiert. Dennoch gibt es eine Reihe von RP-Genen, die darüber hinaus in anderen Geweben des Körpers exprimiert sind und dort teils essentielle Funktionen übernehmen. Mutationen in solchen Genen gehen oft einher mit einem syndromischen Phänotyp, bei dem RP nur einen Teilaspekt der Symptomatik darstellt. Besonders rätselhaft sind jedoch die Fälle, in denen Mutationen in ubiquitär exprimierten Genen zu isolierter Photorezeptordegeneration führen ohne dass dabei andere Gewebe beeinträchtigt sind. Ein Paradigma für diese Gruppe stellen die RP-Gene *SNRNP200*, *PRPF3*, *PRPF8* und *PRPF31* dar (Zhao et al., 2009; Li et al., 2010b; Chakarova et al., 2002; McKie et al., 2001; Vithana et al., 2001). Sie alle kodieren für essentielle Spleißfaktoren, deren unbeeinträchtigte Funktion unerlässlich für die Genexpression eukaryotischer Zellen ist.

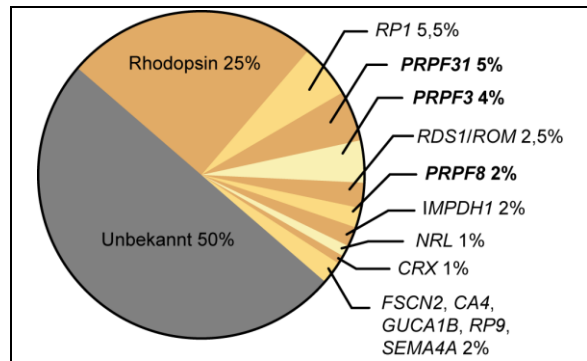
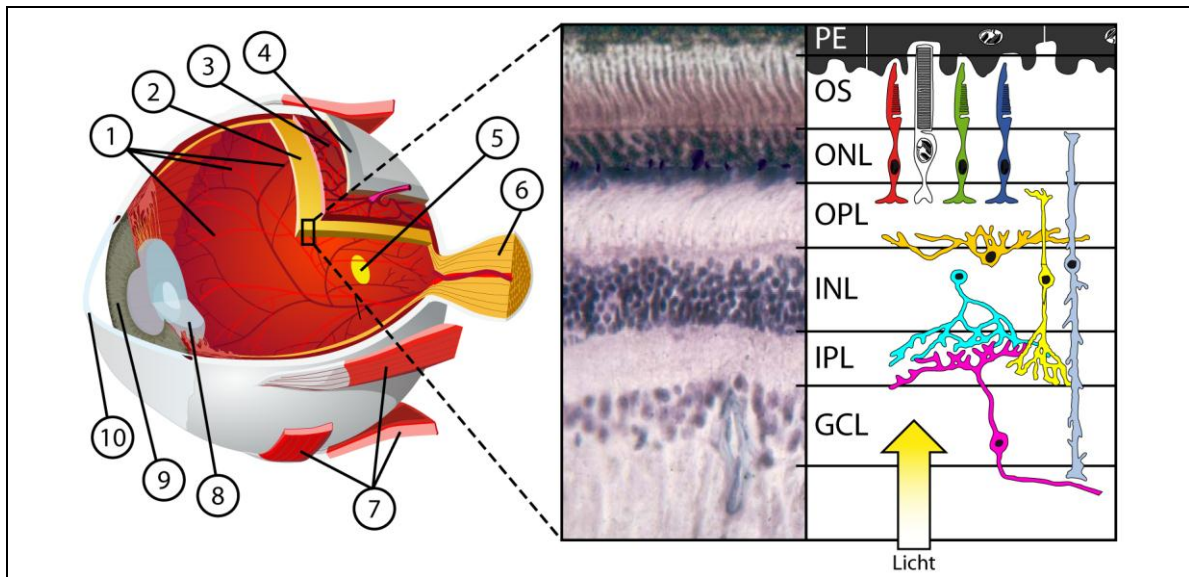


Abbildung 3.2: Übersicht der adRP-Krankheitsgene
Die für Spleißfaktoren kodierenden Gene *PRPF31*, *PRPF3* und *PRPF8* sind hervorgehoben, *SNRNP200* fehlt (nach Hartong et al., 2006; mit Genehmigung von Elsevier).

3.1.2 Aufbau der Retina

Die ungefähr 200µm dicke Retina kleidet den Augenhintergrund aus und enthält eine Reihe hochspezialisierter Zelltypen, die in morphologisch gut unterscheidbaren Schichten angeordnet sind (Masland, 2001). In der inversen Retina des Menschen liegen die Photorezeptoren auf der dem Licht abgewandten Seite (Abbildung 3.3). Die erste Schicht, die das Licht passieren muss, ist die Ganglienzellschicht. Hier liegen die Zellkerne der retinalen Ganglienzellen, deren Axone den Sehnerv bilden. Die Dendriten dieser Zellen bilden in der folgenden inneren plexiformen Schicht Synapsen mit den verschiedenen Interneuronen der Retina aus, den sogenannten Amakrin- und Bipolarzellen. Ihre Kerne sind in der inneren Zellkernschicht angeordnet, wo auch die Kerne der Müller-Gliazellen und Horizontalzellen liegen. Die Dendriten der Bipolar- und der Horizontalzellen erstrecken sich bis in die äußere plexiforme Schicht, wo sie Synapsen mit den Photorezeptorzellen bilden. Kerne und äußere Segmente der Photorezeptoren bilden die letzten beiden Schichten der sogenannten neuralen Retina, danach folgt das Pigmentepithel (Abbildung 3.3). Diese komplexen Verschaltungen der Photorezeptoren mit verschiedenen Interneuronen dienen einer ersten Informationsverarbeitung schon im Auge, so dass dem Gehirn bereits aufbereitete Signale geliefert werden können (zur Übersicht siehe Baccus, 2007).


Abbildung 3.3: Aufbau des Auges und der Retina
Links: Schematische Darstellung des Augenaufbaus

- | | | |
|-----------------------|--------------------------|--------------------------|
| ①: Gefäßsystem | ②: Retina | ③: Aderhaut (Choroidea) |
| ④: Lederhaut (Sklera) | ⑤: gelber Fleck (Makula) | ⑥: Sehnerv |
| ⑦: Augenmuskulatur | ⑧: Linse | ⑨: Regenbogenhaut (Iris) |
| | | ⑩: Cornea |

Mitte: Hämatoxylin/Eosin-Färbung eines Transversalschnitts der gesunden menschlichen Retina

- | | |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| PE: Pigmentepithel | OS: outer segments / äußere Segmente |
| ONL: outer nuclear layer / äußere Zellkernschicht | OPL: outer plexiform layer / äußere plexiforme Schicht |
| INL: inner nuclear layer / innere Zellkernschicht | GCL: ganglion cell layer / Ganglienzellschicht |

Rechts: Schematische Darstellung der verschiedenen retinalen Zelltypen

- | | | |
|-----------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| rot, grün, blau: Zapfen-Photorezeptoren | grau: Stäbchen-Photorezeptor | hellblau: Müller-Gliazelle |
| gelb: Bipolarzelle | orange: Horizontalzelle | cyan: Amakrinzelle |
| | | pink: Ganglionzelle |

3.1.3 Aufbau und Funktion der Photorezeptoren

Die eigentliche Lichtrezeption findet in den Photorezeptoren statt, die hochpolar aufgebaute Zellen sind (Abbildung 3.4A; zur Übersicht siehe Sung & Chuang, 2010). An ihrem basalen Ende befinden sich die Synapsen, welche die Horizontalzellen und Bipolarzellen kontaktieren. Darauf folgt das innere Segment, das den Zellkern, Mitochondrien sowie das Golgi-Netzwerk enthält. Am apikalen Ende befindet sich schließlich das äußere Segment der Zellen, ein abgewandeltes Cilium, das Stapel von Membraneinschnürungen (Discs) enthält, in die große Mengen von Photopigmenten eingelagert sind. Diese bestehen aus einem Apoprotein (Opsin), das an eine Chromophore (meist 11-cis Retinal) gebunden ist. Der erste Schritt der Phototransduktion ist die durch Licht ausgelöste Isomerisierung des 11-cis Retinals zu einem all-trans Retinal. Dabei

ändert sich auch die Konformation des Gesamtproteins, das daraufhin als Guaninnukleotid-Austauschfaktor an der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins Transducin wirkt. GTP-gebundenes α -Transducin dissoziiert aus dem Komplex, so dass dieser an die inhibitorische γ -Untereinheit einer Phosphodiesterase (PDE) binden kann. Die so aktivierte PDE katalysiert die Hydrolyse von cyclischem GMP (cGMP) im Cytoplasma der äußeren Segmente, so dass der dort sonst relativ hohe cGMP-Spiegel sinkt. Diese Kaskade ist das Paradigma eines G-Protein gekoppelten Signalwegs (GPCR-Signalweg; von G-protein coupled receptor) und hat zur Folge, dass die bei Dunkelheit geöffneten cGMP-gesteuerten Kationenkanäle in der äußeren Membran der Photorezeptorzellen schließen. Dadurch wird die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert und die Ausschüttung von Neurotransmittern an den bei Dunkelheit aktiven Synapsen wird reduziert.

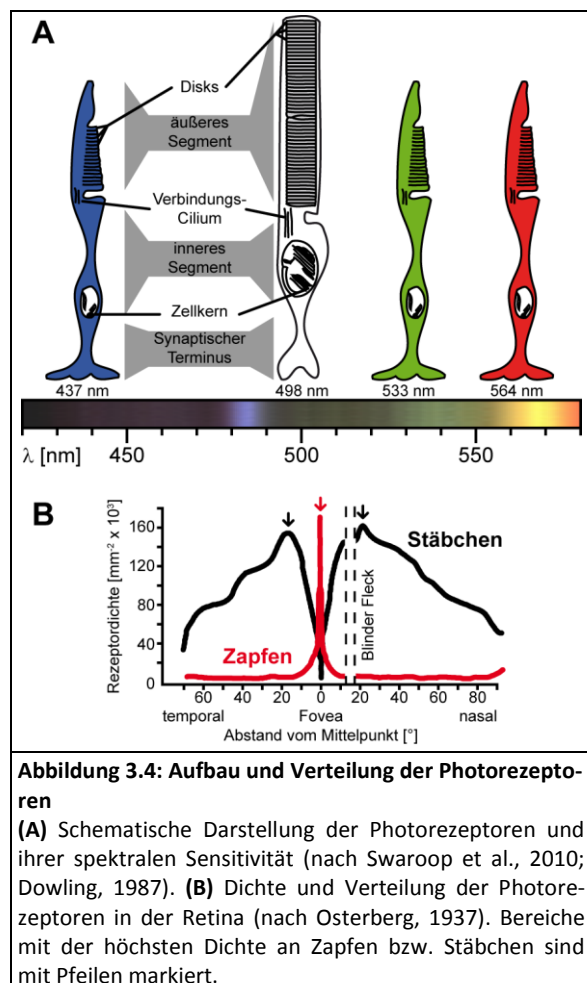
Von den mittlerweile mehr als 1000 bekannten Opsinen werden in den Photorezeptoren der menschlichen Retina vier exprimiert: das Rhodopsin sowie drei verschiedene Opsine des Zapfen-Typs. Sie bestimmen auch die Einteilung der verschiedenen Photorezeptoren in zwei Klassen, namentlich Stäbchen und Zapfen. Sie unterscheiden sich jedoch nicht nur in der Expression der jeweiligen Opsine, auch Physiologie, Morphologie und Funktion sind deutlich verschieden (Kawamura & Tachibanaki, 2008). Während die Stäbchen für das Sehen bei schwachen Lichtverhältnissen (skotopisches Sehen) verantwortlich sind, ermöglichen die verschiedenen Zapfen das Farbsehen (photopisches Sehen). Ebenso unterscheiden sich die beiden Zelltypen in ihrer Abundanz und Verteilung in der Retina. Die Zapfen machen nur etwa 5% der Photorezeptoren in der Retina aus und sind in einer zentralen Region, der Sehgrube (Fovea) konzentriert, wo sie eine Dichte von über 160.000/mm² erreichen können (Curcio et al., 1987). Die restlichen 95% der Photorezeptoren sind Stäbchen, die ihre höchste Dichte in einem um die Fovea gelegenen Ring erreichen (Parafovea) und in der peripheren Retina dominieren (Abbildung 3.4 B). Dies ist der Grund, warum bei RP, einer klassischen Stäbchen-Zapfen-Dystrophie, die mit der Degeneration der Stäbchen beginnt, Nachtblindheit und Tunnelblick zu den frühesten und prominentesten Symptomen gehören.

3.1.4 Mechanismen der Photorezeptordegeneration

Nicht nur in ihrer Anordnung, auch in ihrer Physiologie und Biochemie sind Photorezeptoren auf äußerste Sensitivität optimiert, so dass beispielsweise Stäbchen sogar einzelne Photonen detektieren können (Rieke, 2000). Ihr Metabolismus befindet sich jedoch gleichermaßen fortwährend in einem kritischen Zustand und bereits kleinste Schwankungen genügen, um die Homöostase dieser Zellen aus dem Gleichgewicht zu bringen (Wright et al., 2010). Verstärkt wird dieses Problem durch eine weitere Besonderheit der Photorezeptoren: Ihr Stoffwechsel ist einem zirkadianen Rhythmus unterworfen, so dass es neben dem metabolischen Grundzustand zu Zeitabschnitt-

ten besonders hoher Aktivität kommt. Beispielsweise werden in den Morgenstunden alte Discs am apikalen Ende der äußeren Segmente abgeschnürt und auf der basalen Seite durch neue ersetzt (LaVail, 1976). Dies hat zur Folge, dass auch die Expression der Opsine oszilliert und es zu „Spitzenzeiten“ in deren Transkription kommt (Pierce et al., 1993).

Der fragile Metabolismus der Photorezeptoren ist auch an der Fülle von Faktoren erkennbar, die ihre Degeneration auslösen können (Fain, 2006). Dazu gehören neben vererbten und spontanen Mutationen auch exogene Einflüsse wie ein konstanter oder exzessiver Lichteinfall sowie ein Mangel an Vitamin A. Obwohl die Ursachen vielfältig sein können, gibt es einige gemeinsame Motive der Photorezeptordegeneration. Ein Beispiel ist die toxische Hyperpolarisierung der Zelle, die durch Defekte in der Phototransduktion, Mutationen in Ionenkanälen oder übermäßige Belichtung ausgelöst werden kann (Fain, 2006). Weitere grundlegende Mechanismen sind Defekte im

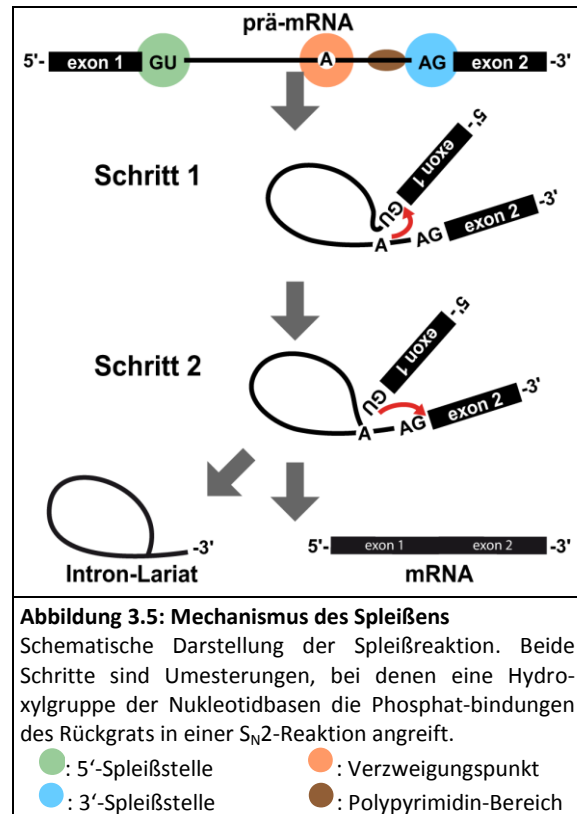


Verbindungscilium, Neuro-Inflammation oder reaktive Sauerstoffspezies. Sie alle münden jedoch im programmierten Zelltod der Photorezeptoren, der – entgegen früherer Annahmen – nicht ausschließlich durch Apoptose sondern auch durch Caspase-unabhängige Zelltodprogramme und Autophagie verursacht wird (Sancho-Pelluz et al., 2008).

3.2 Spleißen von prä-mRNA

Vor mehr als 30 Jahren wurde entdeckt, dass Gene und ihre Primärtranskripte von nicht-kodierenden Sequenzen (Introns) unterbrochen sein können (Berget et al., 1977; Chow et al., 1977). Ein funktionelles Leseraster für die Translation entsteht in diesen Transkripten erst durch zwei aufeinander folgende Transesterifizierungsreaktionen, die als prä-mRNA Spleißen bezeichnet werden (Abbildung 3.5). Chemisch gesehen greift dabei zuerst die 2'-Hydroxylgruppe eines Adenosins im Intron (Verzweigungspunkt-Adenosin) die Phosphodiesterbindung der 5'-Spleißstelle (SS) nukleophil an. Im zweiten Schritt greift das so entstandene freie 3'-Ende des ersten Exons die Phosphodiesterbindung der 3'-Spleißstelle (SS) an, so dass das lassoartige Intron (Lariat) frei wird und die reife mRNA entsteht. Die für das Spleißen wichtigen *cis*-Elemente der prä-mRNA sind durch schwache Konsensus-Sequenzen charakterisiert. Nur zwei Nukleotide der 5'-SS und 3'-SS (GU bzw. AG) sind invariant, beim Verzweigungspunkt ist es sogar einzig der für die Katalyse notwendige Adenosinrest. Daneben gibt es in höheren Eukaryoten noch einen ebenfalls sehr schwach konservierten Polypyrimidin-Bereich, der ca. 15 Nukleotide aufwärts der 5'-SS im Intron gelegen ist (Abbildung 3.5).

Bereits früh wurde erkannt, dass durch Introns die Regulation und Diversifikation der kodierten Proteine erhöht werden kann (Gilbert, 1978). Wie verbreitet jedoch dieser Mechanismus ist, zeigte sich erst durch die systematische Analyse des Transkriptom: Über 94% aller prä-mRNAs besitzen mindestens ein Intron und über 70% der Transkripte mit mehr als einem Intron werden alternativ gespleißt (Johnson et al., 2003; Pan et al., 2008). Häufig werden diese alternativen Isoformen in unterschiedlichen Geweben und Entwicklungsstadien differentiell exprimiert, was einen dynamisch regulierten Spleißprozess erfordert. Gleichzeitig muss die Spleißreaktion jedoch äußerst exakt erfolgen, da bereits eine Abweichung von der vorgesehenen SS um ein einzelnes Nukleotid zu einer Verschiebung des Leserasters in der mRNA und aberranten Proteinen führen würde. Diesen beiden



entgegengesetzten Aufgaben muss das Spleißosom, der makromolekulare Komplex, der die beiden Transesterifizierungen katalysiert, gerecht werden. Es gehört daher zu den komplexesten und dynamischsten zellulären Maschinen, die bis heute bekannt sind.

3.2.1 Der Aufbau des Spleißosoms

Das Spleißosom besteht aus Nukleinsäuren und Proteinen und ist damit ein Ribonukleoprotein-Partikel (RNP). Es ist aus fünf Untereinheiten aufgebaut, die jeweils eine uridinreiche kleine Kern-RNA (Uridine-rich small nuclear RNA; U snRNA) enthalten und daher als U snRNPs (oder kurz snRNPs) bezeichnet werden (Abbildung 3.6). In den snRNPs U1, U2, U4 und U5 ist die entsprechende snRNA von einem Ring aus sieben Sm-Proteinen umgeben, die allen snRNPs dieser so genannten „Sm-Klasse“ gemeinsam sind. Die U6 snRNA ist dagegen mit einem Ring aus LSM-Proteinen assoziiert (Achsel et al., 1999). An diese snRNP-Kernpartikel können zwischen drei (U1 snRNP) und mehr als 20 (U2 snRNP) konstitutive partikelspezifische Proteine angelagert sein

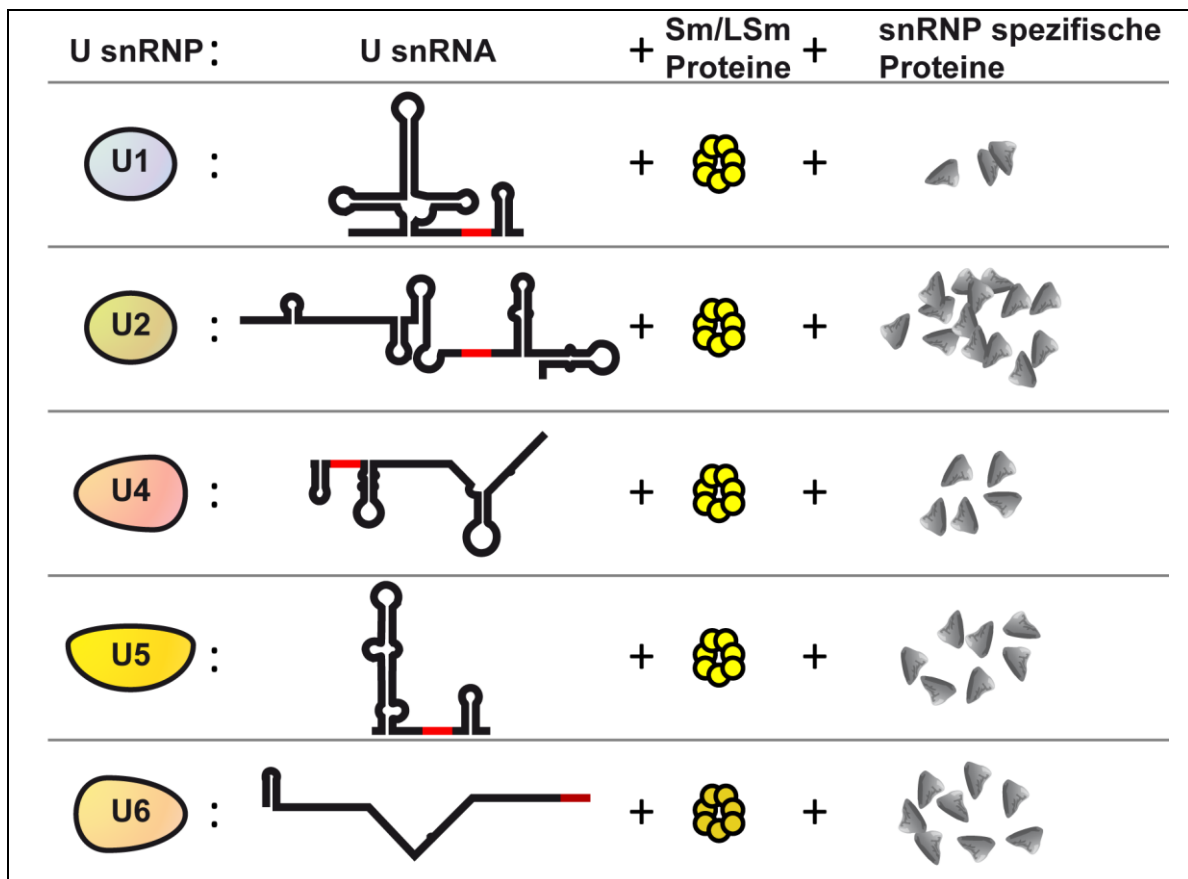


Abbildung 3.6: Zusammensetzung der spleißosomalen snRNPs

Jedes snRNP besteht aus einer snRNA mit charakteristischer Sekundärstruktur. Die von Stamm-Schleife Strukturen eingefassten Sm-Stellen (hellrot) der snRNAs U1, U2, U4 und U5 sind von einem Ring aus Sm-Proteinen umgeben (hellgelb). Ein LSm-Ring (gelb) bindet an die U-reiche Region der U6 snRNA (dunkelrot). Zusätzlich besitzt jedes snRNP eine Reihe partikelspezifischer Proteine (grau; siehe hierzu Abbildung 3.7).

(Abbildung 3.7). Zusätzlich zu den snRNP-Untereinheiten ist das Spleißosom aus weiteren nicht-snRNP Spleißfaktoren aufgebaut, so dass es insgesamt mehr als 170 verschiedene Proteine beinhaltet (Nilsen, 2003; Wahl et al., 2009; Valadkhan & Jaladat, 2010).

3.2.2 Der spleißosomale Zyklus

Die Zusammenlagerung des Spleißosoms aus den snRNP Untereinheiten findet auf den cis-Elementen der zu spleißenden prä-mRNA statt. Dabei bilden sich charakteristische stabile Aufbau-Zwischenstufen, die durch native Gelelektrophorese, Affinitätsreinigung und Dichtegradientenzentrifugation isoliert werden konnten (Abbildung 3.8). Zunächst assoziiert das U1 snRNP mit der 5'-SS der prä-mRNA,

welche damit für das Spleißen festgelegt und in ihrem Kernexport inhibiert ist (Legrain & Rosbash, 1989). Das U2 snRNP ist in diesem als E-Komplex bezeichneten Intermediat nur schwach mit dem Verzweigungspunkt assoziiert. Dabei wird es von den Proteinen U2AF65 und U2AF35 unterstützt, die ihrerseits jeweils an den Polypyrimidin-Bereich und die 3'-SS binden (Gozani et al., 1996; Valcárcel et al., 1996). Stabil integriert in das Prä-Spleißosom (A-Komplex) wird das U2 snRNP erst durch die Aktivität der ATP-abhängigen Helikase Prpf5, was einer ersten Qualitätskontrolle dient (Xu & Query, 2007). Diese dynamische Modellierung des Spleißosoms durch Helikasen ist ein während des Zyklus häufig wiederkehrendes Motiv, das gleichzeitig Regulation und Fehlerkontrolle ermöglicht (Smith et al., 2008).

Der nächste Schritt, das Eintreten des U4/U6.U5 tri-snRNPs in den Zyklus, ist von besonderer Bedeutung: Mit der Bildung des prä-katalytischen Spleißosoms (B-Komplex) entsteht erstmals ein Komplex, der alle für die Bildung des katalytischen Zentrums notwendigen Komponenten enthält. Interessanterweise müssen dabei die vom tri-snRNP gebundenen snRNPs U1 und U2 nicht notwendigerweise auf benachbarten Spleißstellen liegen (Abbildung 3.9). Die Spleißfaktoren des tri-snRNPs können also auch ohne die Einwirkung anderer Faktoren zur Definition der Spleißstellen beitragen, so dass alternative Spleißmuster entstehen können (House & Lynch, 2006; Bonnal et al., 2008; Sharma et al., 2008). Zusammen mit dem tri-snRNP wird ein weiterer multifaktorieller Komplex, der nach seiner Hauptkomponente Prpf19 benannte *nineteen complex* (NTC), eingebaut. Dieser ist für die nun folgende katalytische Aktivierung des Spleißosoms erforderlich, bei der zunächst ein Intermediat entsteht, dem das U1 snRNP fehlt (BΔU1-Komplex; Makarova et al., 2004). Dann dissoziiert auch das U4 snRNP und es entsteht ein Komplex in dessen aktivem Zentrum der erste Schritt der Spleißreaktion stattfinden kann (B*-Komplex; Makarov et al., 2002). Nach der ersten Transesterifizierung kommt es zu weiteren umfangreichen Änderungen in Aufbau und Zusammensetzung des Partikels, wobei das „Schritt 1 Spleißosom“ entsteht (C-Komplex). Dieses katalysiert die zweite Transesterifizierung, bei der das Intron-Lariat und die reife mRNA entstehen. Letztere wird freigesetzt und der post-spleißosomale Komplex dissoziiert unter ATP-Verbrauch in das Intron-Lariat und die einzelnen snRNPs U5 und U6 sowie das post-spleißosomale U2 snRNP. Letzteres besitzt, im Gegensatz zum 17S U2 snRNP, einen Sedimentationskoeffizienten von 35S, da es einen Großteil der Proteinbestandteile des aktiven Zentrums enthält und diesem strukturell ähnlich sieht (Golas et al., 2010). Nach Aufbau und Disassemblierung des Spleißosoms folgt das Recycling der einzelnen post-Spleißosomalen snRNPs, so dass der Zyklus erneut beginnen kann.

Name	kDa	12S U1	17S U2	13S U4/U6	20S U5	25S U4/U6.U5
B/B' LSm8	28/29	●	●	●●	●	●●
D3 LSm4	18	●	●	●●	●	●●
D2 LSm3	16,5	●	●	●●	●	●●
D1 LSm2	16	●	●	●●	●	●●
E LSm5	12	●	●	●●	●	●●
F LSm6	11	●	●	●●	●	●●
G LSm7	9	●	●	●●	●	●●
U1-70K	12	●				
U1-A	11	●				
U1-C	9	●				
U2-A'	31		●			
U2-B''	28,5		●			
SF3a	120		●			
	66		●			
	60		●			
SF3b	155		●			
	145		●			
	130		●			
	49		●			
	10		●			
	150		●			
	150		●			
Prpf5	140		●			
SR140	140		●			
CHERP	130		●			
U2 rel.	Prpf43		●			
	PUF60		●			
	SPF45		●			
	SPF31		●			
	SPF30		●			
Prpf3	90			●	●	
Prpf31	61			●	●	
Prpf4	60			●	●	
Cyp20	20			●	●	
Snu13	15,5			●	●	
Prpf8	220				●	●
Snrp200	200				●	●
Snu114	116				●	●
Prpf6	102				●	●
Prpf28	100				●	●
U5-52K	52				●	●
U5-40K	40				●	●
U5-15K	15				●	●
Snu66	110					●
Sad1	65					●
27K	27					●

Abbildung 3.7: Proteinzusammensetzung der spleißosomalen snRNPs

Die Sm- und LSm- Proteine, die zusammen mit der snRNA den Kern der snRNPs bilden, sind in hellgelb beziehungsweise gelb dargestellt, spezifische Proteine je nach Zugehörigkeit bunt. Die locker und in substöchiometrischen Mengen mit dem U2 snRNP assoziierten Proteine sind als „U2-related“ (U2-rel.) bezeichnet (Will et al., 2002).

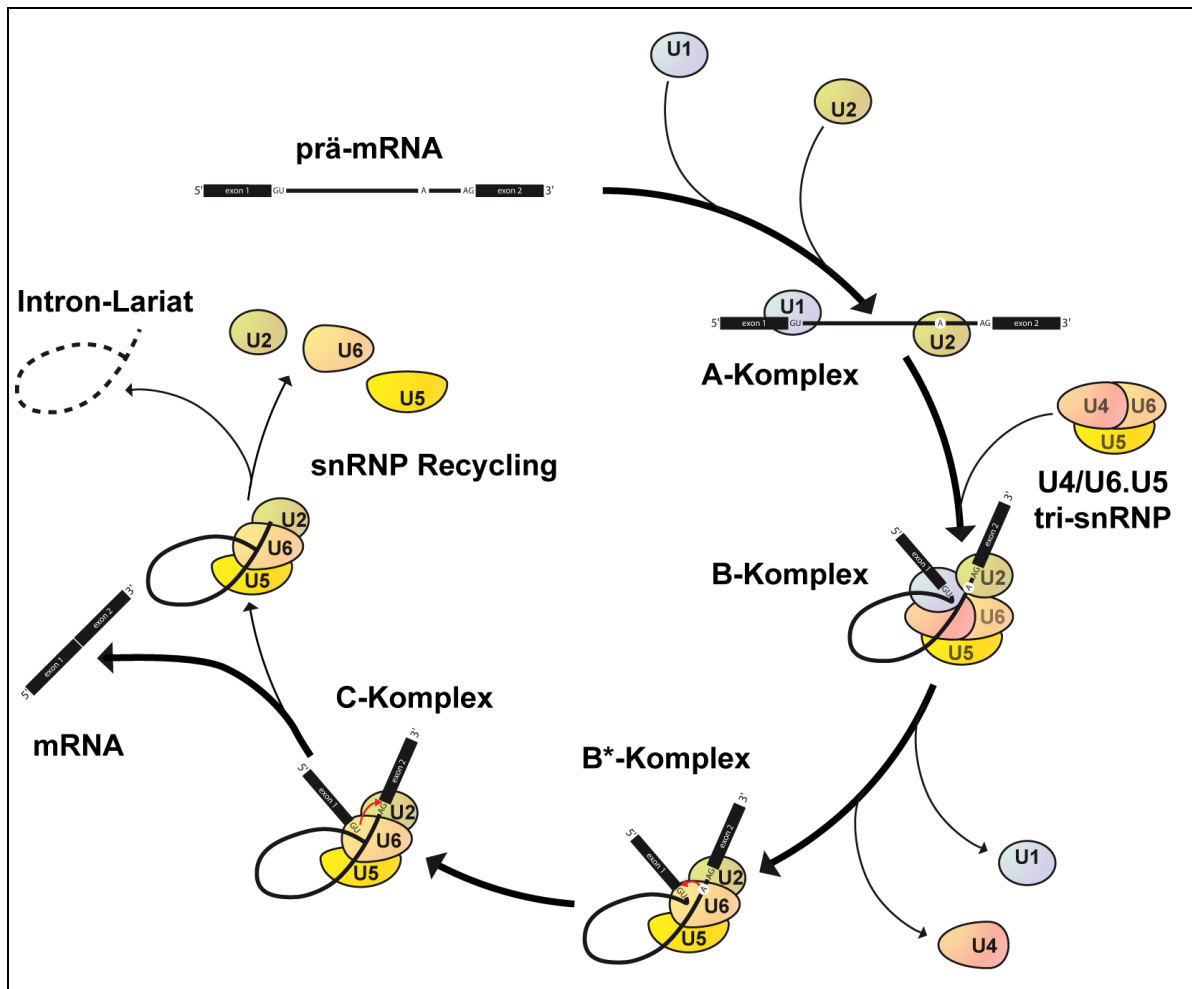


Abbildung 3.8: Der spleißosomale Zyklus.
Für Details siehe Text. Der BΔU1-Komplex ist nicht gezeigt.

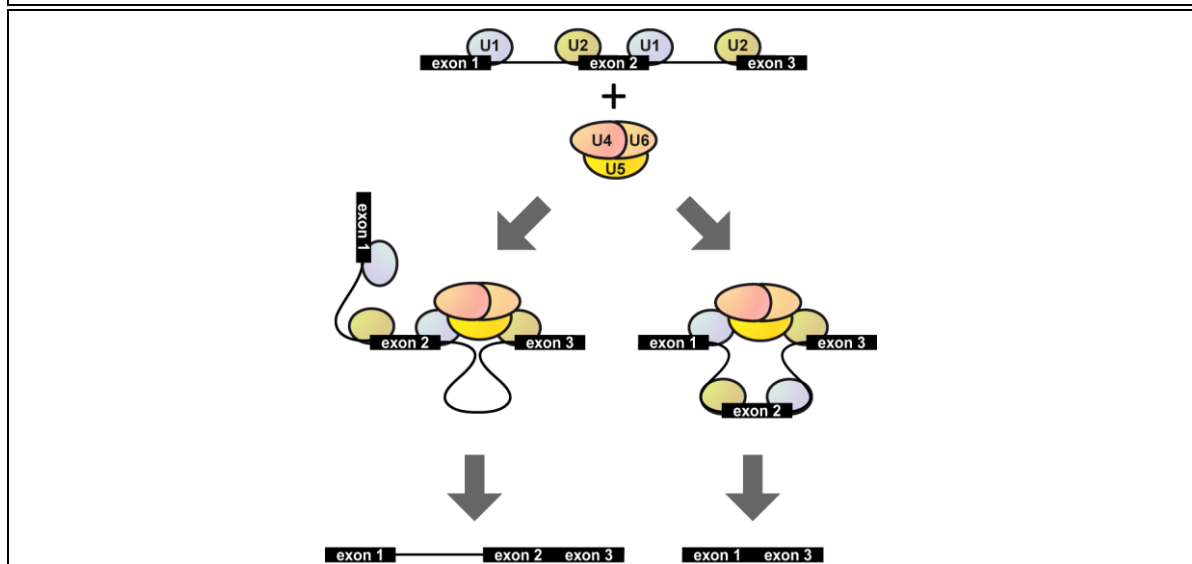


Abbildung 3.9: Der Eintritt des tri-snRNPs in den Zyklus kann das Spleißmuster beeinflussen.
Bei prä-mRNAs mit mehreren Introns können gleichzeitig verschiedene U1 und U2 snRNPs an die Spleißstellen binden. Beim Eintreten des tri-snRNPs in den Zyklus (siehe Abbildung 3.8) wird bestimmt, welche zusammen benutzt werden, so dass unterschiedliche Spleißmuster entstehen.

3.2.3 Biogenese und Recycling des U4/U6.U5 tri-snRNPs

Das U4/U6.U5 tri-snRNP, in dem alle bisher bekannten RP-assoziierten Spleißfaktoren enthalten sind, ist die größte und komplexeste spleißosomale Untereinheit (Neubauer et al., 1998; Stevens & Abelson, 1999). Es wird als snRNP höherer Ordnung bezeichnet, da es vor seinem Eintritt in den Spleißzyklus aus den snRNPs U4, U5 und U6 zusammengesetzt werden muss (zur Übersicht siehe Patel & Bellini, 2008), die alle auch als mono-snRNPs in der Zelle existieren. Deren Biogenese kann, wie im Fall von U6, ausschließlich im Kern stattfinden oder, wie bei den Sm-Klasse snRNPs U4 und U5, eine Prozessierung im Cytoplasma erfordern (zur Übersicht siehe Neuenkirchen et al., 2008). Nach der Rückführung in den Kern wird zunächst aus den einzelnen snRNPs U4 und U6 das U4/U6 di-snRNP gebildet. Dies geschieht durch ausgedehnte Basenpaarungen der snRNAs, an die sich daraufhin das Protein Snu13/15.5K anlagern kann (Liu et al., 2007). Damit wird eine Bindungsplattform für Prpf31 geschaffen (Nottrott et al., 2002). Über dessen Interaktion mit Prpf6 wird das U5 snRNP gebunden, so dass das tri-snRNP entsteht. Ebenso binden an dieser Plattform die tri-snRNP spezifischen Proteine Prpf3, Prpf4 und Cyp20, die ein äußerst stabiles Heterotrimer bilden (Horowitz et al., 1997; Teigelkamp et al., 1998). Insgesamt wird das tri-snRNP durch ein ganzes Netzwerk an Protein-Protein Interaktionen zusammengehalten, bei dem Prpf31 eine zentrale Rolle spielt (zur Übersicht siehe Liu et al., 2006). Prpf31 ist daher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* essentiell für die Bildung und Stabilität des tri-snRNPs (Makarova et al., 2002; Schaffert et al., 2004).

Das Interaktionsnetzwerk innerhalb des tri-snRNPs unterliegt während der Aktivierung des Spleißosoms dynamischen Umlagerungen. Zunächst wird die U4/U6 Helix durch die Helikase Brr2 entwunden (Raghunathan & Guthrie, 1998), die wiederum durch den C-Terminus von Prpf8 aktiviert wird (Maeder et

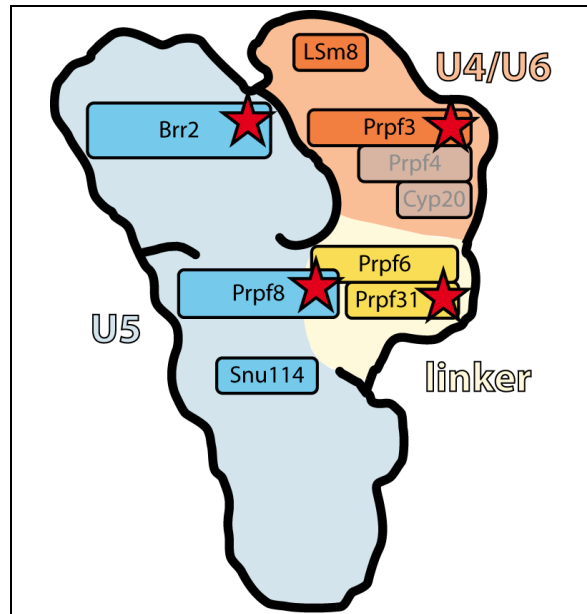


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung des tri-snRNPs

Die Struktur wurde aus Untersuchungen des Hefe tri-snRNPs durch Cryo-Elektronenmikroskopie abgeleitet (Häcker et al., 2008). Einige immunlokalisierte Proteine sind dargestellt, zusätzlich die Komponenten des stabilen Prpf3-Subkomplexes (ausgegraut). Proteine, in denen RP-verursachende Mutationen identifiziert wurden, sind mit einem Stern markiert.

al., 2009). Dadurch können sich Basenpaarungen zwischen den snRNAs U6 und U2 ausbilden, die für die katalytische Aktivität des Spleißosoms entscheidend sind (Madhani, 1992). Als Folge dieser Umlagerungen dissoziiert das U4 snRNP aus dem Komplex. Da nach dem Spleißprozess auch die snRNPs U5 und U6 als einzelne Partikel freigesetzt werden, muss das tri-snRNP dann erneut aus mono-snRNPs zusammengesetzt werden. Unterstützt wird dieses snRNP-Recycling durch den Spleißfaktor Prpf24/p110 (Bell et al., 2002; Rader & Guthrie, 2002). Er macht die während der Aktivierung des Spleißosoms durch Komponenten des NTC katalysierte K63-Ubiquitinierung von Prpf3 rückgängig (Song et al., 2010). Über seine Interaktion mit Coilin trägt p110 außerdem zur Anreicherung der snRNPs in speziellen Kernkompartimenten, den Cajal-Körperchen, bei (Staněk et al., 2003), was zu einer um das zehnfache gesteigerten di- und tri-snRNP Zusammenbaurate führt. (Novotny et al., 2010).

3.3 Das Gewebespezifitäts-Paradoxon

Die Beteiligung der RP-assoziierten Spleißfaktoren Brr2, Prpf3, Prpf8 und Prpf31 an den verschiedenen Aspekten des tri-snRNP Metabolismus zeigt eindrucksvoll, dass sie unverzichtbar für dessen Biogenese, Integrität und Recycling sind. Es ist es daher wahrscheinlich, dass viele RP-Mutationen in diesen Proteinen die Funktion des tri-snRNPs und damit des Spleißosoms beeinträchtigen, obwohl ein solcher Effekt bisher nur in wenigen Fällen experimentell bestätigt werden konnte (Liu et al., 2007; Boon et al., 2007; Zhao et al., 2009).

Völlig unklar bleibt jedoch, wie Defekte des tri-snRNPs zu der hochspezifischen Degeneration von Photorezeptoren führen können, die bei isolierter RP beobachtet wird. Dieses Gewebespezifitäts-Paradoxon tritt auch bei einer anderen neurodegenerativen Erkrankung auf, der Spinalen Muskelatrophie (SMA), bei der durch einen Mangel an funktionstüchtigem SMN-Protein (survival motor neuron) eine Degeneration der Motoneuronen verursacht wird (Lefebvre et al., 1995). Interessanterweise ist auch SMN an der Biogenese der spleißosomalen Untereinheiten beteiligt (Fischer et al.,

1997). Während jedoch für SMN darüber hinaus weitere zelluläre Funktionen postuliert wurden, von denen einige spezifisch für Motoneuronen sind (zur Übersicht siehe Rossoll & Bassell, 2009), kennt man für die RP-Spleißfaktoren keine Aufgaben außerhalb des tri-snRNPs. RP ist daher das Paradebeispiel einer Erkrankung mit Gewebespezifitäts-Paradoxon: Während ein kompletter Funktionsverlust der betroffenen Spleißfaktoren (homozygote Mutation) mit dem Leben nicht vereinbar ist, verursacht ein partieller Mangel (heterozygote Mutation) nur in bestimmten Zellen einen Phänotyp. Eine der Erklärungen für diesen spezifischen Phänotyp ist die besondere Anfälligkeit der Photorezeptoren gegenüber einer generell reduzierten Spleißaktivität (Mordes et al., 2006; Abbildung 3.11). Diese Hypothese bietet zwar eine attraktive Erklärung für das Gewebespezifitäts-Paradoxon, jedoch konnte sie noch nicht experimentell untersucht werden, da es bislang kein Modell für spleißfaktordefiziente Photorezeptoren gab.

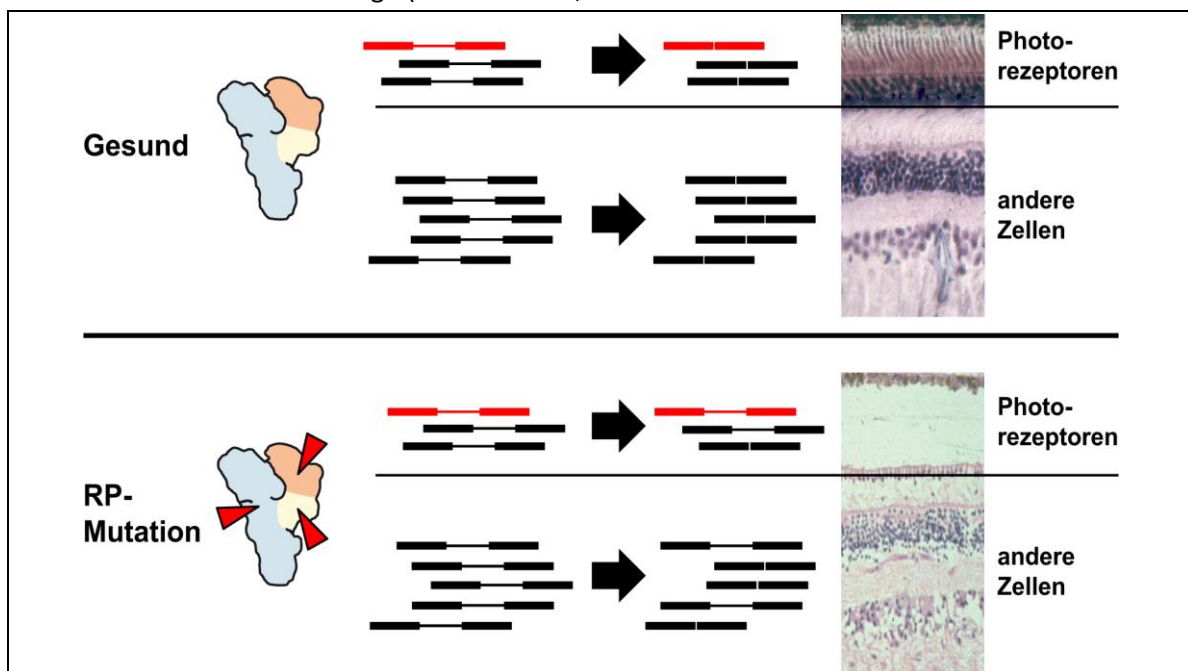


Abbildung 3.11: Die Fehlspleiß-Hypothese für RP

Links: Schematische Darstellung des gesunden und RP-Mutanten tri-snRNPs.

Mitte: Durch RP-Mutationen im tri-snRNP wird generell fehlerhaft oder ineffizient gespleißt. In Photorezeptoren gibt es spezifische Transkripte (rot), deren effiziente Prozessierung essentiell für die Zelle ist.

Rechts: Folge der ineffizienten Prozessierung dieser Transkripte ist ein selektives Absterben der Photorezeptoren in der Retina (Retinaschnitte aus Hartong et al., 2006).

4 Problemstellung und Konzeption

Dass heterozygote Mutationen in Spleißfaktoren im Menschen die Degeneration von Photorezeptoren verursachen können, wurde bereits vor zehn Jahren entdeckt (Vithana et al., 2001). Dennoch ist bis heute weitgehend unklar, wie diese Defekte in ubiquitär exprimierten Genen zu dem hochspezifischen Phänotyp der RP führen (Mordes et al., 2006). Ein Grund für diese Unkenntnis ist, dass die Untersuchung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen in den betroffenen Zellen selbst bisher nicht möglich ist. Spleißfaktordefiziente Photorezeptoren existieren nur in der Retina von RP-Patienten und sind daher unzugänglich für direkte Analysen oder Manipulationen.

Um die Voraussetzungen für solche Studien zu schaffen, sollte in dieser Arbeit ein Tiermodell für den systemischen Spleißfaktormangel im Zebrafisch *Danio rerio* etabliert und charakterisiert werden. Der Zebrafisch bietet dabei neben seiner generellen Eignung als Modellorganismus entscheidende Vorteile: Erstens lässt sich in Zebrafischlarven durch translationsblockierende Antisense-Morpholinos die Genexpression dosisabhängig und graduell verringern (Nasevicius & Ekker, 2000), was die Erzeugung eines systemischen Mangels an essentiellen Spleißfaktoren überhaupt erst ermöglicht. Zweitens ist bereits im Larvenstadium das visuelle System der Tiere gut ausgeprägt, leicht zugänglich und dem des Menschen sehr ähnlich (Goldsmith, 2001; Shin & Fishman, 2002; Goldsmith & Harris, 2003).

Anhand des Zebrafischmodells sollten exemplarisch zwei grundlegende Fragen der spleißfaktorassoziierten RP untersucht werden:

- Ist die Hypothese richtig, dass RP-verursachende Mutationen in *Prpf31* zu einer gestörten Prozessierung und Expression photorezeptorspezifischer mRNAs führen (Mordes et al., 2006)?
- Sind Defekte in den Funktionen der einzelnen Proteine für den RP-Phänotyp verantwortlich oder ist eine reduzierte Aktivität des tri-snRNPs generell in der Lage, die spezifische Degeneration von Photorezeptoren zu verursachen?

Zur Beantwortung der ersten Frage sollte eine Dosis eines gegen die *prpf31*-mRNA gerichteten Morpholinos bestimmt werden, deren Mikroinjektion zu einem nicht letalen Spleißfaktormangel führt. Da nicht bekannt war, ob ein Spleißfaktormangel in anderen Organismen wie dem Menschen überhaupt zu selektiven Defekten der Photorezeptorzellen führt, sollte die Sehfähigkeit der Tiere in verhaltensphysiologischen Experimenten getestet werden. Ebenso sollten Effekte des *Prpf31*-Mangels auf die Morphologie der Photorezeptoren untersucht werden. Anhand des Tiermodells sollten dann mittels eines genomweiten vergleichenden Microarrays Photorezeptortranskripte identifiziert werden, die in ihrer Expression gestört sind.

Um der Frage nachzugehen, ob Fehlfunktionen des tri-snRNPs generell zu Photorezeptor-Defekten führen, sollte die Expression von *Prpf4*, eines bisher nicht mit RP in Verbindung gebrachten Spleißfaktors, in Zebrafischlarven reduziert werden. Ein möglicher RP-Phänotyp sollte mittels verhaltensphysiologischer Tests der Sehfähigkeit und Untersuchungen der Photorezeptormorphologie charakterisiert werden. Parallel dazu wurden im Rahmen einer Kooperation mit Hanno Bolz (Institut für Humangenetik, Universität Köln) *Prpf4*-Mutationen in RP-Patienten identifiziert. Diese sollten hinsichtlich eines möglichen biochemischen Defekts *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden.



5 Ergebnisse

5.1 Etablierung eines Zebrafisch-modells für systemischen Spleißfaktormangel

Um die Auswirkungen eines systemischen Spleißfaktormangels auf Photorezeptoren an einem Tiermodell zu untersuchen, sollte die Expression eines tri-snRNP Spleißfaktors durch Morpholino-vermittelte Repression der Translation unterdrückt werden („Knockdown“). Ein sehr gut geeigneter Kandidat für ein solches Modell ist das Protein Prpf31. Es ist essentiell für die Integrität des tri-snRNPs und den Spleißprozess (Schaffert et al., 2004; Weidenhammer et al., 1996, 1997), ubiquitär exprimiert und besitzt weder retinaspezifische Isoformen noch eine differenzielle Expression in diesem Gewebe (Tanackovic & Rivolta,

2009). Außerdem konnte in einigen RP-Patienten gezeigt werden dass eine Prpf31-Mangelsituation krankheitsauslösend sein kann (Abu-Safieh et al., 2006; Rio Frio et al., 2008). Nicht zuletzt ist der Pathomechanismus der Prpf31-vermittelten RP deshalb von besonderem Interesse, weil *PRPF31* mit einem Anteil von 8% der gesamten adRP-Fälle das mit Abstand am häufigsten betroffene Spleißfaktorgen ist (Daiger et al., 2007).

Zur Erzeugung einer Mangelsituation dieses Spleißfaktors in Zebrafischlarven wurden Embryonen im Ein- oder Zweizellstadium mit einem Morpholino injiziert, welches gegen die Startstelle der Translation der *prpf31*-mRNA gerichtet war (*prpf31*-MO). Wie erwartet führte die Injektion von hohen Dosen zu einem

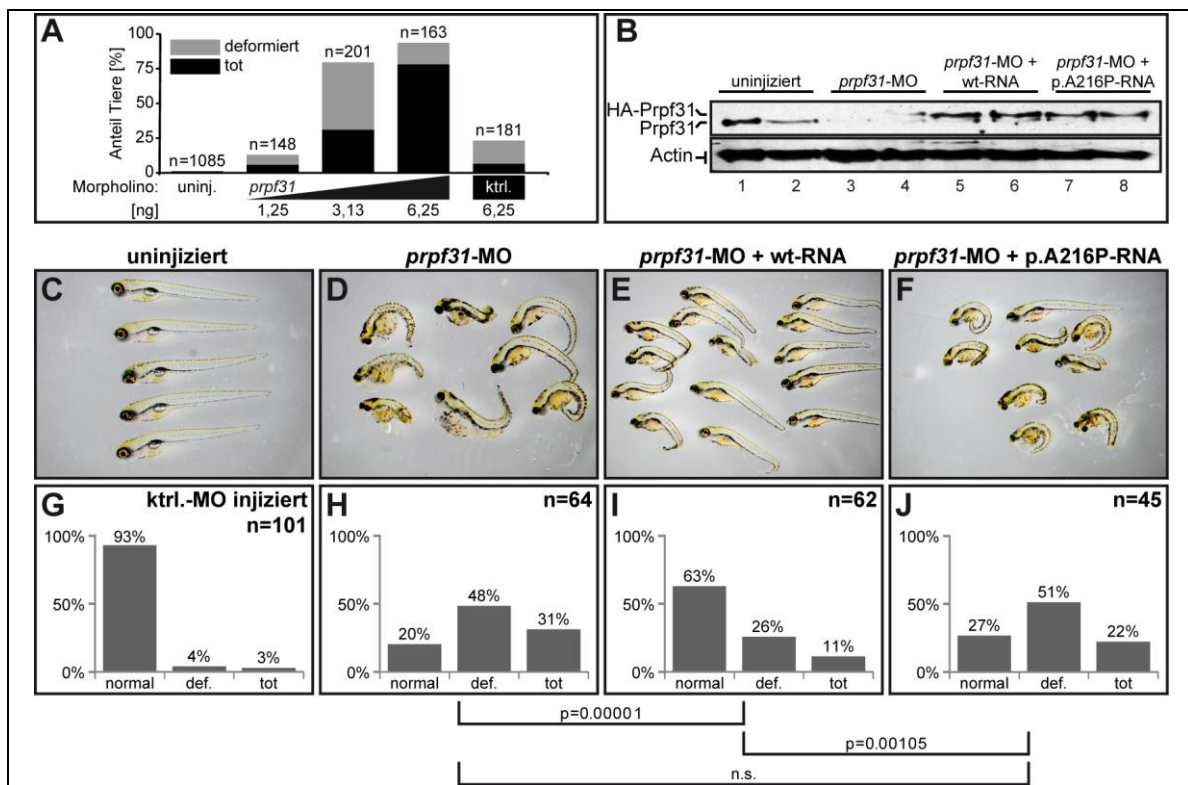


Abbildung 5.1: Die Injektion einer letalen Dosis von *prpf31*-Morpholino wird durch *prpf31*-mRNA gerettet

(A) Konzentrationsabhängigkeit der Letalität. (B) Western-Blot Analyse einzelner Zebrafisch-Larven. Die Injektion einer letalen Dosis (5 ng) von *prpf31*-MO führte zu einer fast kompletten Suppression der Prpf31 Proteinexpression (vgl. Spuren 1 u. 2 mit 3 u. 4). Co-Injektion von wildtypischer (Spuren 5 u. 6) oder RP-mutanter (Spuren 7 u. 8) *prpf31*-mRNA führte zur Expression von HA-Prpf31 in einer Menge die sich nicht wesentlich von der des endogenem Proteins unterschied. (C-F) Phänotyp des letalen Prpf31-Mangels. Übersichtsabbildungen von uninjizierten Kontrollen (C), Larven die mit *prpf31*-Morpholino injiziert wurden (D) und Larven die co-injiziert wurden mit wildtypischer (E) bzw. p.A216P mutanter (F) *prpf31*-mRNA. (G-J) Quantitative Auswertung des Phänotyps aus vier unabhängigen Experimenten. Die Balkengraphen zeigen den Anteil der normal entwickelten (normal), stark deformierten (def.) und toten (tot) Larven bei Injektion mit Kontroll-Morpholino (G) und den verschiedenen *prpf31*-Morpholino Ansätzen (H-J). Sowohl die Verbesserung des Phänotyps durch Co-Injektion von *prpf31* wildtyp mRNA als auch deren Ausbleiben bei Co-Injektion von p.A216P mRNA sind statistisch hochsignifikant (Pearson χ^2 -Test).

embryonal letalen Phänotyp (Abbildung 5.1). Bei einer Dosis von 6,25 ng pro Embryo starben knapp 80% der Larven während der ersten vier Tage nach Befruchtung (days post fertilization; dpf) (Abbildung 5.1 A). Die Injektion von 3,5 ng war ausreichend, um die Expression von Prpf31 fast komplett zu unterdrücken (Abbildung 5.1 B, vgl. Spuren 1, 2 mit Spuren 3, 4). Auch in diesen Larven war der Phänotyp noch deutlich: Bis 4 dpf starben 31% der Larven, 48% waren stark deformiert und nur 20% entwickelten sich augenscheinlich normal (Abbildung 5.1 vgl. C, G mit D, H).

Um zu überprüfen, ob die Letalität nur auf die Prpf31-Reduktion oder auch auf unspezifische Effekte der Injektion des Morpholinos zurückzuführen war, wurden Co-Injektionsexperimente durchgeführt, bei denen zusätzlich eine Morpholino-insensitive, *in vitro* transkribierte *prpf31*-mRNA injiziert wurde. Bei diesen Larven war der Spiegel an endogenem Prpf31 ähnlich niedrig wie in den Morphanten. Die Tiere exprimierten jedoch exogenes, mit dem Hämagglutinin-Epitop fusioniertes Prpf31 (HA-Prpf31) in einer Menge, die der des endogenen Proteins in uninjizierten Tieren glich (Abbildung 5.1 B vgl. Spuren 5, 6 mit 1, 2). Das exogene HA-Prpf31 war in der Lage die Funktion des endogenen Proteins zu übernehmen, da der Phänotyp der co-injizierten Larven deutlich milder war (Abbildung 5.1 E und I). Somit konnte gezeigt werden, dass der letale Phänotyp kein Morpholino-induziertes Artefakt war, sondern eine direkte Folge des Spleißfaktormangels.

Dieses Komplementationssystem ermöglichte es außerdem, Punktmutanten von Prpf31 auf ihre physiologische Aktivität hin zu testen. Dies ist für RP-assoziierte Punktmutationen besonders interessant, da hier der kausale biochemische Defekt oft nicht bekannt ist und – im Gegensatz zu Deletionen, die das ganze *PRPF31* Gen betreffen – die Frage nach einem *gain of function*- oder *loss of function*-Effekt nicht leicht zu beantworten ist. Exemplarisch wurde hier die RP auslösende Mutation p.A216P gewählt (Vithana et al., 2001) und deren Einfluss auf die physiologische Aktivität von Prpf31 getestet. Dafür wurde zusammen mit

dem *prpf31*-MO eine *prpf31*-mRNA co-injiziert, bei der eine korrespondierende Mutation (p.A227P) eingeführt worden war. Die so injizierten Tiere zeigten keine Verbesserung des Phänotyps, obwohl eine ausreichende Menge des mutanten Proteins exprimiert wurde (Abbildung 5.1 B; vgl. Spuren 7, 8 mit 5, 6). Der Phänotyp war aber auch nicht signifikant stärker ausgeprägt als in den nur mit Morpholino injizierten Tieren (Abbildung 5.1 vgl. H mit J). Diese Daten unterstützen daher die Hypothese, dass p.A216P keine dominant negative Mutation ist, sondern zu einem Funktionsverlust *in vivo* führt (Bujakowska et al., 2009). Somit ist der Knockdown von Prpf31 nicht nur ein valides Modell für die Prpf31-Haploinsuffizienz, sondern kann auch Einblicke in den Pathomechanismus von *loss of function*-Punktmutationen wie p.A216P liefern.

5.2 Subletaler Knockdown von Prpf31 führt zu Defekten in der visuellen Wahrnehmung

Um mögliche gewebespezifische Effekte in den mit *prpf31*-Morpholino injizierten Fischen aufzudecken, sollte eine Dosis ermittelt werden, bei der zwar die Prpf31-Expression inhibiert wurde, jedoch keine offensichtlichen

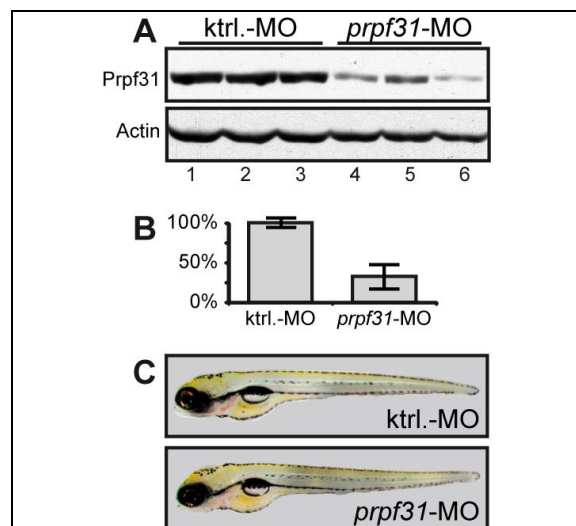


Abbildung 5.2: Der subletale Knockdown von Prpf31 erlaubt eine normale Embryonalentwicklung
(A) Western-Blot einzelner Larven bei 4dpf. Injektion von 2,5 ng *prpf31*-Morpholino führte zu einer um ca. 70% reduzierten Prpf31 Expression.
(B) Densitometrische Auswertung des in (A) gezeigten Blots.
(C) Die zur weiteren Untersuchung verwendeten *prpf31*-Morphanten waren äußerlich nicht von Kontrollen zu unterscheiden.

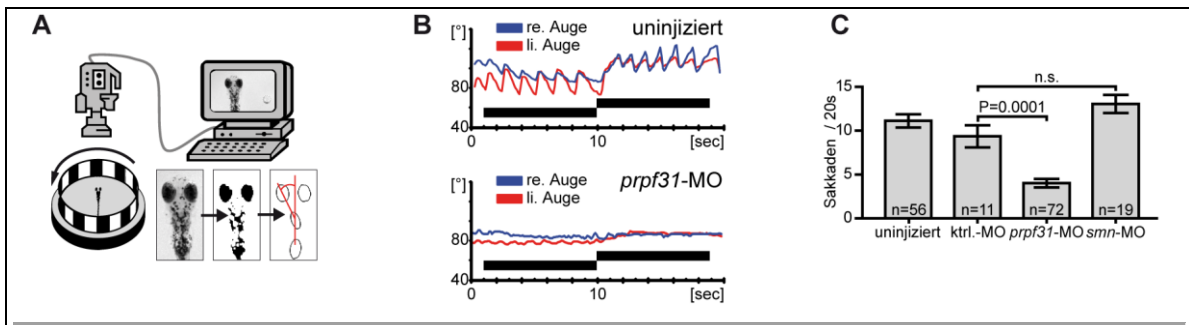


Abbildung 5.3: Der optokinetische Nystagmus ist in *prpf31*-Morphanten stark reduziert

(A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Fixierten Larven wurde ein rotierendes Streifenmuster präsentiert. Die Augenbewegungen wurden aufgezeichnet und ausgewertet. (B) Exemplarische Darstellung der sakkadischen Augenbewegungen. Die Aufzeichnung der Augenwinkel ergibt bei Kontrollen (oben) ein sägezahnartiges Muster, das dem Stimulus (schwarzer Balken) folgt. Bei stark betroffenen Morphanten (unten) fehlen die Sakkaden ganz. (C) Quantitative Auswertung von fünf unabhängigen Experimenten. Uninjizierte und kontroll-Morpholino injizierte Larven sowie *smn*-Morphanten zeigen keine Änderung in der Anzahl der in 20s präsentierten Sakkaden. Bei *prpf31*-Morphanten ist die Anzahl signifikant geringer (ungepaarter *t*-Test).

Schäden in der Embryonalentwicklung auftreten. Dazu wurde die Dosis schrittweise verringert, was mit einem milder werdenden Phänotyp einherging (Abbildung 5.1 A). Bei einer Dosis von 2,5 ng waren die meisten *prpf31*-Morphanten äußerlich nicht von Kontrollen zu unterscheiden, obwohl die Proteinmenge um 70 % reduziert worden war (Abbildung 5.2).

Die normal entwickelten, Prpf31-defizienten Larven wurden vier Tage nach der Befruchtung auf visuelle Defekte untersucht. Dazu wurden verhaltensphysiologische Experimente durchgeführt, die Rückschlüsse auf die Funktion des visuellen Systems erlauben. Der für Zebrafischlarven am besten etablierte Test ist die Analyse des optokinetischen Nystagmus (OKN). Dieser Reflex lässt sich durch einen Bewegungsreiz, der den immobilisierten Larven präsentiert wird, auslösen (Brockerhoff et al., 1995; Neuhauss, 2003; Rinner et al., 2005). Um ein fixiertes Bild auf der Retina aufrechtzuer-

halten, folgen die Augen dem Streifenmuster und schnellen bei Erreichen der maximalen Auslenkung zurück. Diese als Sakkaden bezeichneten Bewegungen wurden aufgezeichnet und sowohl qualitativ als auch quantitativ ausgewertet (Versuchsaufbau siehe Abbildung 5.3 A; siehe auch Material & Methoden).

Während Kontrolltiere Augenbewegungen ausführten, die publizierten Mustern sehr ähnlich waren, fehlten die Sakkaden bei einem Teil der *prpf31*-Morphanten völlig (Abbildung 5.3 B). Bei der quantitativen Auswertung zeigte sich eine deutliche und signifikante Reduktion der durchschnittlichen Sakkadenanzahl gegenüber mit Kontroll-Morpholino injizierten Larven (Abbildung 5.3 C). Als zusätzliche Kontrolle wurden Larven getestet, die mit einem Morpholino injiziert wurden, das gegen die *smn*-mRNA gerichtet war. Der Knockdown dieses snRNP Biogenesefaktors verursacht in Zebrafischlarven Motoneuronendefekte (McWhorter

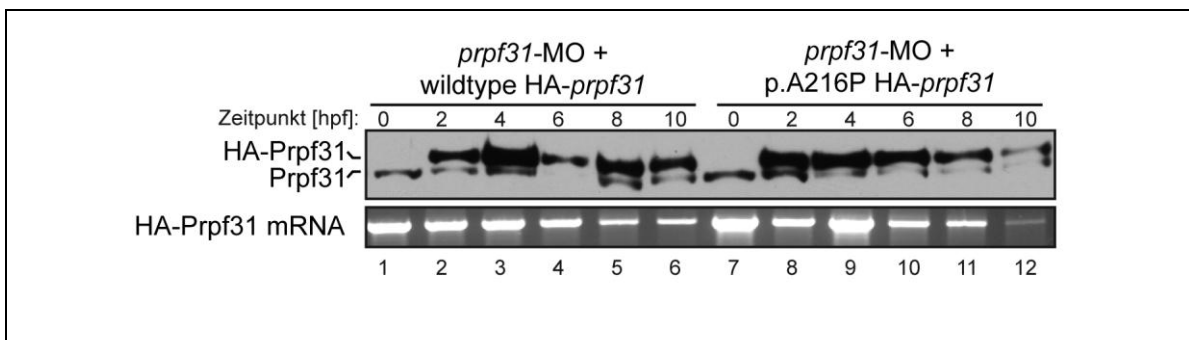


Abbildung 5.4: HA-Prpf31 besitzt eine geringe Halbwertszeit

Western Blot (oben) bzw. RT-PCR (unten) zur Detektion des Prpf31 und HA-Prpf31 Proteins bzw. der HA-*prpf31*-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryonalentwicklung. Die Expression ist bei ca. 2-4 hpf am stärksten, bereits bei 10 hpf ist ein Großteil des exogenen Proteins abgebaut.

et al., 2003; Winkler et al., 2005), hatte jedoch keinen Effekt auf den OKN, was die Spezifität des beobachteten Phänotyps in *prpf31*-Morphanten unterstreicht (Abbildung 5.3 C). Um auch den Einfluss der p.A216P Mutation auf den visuellen Phänotyp untersuchen zu können, wurden Tiere mit wildtypischer und mutanter *prpf31*-mRNA co-injiziert. Es stellte sich hierbei jedoch heraus, dass die Halbwertszeit sowohl der mRNA als auch des exogen exprimierten Proteins sehr gering war und ein Großteil schon nach 10 Stunden abgebaut war (Abbildung 5.4). Da die Entwicklung der Retina in Zebrafischlarven erst bei ungefähr 24 hpf beginnt, entstand so eine Phase der Prpf31-Defizienz, die der Retinaentwicklung voranging. Die Auswirkung der HA-Prpf31 Expression auf den visuellen Phänotyp konnte daher nicht verfolgt werden. Zusammengenommen zeigen diese Daten jedoch deutlich, dass eine systemische Prpf31-Defizienz in der Lage ist, einen spezifischen Defekt im visuellen System des Zebrafisches hervorzurufen.

5.3 Prpf31-Mangel verursacht Defekte in der Morphologie der Photorezeptoren

Das Auslösen des OKN erfordert neben intakten Photorezeptoren auch weitere neuromuskuläre Funktionen. Da deshalb nicht direkt von einem beeinträchtigten OKN auf Defekte in Photorezeptoren geschlossen werden konnte, wurden Retinaschnitte von *prpf31*-Morphanten mittels Immunhistochemie untersucht (Diese Experimente wurden in Kollaboration mit H. Dill durchgeführt). Die Tiere wurden mit einer Morpholinodosis injiziert, die eine normale Embryonalentwicklung erlaubte (Abbildung 5.5 A), und nach vier Tagen wurden transversale Kryomikrotomschnitte der Augen präpariert. Die Detektion der Photorezeptoren erfolgte mit dem monoklonalen 1D4 Antikörper, der gegen ein Epitop aus bovinem Rhodopsin gerichtet ist. Obwohl im Zebrafisch das genaue Antigen dieses Antikörpers noch unbekannt ist, ist er geeignet, die äußeren Segmente der Photorezeptoren zu färben (siehe Anhang). Zur Beurteilung der generellen Struktur der Retina erfolgte eine Gegenfärbung der Zellkerne mit DAPI. Alle

sechs retinalen Schichten waren sowohl in den Kontrollen als auch in den *prpf31*-Morphanten vorhanden (Abbildung 5.5 B und C), obwohl sie in einigen Morphanten weniger deutlich ausgeprägt waren. Im Gegensatz dazu war die 1D4 Färbung in der Photorezeptorzellschicht bei 81% (21/26) der Morphanten drastisch reduziert (Abbildung 5.5 B-E). Die generelle Photorezeptorentwicklung war jedoch nicht beeinträchtigt, wie eine Färbung der Zellkörper der Doppelzapfen-Photorezeptoren mit dem monoklonalen Antikörper zpr1/Fret43 ergab (Larison & Bremiller, 1990). Es konnten keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Prpf31-defizienten Retinae festgestellt werden (Abbildung 5.6 A und B), was darauf hindeutete, dass der Prpf31-Mangel primär die äußeren Segmente beeinträchtigte.

Eine Reihe von histologischen Experimenten bestätigte, dass dieser Phänotyp nicht durch unspezifische Defekte oder Verzögerungen in der Embryonalentwicklung hervorgerufen wurde. Erstens zeigten in situ Hybridisierungen (ISH) mit Sonden gegen *myoD*, *pax2a* und *myf5*

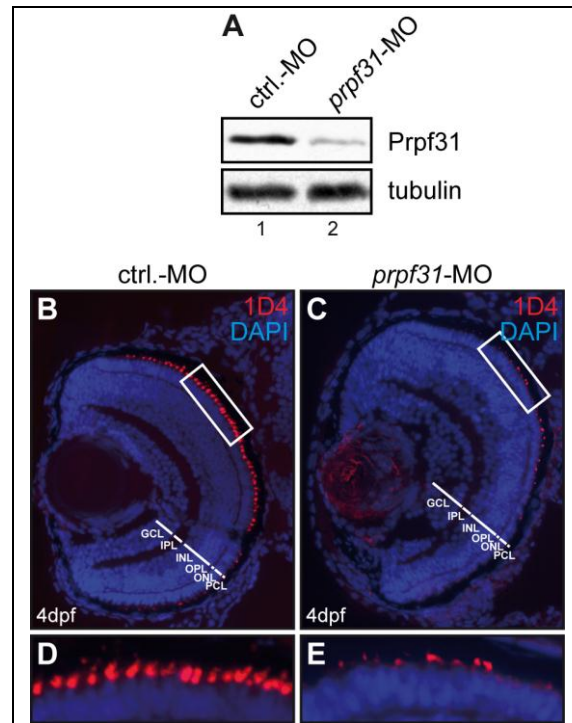


Abbildung 5.5: Photorezeptordefekte in *prpf31*-Morphanten

(A) Reduktion der Prpf31-Expression bei 4 dpf (B-E) Immunhistochemie von retinalen Kryoschnitten von Kontrollen (B) und *prpf31*-Morphanten (C) mit dem 1D4 Antikörper (rot). DAPI-Färbung zeigt die Schichtung der Retina (blau). (D und E) Bei stärkerer Vergrößerung konnten einzelne Photorezeptoren erkannt werden.

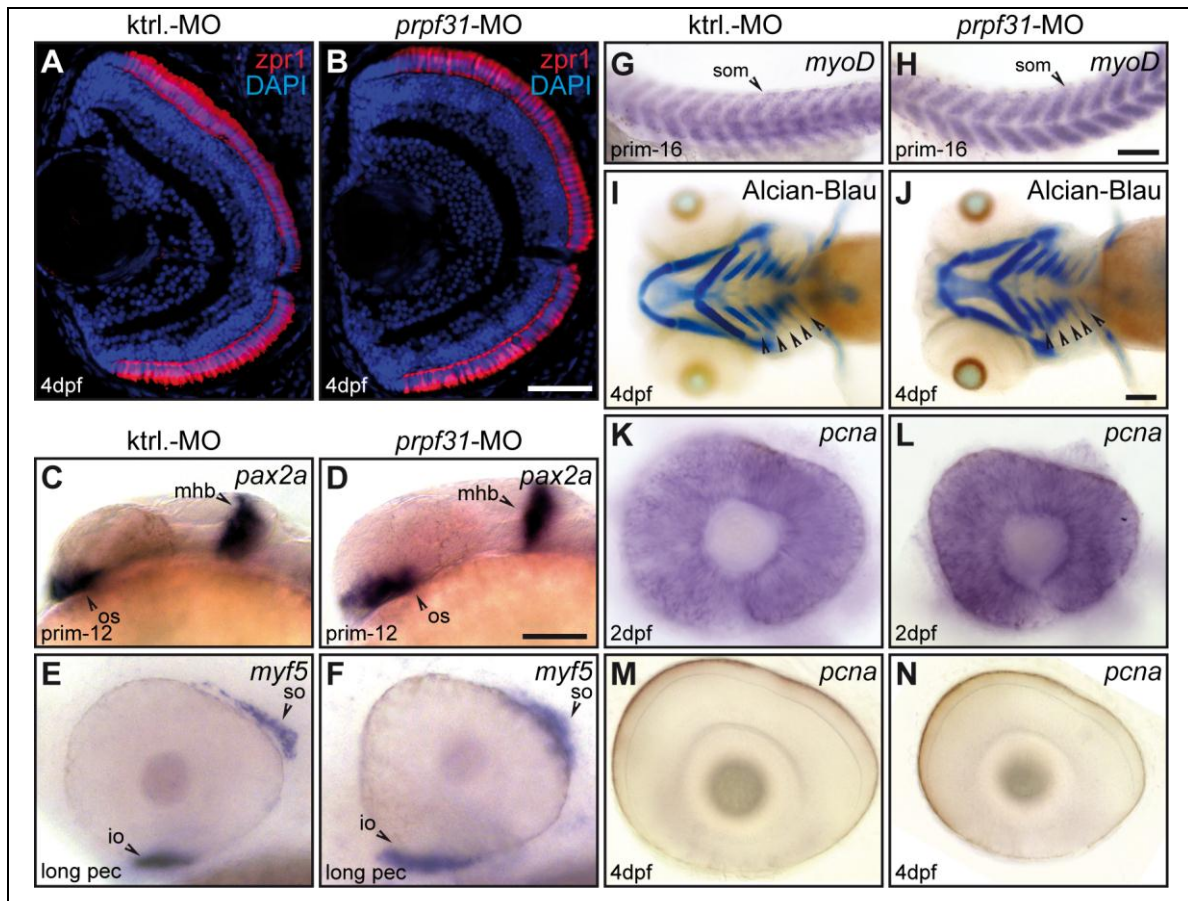


Abbildung 5.6: Kontrollen zur Spezifität des Phänotyps

(A und B) Die Färbung der Doppelzapfenpaar-Photorezeptoren mit dem *zpr1*/FRet43 Antikörper (rot) zeigte keinen Unterschied zwischen Kontrollen (A) und *prpf31*-Morphanten (B). (C-H) Die Expressionsmuster der Marker *pax2a*, *myf5* und *myoD* waren identisch zwischen Kontrollen (C, E, G) und *prpf31*-Morphanten (D, F, H). (I, J) Knorpelfärbung mit Alcian-Blau. Sowohl in Kontrollen (I) als auch in Morphanten (J) waren alle fünf Kiemenbögen vorhanden (Pfeilspitzen). (K-N) In situ Hybridisierung zeigte die *pcna* Expression in den Augen von Kontrollen (K und M) und Morphanten (L und N) bei 2 dpf. Die *pcna* Expression fehlte bei 4 dpf (M und N), was darauf hinweist, dass die meisten Zellen zu diesem Zeitpunkt postmitotisch waren und die Augenentwicklung nicht verzögert war.

die normale Entwicklung von Rumpf, frühen Hirnstrukturen und der Augenmuskulatur (Abbildung 5.6 C-H). Zweitens wurde bei 4 dpf keine entscheidende Verzögerung in der Entwicklung festgestellt, weder durch Auswertung der fünf Kiemenbögen (Abbildung 5.6 I und J) noch durch eine Analyse der mitotischen Zellen im Auge (Abbildung 5.6 K-N). Zusammengefasst zeigen diese Daten einen spezifischen Phänotyp in den äußeren Segmenten von Photorezeptoren.

5.4 Der subletale Knockdown von Prpf31 betrifft vor allem retinaspezifische Transkripte

In Vertebraten sind nahezu alle Gene durch Introns unterbrochen. Daher ist der Verlust eines essentiellen Spleißfaktors prinzipiell in der Lage, die Genexpression auf genomweiter

Ebene zu stören. Es wurde spekuliert, dass bei Spleißfaktor-vermittelter RP speziell retinale Transkripte betroffen sein könnten und so die Spezifität des Phänotyps verursacht wird (Mordes et al., 2006). Da es jedoch bisher nicht möglich war, das Transkriptom spleißfaktordefizienter Photorezeptoren zu untersuchen, beruhte diese Hypothese nur auf indirekten Schlussfolgerungen.

Das hier etablierte Zebrafischmodell bot nun erstmals die Möglichkeit zu einer solchen Analyse. Die direkte Identifizierung von Spleißdefekten wird jedoch dadurch erschwert, dass im Zebrafisch der sogenannte nonsense-mediated decay-Mechanismus (NMD) aktiv ist (Wittkopp et al., 2009). Dieser vermittelt einen sehr schnellen Abbau von ineffizient oder fehlerhaft gespleißten Transkripten und könnte hierdurch Spleißdefekte, die von Mutationen in

Spleißfaktoren hervorgerufen werden, verschleiern (Kawashima et al., 2009). Andererseits sollte es möglich sein, die verringerte Abundanz der betroffenen Transkripte durch einen vergleichenden Microarray nachzuweisen. Deshalb wurde ein genomweiter Array mit verschiedenen markierter cDNA aus den Augen von Kontrollen und Prpf31-defizienten Larven hybridisiert (Die Durchführung des Microarrays erfolgte in Kollaboration mit dem Labor von Christoph Winkler, National University of Singapore).

Interessanterweise waren nur 2,6% der 19.917 Transkripte des Arrays mit einem Faktor größer als 1,5 \times herunterreguliert (Abbildung 5.7 A; eine komplette Liste findet sich im Anhang), was die Hypothese stärkt, dass der Spleißprozess in RP-Patienten nicht generell betroffen ist (Rivolta et al., 2006; Ivings et al., 2008). Dagegen waren retinaspezifische mRNAs besonders betroffen, sie stellten einen Anteil von 8,6% der herunterregulierten Transkripte dar (Abbildung 5.7 B). Um eine Verzerrung durch die Verwendung von „retina-angereichertem“ Gewebe für den Microarray auszuschließen, wurden die Anteile der retinalen Transkripte in der am stärksten betroffenen Gruppe (FC>3 \times) und der Gesamtliste (FC>1,5 \times) bestimmt und verglichen. Retina-spezifische Transkripte waren in der stärker betroffenen Gruppe überrepräsentiert (65% gegenüber 8,6%), was darauf hinwies, dass der Prpf31-Mangel die Expression retinaspezifischer Transkripte tatsächlich besonders stark beeinträchtigte (Abbildung 5.7 B). Auffallend war außerdem, dass viele der betroffenen Transkripte von Genen kodiert werden, die mit RP oder einer anderen Retinopathie assoziiert sind (rot markiert in Abbildung 5.7 A). Es ist also davon auszugehen, dass bereits die gestörte Expressi-

on eines dieser Transkripte für den Retina-Phänotyp verantwortlich sein könnte. Die Herunterregulation einer Auswahl dieser für den Pathomechanismus interessanten mRNAs wurde durch semiquantitative RT-PCR sowie in situ Hybridisierungen bestätigt (Abbildung 5.7 D und E). Dass es sich dabei um unspezifische, durch die Morpholino-Injektion hervorgerufene Effekte handelt, ist unwahrscheinlich, da zumindest einige dieser Transkripte (in Abbildung 5.7 A mit einem Punkt markiert) in einer Zebrafisch-Mutante des tri-snRNP Recyclingfaktors p110 ebenfalls herunterreguliert waren (Trede et al., 2007). Obwohl die beobachteten Defekte in der Genexpression auf eine kleine Gruppe von Transkripten beschränkt waren, lieferte der Microarray auch Hinweise darauf, dass der Prpf31-Knockdown tatsächlich die Spleißmaschinerie beeinträchtigte. Ein starkes Indiz dafür ist die erhöhte Abundanz einer Reihe von Spleißfaktor-Transkripten (Abbildung 5.7 A und C). Solch eine kompensatorische Expressionssteigerung von Spleißfaktor-kodierenden mRNAs ist von Zebrafischlarven mit gestörtem tri-snRNP Recycling bekannt (Trede et al., 2007). Obwohl der genaue Mechanismus und insbesondere der „Sensor“ für eine zu niedrige Aktivität des tri-snRNPs noch unbekannt sind, zeigt dies deutlich, dass in den Prpf31-defizienten Fischen ein defektes tri-snRNP vorliegt.

Zusammengefasst lässt sich also schließen, dass der Prpf31-Mangel das tri-snRNP in einer Weise beeinträchtigt, die spezifisch die Genexpression in Photorezeptorzellen betrifft. Darüber hinaus identifizierte die Microarray-Analyse eine Reihe von Kandidaten, deren fehlerhafte Prozessierung die Ursache für den Retina-Phänotyp darstellen könnte.

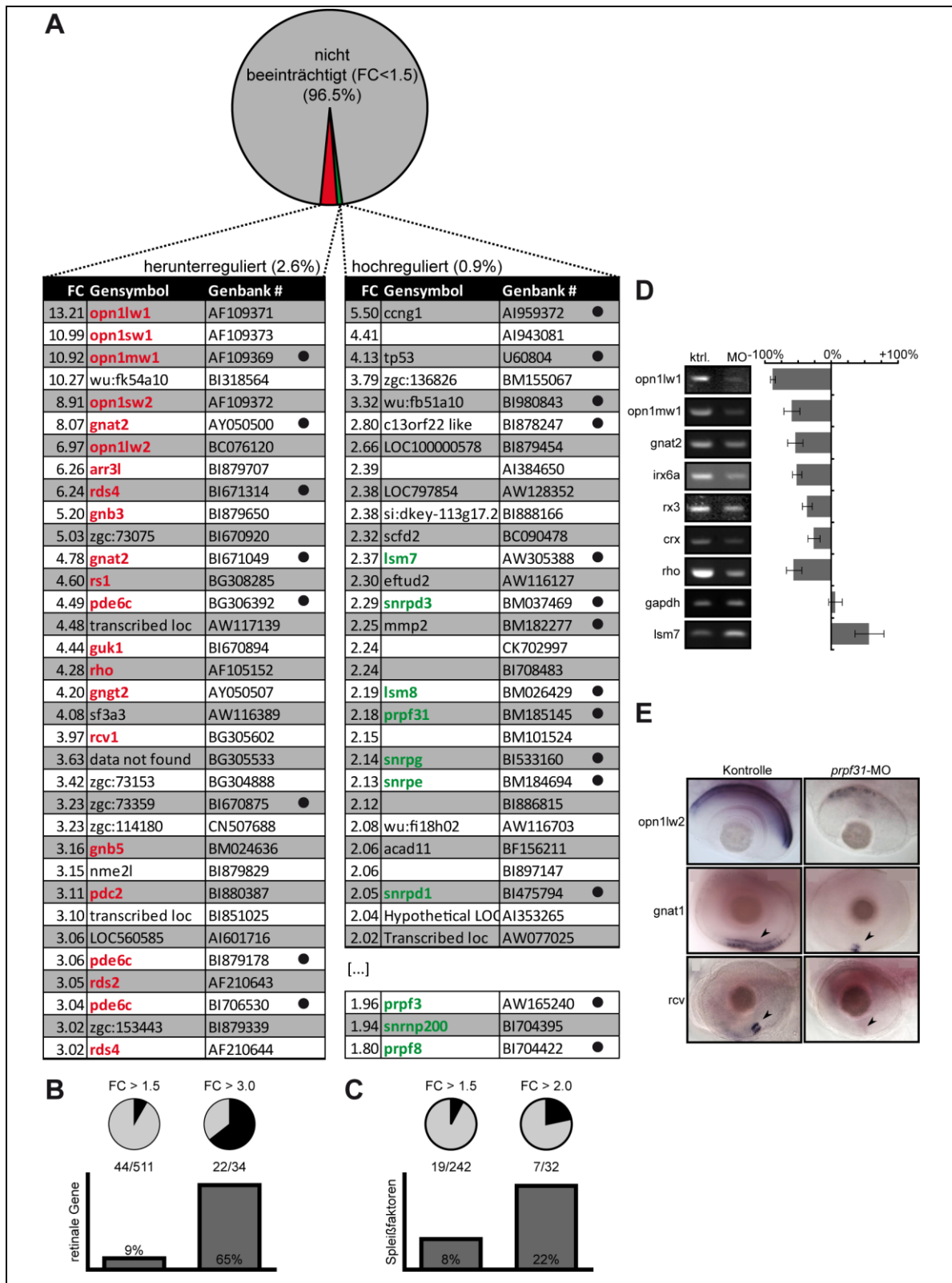


Abbildung 5.7: Microarray-Analyse der Augen Prpf31-defizienter Zebrafischlarven

(A) Ein genomweiter Microarray von *prpf31*-morphanten Augen bei 3dpf zeigte, dass nur ein geringer Teil der Transkripte betroffen war. Die am stärksten herunter- (links; FC > 3×) bzw. hochgultierten (rechts; FC > 2×) Transkripte sind aufgeführt, zusätzlich die RP-assoziierten Spleißfaktoren (komplette Liste im Anhang). Retinale Gene sind rot, Spleißfaktoren grün markiert, Transkripte die in null-Mutanten des snRNP Recyclingfaktors p110 betroffen sind (Trede et al., 2007) mit einem Punkt. (B und C) Retinale Gene (B) und Spleißfaktoren (C) sind in den jeweils am stärksten betroffenen Gruppen angereichert (FC > 3× vs. FC > 1,5×). (D) Verifizierung der Herunterregulation einiger retina-relevanter Transkripte mittels semi-quantitativer RT-PCR. Zur Kontrolle wurden Transkripte des nicht betroffenen, intronhaltigen Haushaltsgens *gapdh* sowie des hochregulierten Spleißfaktors *lsm7* amplifiziert (Mittelwerte aus drei Experimenten; Fehlerbalken: Standardfehler) (E) Kontrolle einiger Microarray-Kandidaten durch ISH im larvalen Auge.

5.5 Prpf4-Mangel verursacht einen Phänotyp, der dem des Prpf31 RP-Modells gleicht

Die Beschreibung von vier Kernkomponenten des tri-snRNPs als RP-Krankheitsgene legte den Verdacht nahe, dass Photorezeptoren generell anfällig gegenüber Defekten in diesem Partikel sein könnten. Um diese Hypothese experimentell zu untersuchen, wurde ein Morpholino-vermittelter Knockdown von Prpf4 durchgeführt - einer tri-snRNP Komponente, die bisher nicht mit RP in Verbindung gebracht worden war. Prpf4 interagiert im tri-snRNP mit dem Proteinprodukt des RP-Krankheitsgens *PRPF3* und ist essentiell für das Spleißen sowie die Zellviabilität (Banroques & Abelson, 1989; Bjorn et al., 1989; Horowitz et al., 1997). Erwartungsgemäß führte die Injektion eines gegen die Translationsstartstelle der *prpf4*-mRNA gerichteten Morpholinos zu einem embryonal letalen Phänotyp, dessen Ausprägung von der injizierten Dosis abhängig war

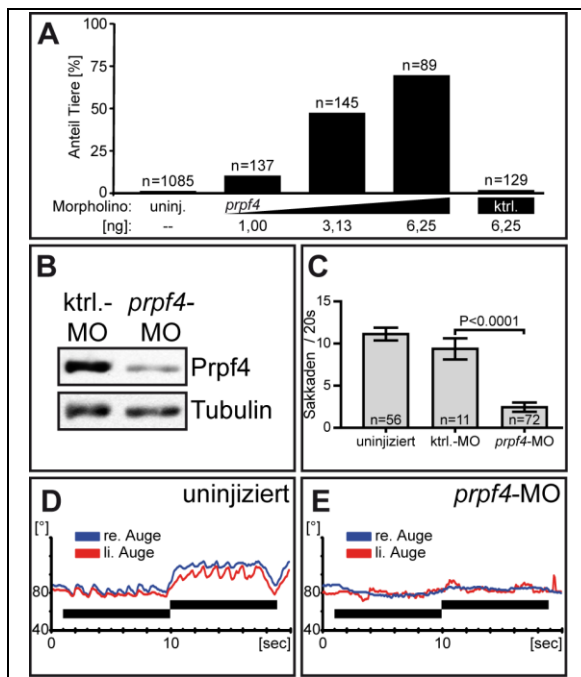


Abbildung 5.8: OKN-Test der *prpf4*-Morphanten

(A) Die Letalität des Prpf4 Knockdowns nimmt mit der Dosis ab; Balken zeigen den Anteil der toten Tiere bei 4 dpf, n = Gesamtzahl der injizierten Tiere (B) Western Blot zur Detektion der reduzierten Prpf4 Expression bei einer Dosis von 1 ng. (C) Die durchschnittliche Sakkadenanzahl ist in *prpf4*-Morphanten stark reduziert (Auswertung wie in Abbildung 5.3). (D und E) Aufzeichnung der Augenbewegungen bei Kontrollen (D) und *prpf4*-Morphanten (E); Kontrollen zeigen deutliche Sakkaden, bei stark betroffenen Morphanten fehlen sie komplett (Auswertung wie in Abbildung 5.3).

(Abbildung 5.8 A). Analog zum oben beschriebenen Vorgehen für Prpf31 wurde auch für Prpf4 eine subletale Dosis an Morpholino ermittelt, bei der die Larven äußerlich unbeeinträchtigt waren, die aber dennoch eine Reduktion der Proteinmenge verursachte (Abbildung 5.8 B). Diese Prpf4-defizienten Larven wurden nach vier Tagen auf das Vorhandensein des OKN getestet. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen Sakkadenanzahl (Abbildung 5.8 C). Wie bei *prpf31*-Morphanten waren bei einigen Tieren überhaupt keine Sakkaden auslösbar (Abbildung 5.8 D und E).

Diese Beobachtung deutete auf einen visuellen Defekt auch in den *prpf4*-Morphanten hin, weshalb ihre Retina mittels Immunhistochemie genauer untersucht wurde (Diese Experimente

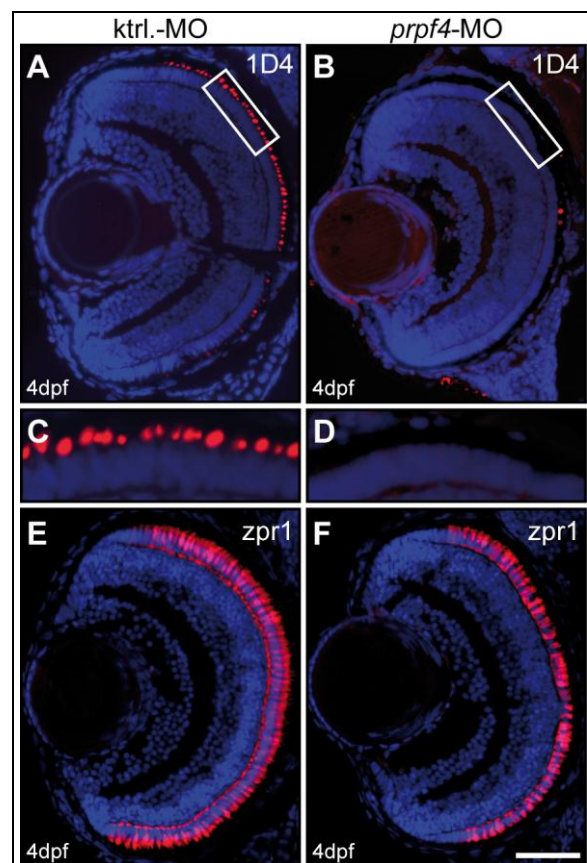


Abbildung 5.9: Photorezeptordefekte in Prpf4-defizienten Zebrafischlarven

(A-D) Transversale Kryoschnitte wurden mit DAPI (blau) und dem 1D4 Antikörper (rot) gefärbt. 1D4 Immunreaktivität war nur in Kontrollen (A), nicht jedoch in den *prpf4*-Morphanten (B) erkennbar. Die Vergrößerung (C und D) zeigt einzelne äußere Segmente. (E und F) Die Färbung der inneren Segmente der Doppelzapfen-Photorezeptoren mit dem FRet43 Antikörper unterscheidet sich nicht zwischen Kontrollen (E) und Morphanten (F).

wurden von A. Hirmer im Rahmen ihrer Diplomarbeit durchgeführt). Tatsächlich zeigte sich in 80% der analysierten Augen (16 / 20) eine drastische Abnahme der 1D4-Färbung in der Photorezeptorzellschicht bei gleichzeitig unversehrter Schichtung der Retina (Abbildung 5.9 A-D). Wie schon in den *prpf31*-Morphanten waren die inneren Segmente der Doppelzapfen-Photorezeptoren nicht betroffen (Abbildung 5.9 E und F). Auch zeigte eine Reihe von Kontrollen, dass der Phänotyp nicht durch Defekte oder Verzögerungen in der Embryonalentwicklung verursacht wurde. Weder gab es Unterschiede in der Expression der Marker *myoD*, *pax2a*, oder *myf5* zwischen Kontrollen und *prpf4*-Morphanten (Abbildung 5.11 A-F) noch waren Verzögerungen in der Ausbildung der Kiemenbögen oder der Retinadifferenzierung zu erkennen (Abbildung 5.11 G-H).

Die *Prpf4*-defizienten Fische waren phänotypisch nicht von *prpf31*-Morphanten zu unterscheiden. Deshalb wurde untersucht, ob auch auf der Ebene der Genexpression Gemeinsamkeiten zwischen den beiden Modellen bestanden. Dazu wurden die RP-relevanten Transkripte *opn1lw1*, *opn1mw1*, *gnat2*, *irx6a*, *rx3*, *crx* und *rhodopsin* sowie die Kontrollen *gapdh* und *lsm7* mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert. Es zeigte sich ein sehr ähnliches Regulationsmuster (Abbildung 5.10), was darauf schließen lässt, dass die molekularen Ereignisse, die Mutationen in Spleißfaktoren mit der Photorezeptordegeneration verbinden, auch durch *Prpf4*-Mangel ausgelöst werden können.

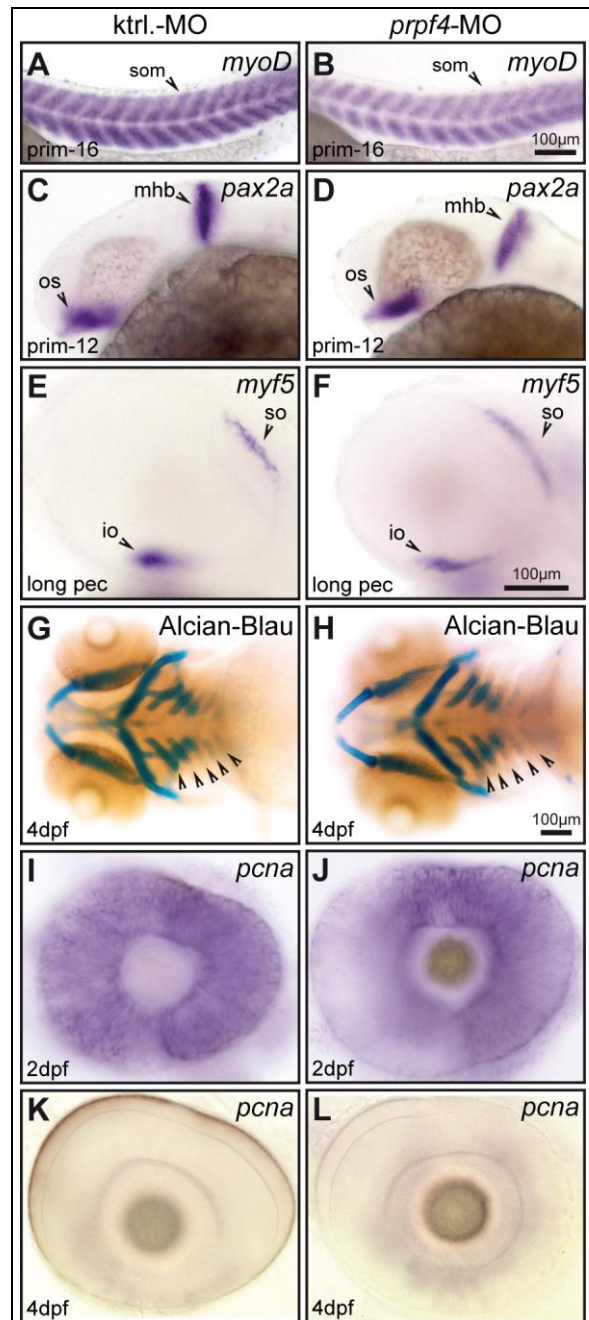


Abbildung 5.11: Subletale *Prpf4*-Morphanten entwickeln sich weitgehend normal
(A-F) Die Expressionsmuster der Marker *pax2a*, *myf5* und *myoD* waren identisch zwischen Kontrollen (A, C, E) und *prpf4*-Morphanten (B, D, F). **(G-L)** Weder die Ausbildung der Kiemenbögen (G und H) noch die Zelldifferenzierung im Auge (I-L) waren signifikant verzögert.

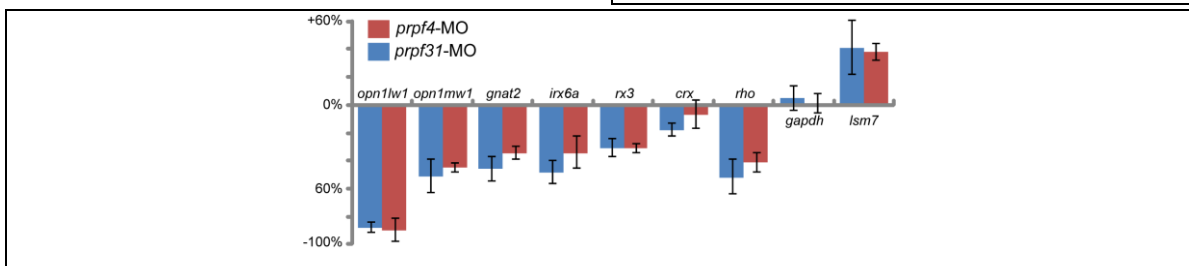


Abbildung 5.10: Regulation RP-relevanter Transkripte im *prpf31*- und *prpf4*-Modell
 Die angegebenen Transkripte wurden mittels RT-PCR amplifiziert und densitometrisch quantifiziert. Dabei zeigte sich in den *prpf31*- und *prpf4*-Morphanten ein fast identisches Regulationsmuster.

5.6 Identifizierung einer Mutation im *PRPF4*-Gen eines RP-Patienten

Da der Prpf4-Mangel im Zebrafisch den gleichen RP-ähnlichen Phänotyp wie in den *prpf31*-Morphanten hervorrief, stellte sich die Frage, ob auch im Menschen Defekte in Prpf4 zu RP führen könnten. Deshalb wurden RP-Familien auf Mutationen in *PRPF4* untersucht (Kollaboration mit Hanno Bolz, Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf). Dabei konnte eine Patientin identifiziert werden, die heterozygote Trägerin einer Punktmutation war, welche auf 118 Chromosomen augengesunder Personen nicht zu finden war (Abbildung 5.12 A). Die C→A Mutation an Position 575 der *PRPF4*-mRNA führt auf Aminosäureebene zum Austausch eines Argininrestes durch ein Histidin an Position 192 (p.R192H). Diese Variante war bereits als Polymorphismus (single nucleotide polymorphism, SNP) in einer Datenbank hinterlegt (dbSNP: rs41296057), allerdings ohne Frequenzinformation. Außerdem fiel auf, dass der betroffene Argininrest in Prpf4

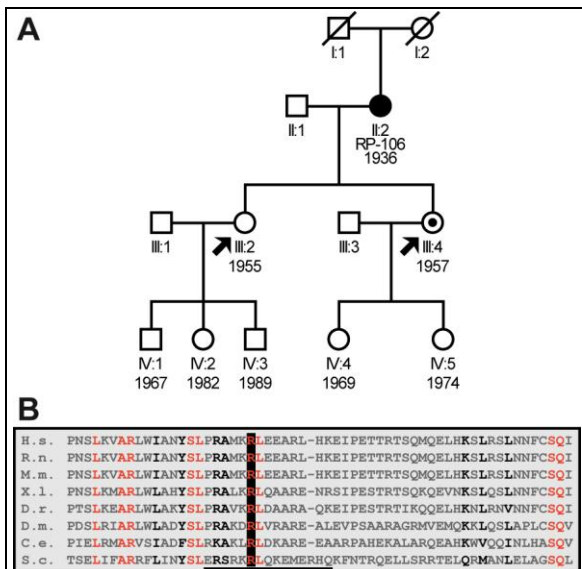


Abbildung 5.12: Stammbaum der p.R192H Familie
(A) RP-106 ist die p.R192H Indexpatientin. Tochter III:2 trägt zwei wildtypische *PRPF4* Allele, Tochter III:4 ist ebenfalls heterozygot für p.R192H, jedoch nicht an RP erkrankt (Trägerin). **(B)** Sequenzalignment des Prpf4-Proteins aus acht verschiedenen Modellorganismen. Konservierte Aminosäuren sind rot dargestellt, ähnliche schwarz. Der Argininrest an Position 192 des humanen Proteins ist schwarz hinterlegt. Der im Hefe-Homolog für die Prpf3-Interaktion essentielle Bereich ist unterstrichen (Ayadi et al., 1998).

evolutionär hochkonserviert ist und sogar im Homolog der Hefe *S. cerevisiae* zu finden ist (Abbildung 5.12 B). In der Hefe führt die Deletion dieses Bereichs zu einem Verlust der Bindung des Interaktors Prpf3 (Ayadi et al., 1997, 1998).

Ein möglicher Einfluss der p.R192H Mutation auf die Interaktion der humanen Proteine Prpf4 und Prpf3 wurde daher biochemisch analysiert. Bei der Immunpräzipitation von Komplexen aus *in vitro* translatiertem Prpf3 und Prpf4 mit einem gegen Prpf3 gerichteten Antikörper (α -Prpf3) zeigte sich, dass p.R192H-Prpf4 nur noch eine sehr geringe Bindungsaktivität aufwies (Abbildung 5.13 A). Die Bindung an Cyp20, einen anderen bekannten direkten Interaktor von Prpf4 (Horowitz et al., 1997; Teigelkamp et al., 1998) war davon jedoch nicht betroffen (Abbildung 5.13 B). Interessanterweise zeigte der Bindungsverlust keinen Effekt auf die subzelluläre Lokalisation des

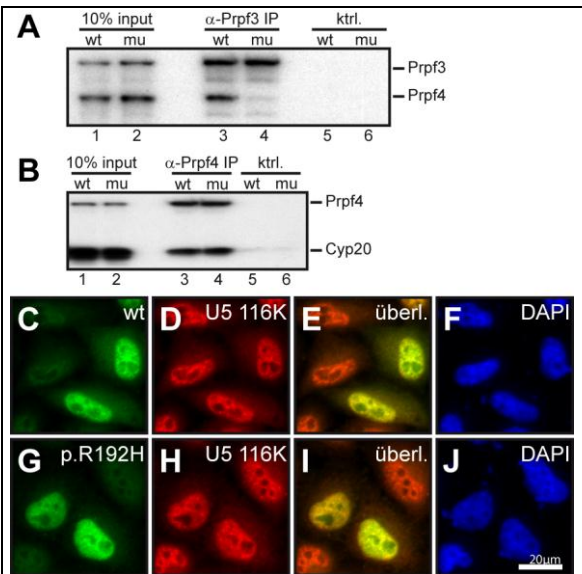


Abbildung 5.13: p.R192H-Prpf4 bindet nicht mehr an Prpf3, lokalisiert aber im Zellkern
(A) Co-Immunpräzipitation von *in vitro* translatiertem Prpf3 und Prpf4. Die 6xHis-markierten Proteine wurden im Retikulozytenlysat co-translatiert und mit α -Prpf3-Antikörpern präzipitiert. Dabei wurde nur wildtyp-Prpf4 effizient mit Prpf3 co-präzipitiert (vgl. Spuren 3 und 4). **(B)** Die Co-Immunpräzipitation von *in vitro* translatiertem Prpf4 und Cyp20 mit einem α -Prpf4 Antikörper zeigte eine von der p.R192H-Mutation unbeeinträchtigte Interaktion. **(C-J)** HeLa-Zellen wurden mit wildtypischem (C-F) oder p.R192H-mutiertem (G-J) HA-Prpf4 transfiziert. Immunfärbung mit α -HA-Antikörper (C, G) zeigte eine Lokalisation im Kern, wo beide Varianten mit dem Spleißfaktor U5-116K co-lokalisierten (D-I). Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (F, J)

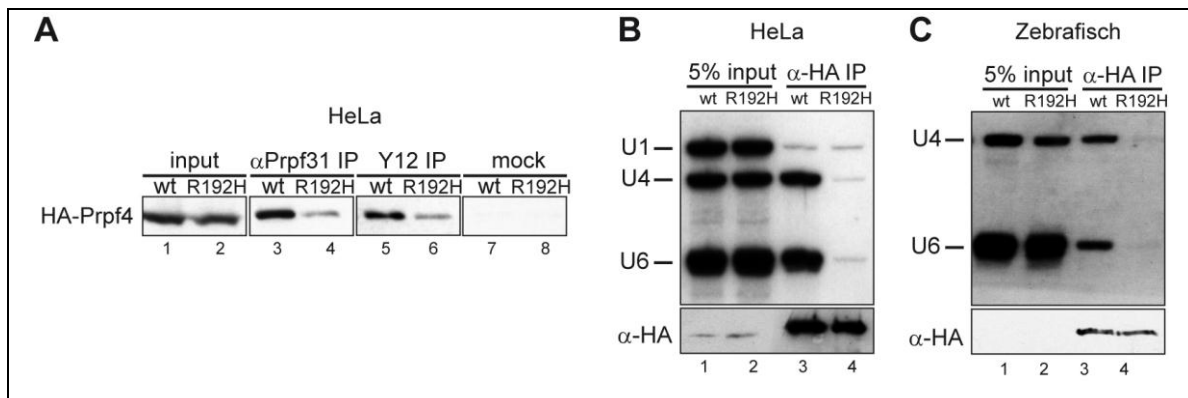


Abbildung 5.14: RP-mutantes p.R192H-Prpf4 integriert nicht mehr in snRNPs

(A) IP von snRNPs aus Extrakt von HA-Prpf4-transfizierten HEK293-Zellen mit α Prpf31- (Spuren 3 und 4) oder Y12-Antikörpern (Spuren 5 und 6). Obwohl wildtyp- und p.R192H-Prpf4 ähnlich stark Exprimiert waren (Spuren 1 und 2), co-präzipitierte deutlich mehr wildtypisches HA-Prpf4 mit snRNPs (vgl. Spur 3 mit 4 bzw. 5 mit 6). **(B)** IP von HA-Prpf4 aus transfizierten HEK293 Zellen. Northern-Blot Analyse der co-präzipitierten snRNAs zeigte, dass die tri-snRNP snRNAs U4 und U6 nur mit wildtyp-Prpf4 assoziiert waren. U1 snRNA diente als Spezifitätskontrolle und wurde nicht co-präzipitiert. Eine gleichmäßige Transfektions- und IP-Effizienz wurde durch α HA Western-Blot überprüft. **(C)** IP von Zebrafisch HA-Prpf4 aus *prpf4*-mRNA injizierten Embryo-Extrakten. Auch hier assoziierten die snRNAs U4 und U6 nur mit dem wildtyp-Protein. Obwohl die HA-Prpf4 Menge im Input unter der Detektionsgrenze lag, wurden gleiche Proteinmengen immunpräzipitiert (α HA, Spuren 3 und 4).

mutierten Proteins. Wie Transfektionsstudien in HeLa-Zellen ergaben, lokalisiert exogenes, p.R192H mutantes HA-Prpf4 genau wie sein wildtyp-Gegenpart im Zellkern in dem für Spleißfaktoren typischen „speckled pattern“ (Lamond & Spector, 2003; Abbildung 5.13 C-J).

Als nächstes wurde der Frage nachgegangen, ob p.R192H-Prpf4 *in vivo* noch in snRNPs integriert wird. Dazu wurden Co-Immunpräzipitationsstudien aus Extrakten transient transfizierter Kulturzellen durchgeführt. Bei der Präzipitation der Gesamtpopulation von snRNPs der Sm-Klasse mit einem gegen methylierte Sm-Proteine gerichteten Antikörper (Y12) wurde die wildtyp-Form des transfizierten HA-Prpf4 wesentlich effizienter co-präzipitiert (Abbildung 5.14 A). Das gleiche war bei der selektiven Präzipitation des di- bzw. tri-snRNPs mit einem α -Prpf31 Antikörper der Fall (Abbildung 5.14 A). Um diesen Interaktionsverlust auch in einem umgekehrten Versuchsansatz nachzuweisen, wurde HA-Prpf4 direkt immunpräzipitiert, und co-präzipitierte snRNAs wurden mittels Northern-Blot analysiert. Dabei zeigte sich, dass die snRNAs U4 und U6 des tri-snRNPs nur mit dem wildtypischen Protein assoziiert waren (Abbildung 5.14 B). Aus den gewonnenen Daten kann geschlossen werden, dass die p.R192H-Mutation nicht die nukleäre Lokalisation von Prpf4 beeinträchtigt,

wohl aber die Interaktion mit Prpf3 und die Integration des Proteins in snRNPs. Um diese Beobachtung auch im Zebrafischsystem zu verifizieren, wurde die Immunpräzipitation mit Extrakt aus Zebrafischembryonen wiederholt, die mit einem gegen das endogene *prpf4*-Transkript gerichteten Morpholino (*prpf4*-Morpholino) sowie einer *in vitro* transkribierten *prpf4*-mRNA co-injiziert wurden. Die Morpholino-resistente mRNA codierte für HA-epitopmarkiertes Zebrafisch-Prpf4 (HA-Prpf4), entweder in wildtypischer Form oder mit einer Punktmutation, die dem humanen p.R192H-Austausch entsprach (p.R178H). Auch in diesem Fall konnten die snRNAs U4 und U6 nur mit dem wildtypischen, nicht jedoch mit dem mutanten Protein co-präzipitiert werden (Abbildung 5.14 C).

5.7 p.R192H-Prpf4 ist nicht mehr funktionell

Da hiermit der snRNP-Integrationsdefekt auch im Zebrafisch nachgewiesen wurde, konnte nun untersucht werden, ob dieser biochemische Defekt auch die physiologische Funktion des Proteins im Kontext eines Organismus beeinträchtigte. Zunächst sollte geklärt werden, ob p.R192H-Prpf4 einen dominant negativen Effekt hat. Dies war denkbar, da der Verlust der Bindung an Prpf3 und snRNPs bei

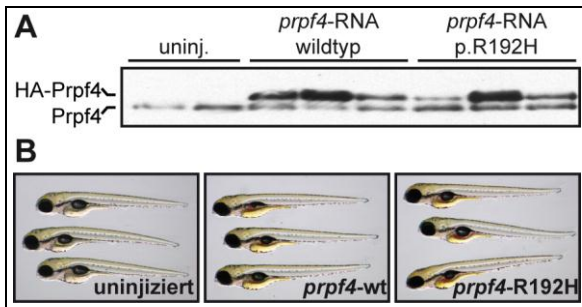


Abbildung 5.15: Prpf4-p.R192H ist nicht dominant negativ.

(A) Western Blot Analyse einzelner Larven mit α Prpf4 Antikörper. HA-Prpf4 wurde stärker exprimiert als endogenes Prpf4. (B) Überexpression von HA-Prpf4 in wildtypischer oder p.R192H mutanter Form hatte keinen Einfluss auf die Embryonalentwicklung.

gleichzeitig unbeeinträchtigt Interaktion mit Cyp20 dieses theoretisch von seiner Einbindung in das tri-snRNP abhalten könnte. Überexpression von exogenem HA-Prpf4 in mutanter Form führte in Zebrafischlarven jedoch nicht zu Entwicklungsdefekten (Abbildung 5.15), so dass es unwahrscheinlich erscheint, dass das mutierte Protein einen toxischen „gain of function“-Effekt auf den Spleißmechanismus hat.

Zum Nachweis eines potentiellen Funktionsverlusts wurden daher Komplementationsexperimente analog zu den für Prpf31 etablierten Versuchen durchgeführt. Embryonen wurden mit einer letalen Dosis *prpf4*-Morpholino und wildtyp- oder p.R192H *prpf4*-mRNA co-injiziert und der Phänotyp nach vier Tagen untersucht. Sowohl wildtypisches als auch p.R192H mutantes HA-Prpf4 wurden in einer mit endogenem Prpf4 vergleichbaren Menge exprimiert (Abbildung 5.16 A). Nur wildtypisches Protein führte jedoch zu einer Verbesserung des Phänotyps (Abbildung 5.16 D und H). Expression von p.R192H-Prpf4 führte aber auch nicht zu einer Zunahme von Deformationen oder der Letalität (Abbildung 5.16 D und H), was ebenfalls gegen einen dominant negativen Effekt spricht. Zusammengefasst zeigen die Daten, dass die p.R192H Mutation von Prpf4 dessen Bindung an Prpf3 beeinträchtigt, was zu einem Defekt in der snRNP-Integration führt und einem Funktionsverlust gleichkommt. Deshalb ist die in einer RP-Patientin identifizierte *PRPF4*-Variante p.R192H höchstwahrscheinlich ein Nullallel.

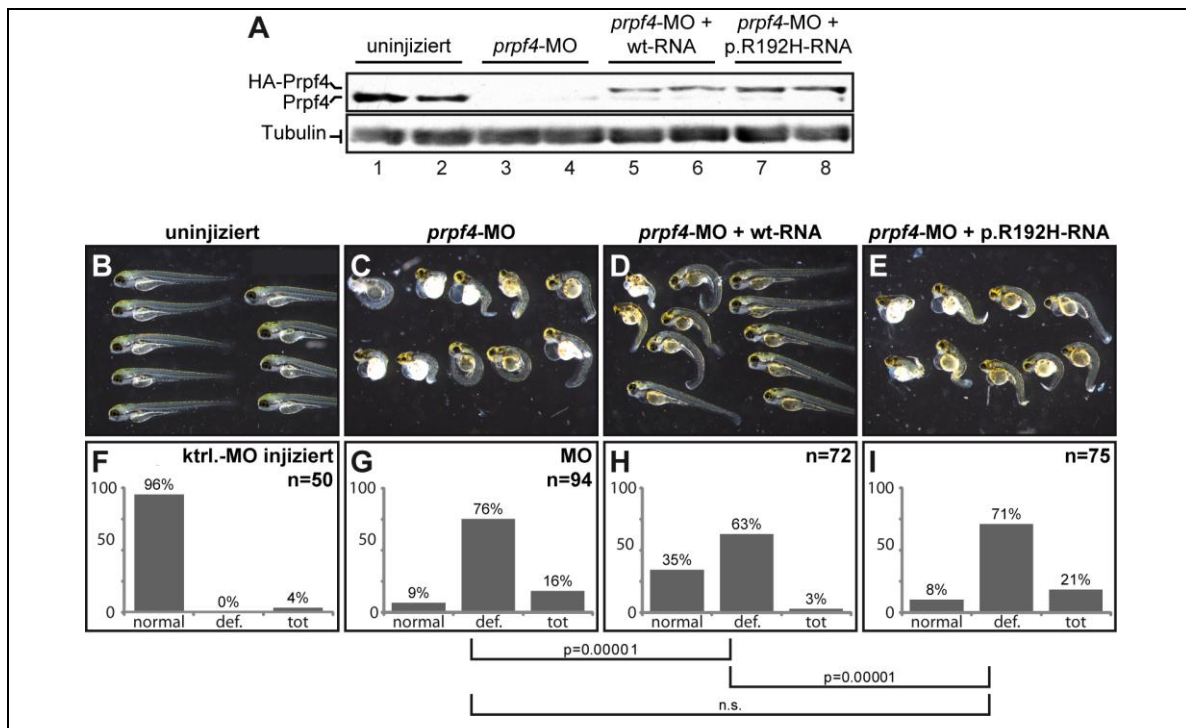


Abbildung 5.16: Die Mutation p.R192H führt zu einem Funktionsverlust von Prpf4

(A) Western Blot einzelner Larven mit α Prpf4-Antikörper. (B-E) Letaler Phänotyp der Morphanten (C) sowie abgemilderter Phänotyp durch die Co-Injektion von wildtyp- (D), nicht jedoch p.R192H-*prpf4*-mRNA (E). (F-I) Quantitative Auswertung des Effektes der verschiedenen Injektionen wie in Abbildung 5.1 beschrieben.

6 Diskussion

Um die Mechanismen zu analysieren, durch die Defekte in generellen Spleißfaktoren einen gewebespezifischen Phänotyp hervorrufen, wurden in dieser Arbeit Zebrafischmodelle für den systemischen Mangel an Prpf31 und Prpf4 entwickelt. Den ersten Teil der Arbeit bildete dabei die Charakterisierung Prpf31-defizienter Fische. Es konnte gezeigt werden, dass eine RP-verursachende Punktmutation auch im Zebrafisch homolog zu einem Funktionsverlust führt. Fische mit einem Mangel an Prpf31 zeigten Störungen im Sehvermögen und in der Morphologie ihrer Photorezeptoren. Die Augen dieser Fische wurden dann zur Analyse des Transkriptoms spleißfaktordefizienter Photorezeptoren herangezogen. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Frage, ob auch Defekte in anderen, bisher nicht mit RP in Verbindung gebrachten tri-snRNP Spleißfaktoren zur Photorezeptordegeneration führen können. Dabei wurde festgestellt, dass auch ein Mangel an Prpf4 im Fisch zu einer Beeinträchtigung von Sehvermögen und Photorezeptormorphologie führt. Außerdem konnte eine Variante von Prpf4, die in einem RP-Patienten identifiziert wurde, als *loss of function*-Mutante charakterisiert werden.

6.1.1 Der Zebrafisch als RP-Modell

Der Phänotyp der Zebrafischlarven mit Prpf31- oder Prpf4-Defizienz war dem von RP-Patienten bemerkenswert ähnlich. Erstens war die Morphologie der Photorezeptoren stark beeinträchtigt, wie die reduzierte Färbung der äußeren Segmente mit dem 1D4 Antikörper deutlich machte (Abbildung 5.5 und Abbildung 5.9). Welches der fünf in der Zebrafisch-Retina exprimierten Opsine durch den Antikörper erkannt wird, ist zwar noch nicht abschließend geklärt (siehe Anhang), die Immunfärbungen legen aber den Schluss nahe, dass die Integrität der äußeren Segmente oder die Expression des Opsins selbst gestört war. Trotz der in der DAPI-Färbung nicht drastisch verminderten Anzahl an Zellkernen in der ONL der Tiere (Abbildung 5.5 und Abbildung 5.9) ist sogar denkbar, dass der betroffene Photorezeptortyp komplett fehlte, da in einem solchen Fall eine

kompensatorische Entwicklung der anderen Rezeptortypen möglich sein könnte (Haider et al., 2001). Zum Zweiten zeigen die OKN-Daten, dass auch die Funktion der Photorezeptoren beeinträchtigt war. Dies betraf in erster Linie die Zapfen, da der OKN bei Larven des untersuchten Stadiums überwiegend durch diese Zellen vermittelt wird (Bilotta et al., 2001). Drittens waren die beobachteten Defekte hochspezifisch für die Retina, denn trotz detaillierter Analyse konnten keine schweren Anomalien oder Verzögerungen in der allgemeinen Embryonalentwicklung festgestellt werden. Zusammengefasst entspricht das Zebrafischmodell daher einem späten Stadium der RP mit ausgeprägter Stäbchen-Zapfen-Dystrophie.

Durch die gute Zugänglichkeit des visuellen Systems des Zebrafisches eröffnet sich damit die Möglichkeit zu einer Reihe weitergehender Analysen. Initial wäre die Frage zu klären ob der Phänotyp durch einen spezifischen Entwicklungsdefekt verursacht wird, oder – wie beim Menschen – die Folge einer Degeneration der Photorezeptoren ist. Die schnelle Entwicklung der Zebrafischretina lässt dabei grundsätzlich beide Möglichkeiten zu, erschwert jedoch auch die genaue Untersuchung der zeitlichen Abläufe. Eine weitere wichtige Frage ist das Verhältnis zwischen den Photorezeptoren und dem RPE. Da die Regeneration des Sehpigments im RPE stattfindet ist ein funktionstüchtiges RPE für das Überleben der Photorezeptorzellen unabdingbar (Bok, 1985). Tatsächlich sind RP-Krankheitsgene bekannt, die nicht in Photorezeptoren sondern im RPE exprimiert sind (Morimura et al., 1998). Prinzipiell könnten auch Spleißfaktordefekte zunächst dem RPE schaden, bevor dann sekundär Photorezeptoren zugrunde gehen. Erste Hinweise auf einen solchen Mechanismus wurden in der Retina spleißfaktordefizienter Mäuse gefunden (Graziotto et al., 2011). Mit dem hier etablierten Zebrafischmodell können diese Ergebnisse nun in einer funktionell zapfendominierten Retina verifiziert werden, die sowohl für Ultrastrukturanalysen als auch für die Elektrophysiologie geeignet ist (Easter & Nicola, 1996;

Schmitt & Dowling, 1999; Seeliger et al., 2002; Fleisch et al., 2008).

Eine weitere Frage, die nun im Zebrafischmodell experimentell untersucht werden kann, ist die Rolle des *p53*-vermittelten Zelltods bei der Photorezeptordegeneration. Noch ist unklar, ob die Hemmung dieses Signalweges die Degeneration verlangsamen kann (Sancho-Pelluz et al., 2008). Untersuchungen an Mausmodellen der „klassischen“ RP zeigten widersprüchliche Ergebnisse (Ali et al., 1998; Hopp et al., 1998). In den *prpf31*-Morphanten werden wichtige Komponenten des *p53*-Signalwegs verstärkt exprimiert (*ccng1*, *tp53*, *mmp2*; Abbildung 5.7), was andeutet, dass dieser aktiviert ist. Obwohl die *p53*-Aktivierung unspezifisch durch Morpholino-Injektion hervorgerufen werden kann (Robu et al., 2007), ist sie hier wahrscheinlich durch tri-snRNP-Defekte induziert, da der Effekt auch in Mutanten des Recyclingfaktors *p110* auftritt (Trede et al., 2007). Ob es sich dabei aber um ein Begleitphänomen oder tatsächlich um eine Ursache für den Tod der Photorezeptoren handelt, müssen weitere Experimente zeigen. Geeignet wäre dazu beispielsweise die in Zebrafischlarven bereits etablierte zielgerichtete Inhibierung des *p53*-Signalweges durch ein gegen *p53*-mRNA gerichtetes Morpholino (Robu et al., 2007).

6.1.2 Ein gestörter tri-snRNP-Metabolismus löst den RP-Pathomechanismus aus

Kürzlich wurde beschrieben, dass Mäuse, die heterozygote Träger einer Knockout-Mutation von *PRPF31* oder *PRPF3* sind, bis zu einem Alter von zwei Jahren keine Degeneration der Photorezeptoren aufweisen (Graziotto et al., 2008; Bujakowska et al., 2009). Eine Ursache hierfür könnte in der von Stäbchen dominierten Retina der nachtaktiven Mäuse liegen (Carter-Dawson & Lavail, 1979; Jeon et al., 1998), die Schäden an diesen Zellen eventuell besser kompensieren kann als die zapfendominierte Retina von tagaktiven Vertebraten wie Mensch und Zebrafisch. Es gibt aber einen weiteren fundamentalen Unterschied zwischen den heterozygoten Knockout-Mutanten und

den hier etablierten Zebrafisch-Morphanten: Die Menge an verbleibendem Prpf31 war in den letztgenannten deutlich geringer. Sie lag unter den durch heterozygoten Knockout erreichbaren 50%, da das Morpholino die Transkripte beider Allele reprimiert (Abbildung 5.2). Insbesondere wird so auch der kompensatorischen transkriptionellen Aktivierung von Spleißfaktoren entgegengewirkt, die für tri-snRNP Defekte beschrieben ist (Trede et al., 2007) und die auch in den *prpf31*-Morphanten aktiv zu sein scheint (Abbildung 5.7 C). Es lässt sich daher folgern, dass ein Mangel an Prpf31 die Funktion des tri-snRNPs und/oder des Spleißosoms in der Zelle beeinträchtigen kann, wenn er einen Schwellenwert von ungefähr 50% unterschreitet. Diese Hypothese wurde bereits bei RP-Familien aufgestellt, in denen die Penetranz einer heterozygoten *PRPF31*-Nullmutation mit einem niedrig exprimierten wildtyp-Allel korrelierte (Vithana et al., 2003; Rivolta et al., 2006), sie konnte jedoch bisher nie experimentell validiert werden.

Die molekularen Folgen eines solchen Prpf31-Mangels auf das tri-snRNP sind bisher nur wenig verstanden. Experimente in kultivierten Säugerzellen oder in Zellextrakten *in vitro* zeigten zwar, dass das komplette Fehlen von Prpf31 die Biogenese und Stabilität des tri-snRNPs beeinträchtigen kann (Makarova et al., 2002; Schaffert et al., 2004). Eine neue Studie legt aber nahe, dass eine partielle Reduktion sehr wahrscheinlich zu subtileren Defekten führt (Tanackovic et al., 2011b). So ergab hierbei die Dichtegradientenzentrifugation von Kernextrakten aus immortalisierten RP-Patientenfibroblasten, dass trotz verminderter Prpf31-Expression tri-snRNPs gebildet wurden, deren Gesamtmasse der von tri-snRNPs aus Kontrollzellen ähnlich war. Allerdings waren in diesen snRNPs andere Komponenten wie Prpf3 oder Prpf8 unterrepräsentiert, was auf einen ineffizienteren und/oder unvollständigen Zusammenbau der Partikel schließen lässt. Prinzipiell sollten derartige Analysen der snRNP-Zusammensetzung auch in Zebrafischlarven möglich sein, da geeignete Extrakte präpariert werden können (Abbildung 5.14 C). Dies würde eine gezielte und systematische Untersuchung der Defizienz an bestimmten

Spleißfaktoren auf die Zusammensetzung des tri-snRNPs erlauben.

Umgekehrt kann auch die Übertragung der im Zebrafisch gewonnenen Ergebnisse auf Patientenzellen zur Aufklärung der RP-Mechanismen beitragen. Insbesondere die Untersuchung der kompensatorischen Heraufregulation von Spleißfaktoren ist hier von Interesse, da in den Fibroblasten keine solche Steigerung der Spleißfaktorexpression festgestellt wurde (Tanackovic et al., 2011b). Ein gestörter Kompensationsmechanismus könnte daher an der Entstehung des zu RP führenden Spleißfaktormangels beteiligt sein.

6.1.3 Ineffizientes Spleißen von Photorezeptor-Transkripten als mögliche Ursache von RP

Zu Beginn dieser Arbeit war gänzlich unbekannt, wie sich Schäden am tri-snRNP auf den RNA-Metabolismus von Photorezeptoren auswirken. Die im Zebrafischmodell gewonnenen Daten zeigen, dass mRNAs nicht auf genomweiter Ebene betroffen sind. Die Expression von über 96% der auf dem Microarray vorhandenen Transkripte war nicht signifikant verändert, was gegen ein umfassendes Fehlspleißen spricht (Abbildung 5.7). Während der Durchführung dieser Arbeit wurde eine ähnliche Beobachtung in Zelllinien aus immortalisierten Fibroblasten von RP-Patienten mit reduzierter *PRPF31* Expression gemacht (Rivolta et al., 2006). Von den 4682 untersuchten Transkripten war hier neben *PRPF31* selbst nur ein weiteres betroffen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass ein partieller Prpf31-Mangel die Aktivität des tri-snRNPs weder im Zebrafisch noch im Menschen in einer Weise beeinträchtigt, die das Spleißen aller Introns betrifft. Trotzdem waren in den Augen Prpf31-defizienter Fische mehr als 500 Transkripte in ihrer Expression reduziert (Abbildung 5.7). Viele dieser mRNAs sind spezifisch für Photorezeptoren oder retinale Zellen (Abbildung 5.7 B). Dies erklärt, warum sie in der Transkriptomanalyse der Patientenfibroblasten nicht detektiert werden konnten, und macht sie zu guten Kandidaten für die Vermittlung des gewebespezifischen Phäno-

typs. Unklar ist aber, weshalb die Expression dieser mRNAs beeinträchtigt ist. Eine der naheliegendsten und attraktivsten Hypothesen ist, dass sie aufgrund eines beschädigten tri-snRNPs fehlerhaft oder ineffizient gespleißt werden. Die aus dem Zebrafischmodell gewonnenen Ergebnisse sind konsistent mit einem solchen Modell:

- Da der Phänotyp durch einen Mangel an Prpf31 hervorgerufen wurde, sind dominant negative Effekte auf andere Prozesse ausgeschlossen (Abbildung 5.2 A).
- Die kompensatorische Erhöhung der Expression von Komponenten des tri-snRNPs zeigt, dass dessen Metabolismus und/oder Aktivität beeinträchtigt war (Abbildung 5.7).
- Der durch den Knockdown eines bisher nicht mit RP assoziierten Spleißfaktors induzierte tri-snRNP Defekt führte ebenfalls zur kompensatorischen Gegenregulation und beeinträchtigte die Expression photorezeptorspezifischer Transkripte (Abbildung 5.10).

Obwohl bereits die Hypothese aufgestellt worden war, dass auch im Menschen Fehler im Spleißen von Photorezeptor-Transkripten zu RP führen (Mordes et al., 2006), kennt man bis heute kein Intron, das dort tatsächlich *in vivo* betroffen ist. Als vielversprechender Kandidat für die Vermittlung des Phänotyps gilt das Rhodopsin-Transkript, da es äußerst abundant ist, zirkadiane Spitzen in der Expression zeigt und selbst RP-Krankheitsgen ist (Kisselev, 2005; von Schantz et al., 1999; Rosenfeld et al., 1992). Die Untersuchung eines Minigen-Reporters mit einem Rhodopsin-Intron ergab auch, dass dessen Spleißen in HEK293-Zellen durch co-Expression von Prpf31 mit RP-Mutationen beeinträchtigt werden kann (Yuan et al., 2005). Später wurde jedoch gezeigt, dass das gleiche Intron in einer vollständigen Rhodopsin prä-mRNA mit allen Exons und Introns nicht betroffen ist (Wilkie et al., 2008). Die daraus resultierende Vermutung, dass das fehlerhafte Spleißen der Rhodopsin prä-mRNA nicht die Ursache für die Degeneration der

Photorezeptoren ist, wird durch das Zebrafischmodell untermauert, da hier das Rhodopsin-Gen keine Introns enthält (Fitzgibbon et al., 1995) und trotzdem Photorezeptordefekte beobachtet wurden (Abbildung 5.5). Umso interessanter ist, dass die Liste der in den Prpf31-defizienten Fischen betroffenen Transkripte eine Reihe alternativer Kandidaten liefert, deren fehlerhafte Prozessierung ebenfalls Auslöser der Photorezeptordegeneration sein könnte. So sind einige von ihnen selbst Krankheitsgene für RP (z. B. *RCV1*, *PDE6C*, *NRL*, *CRX*). Es bleibt zu klären, ob diese Transkripte auch im Menschen bei der Pathogenese spleißfaktorvermittelter RP eine Rolle spielen. Die Validierung der gestörten Expression dieser Transkripte im Menschen ist daher äußerst wünschenswert. Solche Untersuchungen erfordern aber die Verfügbarkeit von Augengewebe aus RP-Patienten und sind daher nur schwer durchführbar.

Interessanterweise könnte die fehlerhafte Expression von Rhodopsin dennoch eine Rolle im Pathomechanismus der Spleißfaktor-assoziierten RP spielen. So war die Menge an Rhodopsin-Transkript – obwohl es keine Introns enthält – in den Prpf31-Morphanten drastisch reduziert. Mögliche Ursache hierfür könnten Defekte in dem Transkriptionsfaktor-netzwerk sein, das die Rhodopsin-Expression kontrolliert (Hennig et al., 2008; Blackshaw et al., 2001). Diese These wird gestützt durch die Beobachtung, dass mit *crx*, *nrl*, *rx3* und *pax6a* gleich mehrere seiner Komponenten vom Prpf31-Mangel betroffen waren (siehe Anhang).

6.1.4 Das Zebrafischmodell als Werkzeug zur Analyse des Spleißmusters

Die für die Rhodopsin-Expression gemachten Beobachtungen lieferten interessante Hinweise auf einen möglichen Pathomechanismus, verdeutlichen aber auch ein inhärentes Problem genomweiter Expressionsstudien: Häufig werden dabei Transkripte identifiziert, die nur durch sekundäre Effekte betroffen sind (Murphy, 2002). Die Kandidatenliste enthält daher höchstwahrscheinlich viele Transkripte, deren

Expression aufgrund von Sekundäreffekten reduziert ist. Zwar wurde versucht, die primär betroffenen Transkripte anzureichern, indem für den Microarray Larven aus Stadien verwendet wurden, die dem Retina-Phänotyp vorangingen (3dpf gegenüber 4dpf). Dennoch sind weitere Experimente unerlässlich, um zu klären, ob tatsächlich das fehlerhafte Spleißen von Photorezeptor-Transkripten zu deren Degeneration führt. Für beide Fragestellungen – die Detektion der fehlerhaft gespleißten Transkripte und die Beurteilung von deren Relevanz für den Pathomechanismus – bietet das Zebrafischmodell entscheidende Vorteile. So kann die Analyse eventuell betroffener Introns direkt in den spleißfaktordefizienten Photorezeptorzellen erfolgen, beispielsweise durch intronüberspannende RT-PCR. Dies hat gegenüber den bisher verwendeten Minigen-Reportern zwei wichtige Vorzüge: Erstens können die Introns im Kontext ihres Volllänge-Transkripts analysiert werden. Zweitens ist das zelluläre Milieu inklusive eventueller *trans*-agierender Faktoren physiologischer als bei der Analyse von Reportergenen in nicht-retinalen Kulturzellen. Für RT-PCR Analysen muss jedoch zunächst die Kandidatenliste weiter eingegrenzt werden, da Zebrafisch-Transkripte im Durchschnitt vier Introns enthalten und so über 2000 Ansätze nötig wären um die Introns der mehr als 500 Kandidaten zu testen. Dabei ist neben der manuellen Selektion (z.B. von RP-Krankheitsgenen) auch die bioinformatische Suche nach Sequenzmotiven oder *cis*-Elementen die das Spleißen beeinträchtigen könnten (z.B. besonders kurze Polypyrimidin-Bereiche oder schwache SS) denkbar. Ein komplementärer Ansatz, der diesen Einschränkungen nicht unterworfen ist, ist die direkte Identifikation von Spleißdefekten auf genomweiter Ebene. Microarrays zur Detektion von Spleißvarianten (Clark et al., 2002; Johnson et al., 2003) existieren für den Zebrafisch jedoch bisher nur in theoretischen Studien (Griffith et al., 2008). Eine andere Möglichkeit besteht in der Hochdurchsatz-Sequenzierung des Transkriptoms (zur Übersicht siehe Blencowe et al., 2009). Sie wurde in den letzten Jahren auch für den Zebrafisch etabliert (Hegedus et al., 2009; Ordas et al., 2010). Obwohl die Annotation des Referenz-Genoms noch nicht abgeschlossen ist



(Flicek et al., 2010), wurde diese Strategie bereits erfolgreich benutzt, um veränderte Spleißmuster im Zebrafisch nachzuweisen (Rösel et al., 2011). Ob aber solche Änderungen tatsächlich durch Fehler im Spleißmechanismus selbst verursacht werden, kann im Tiermodell nicht untersucht werden, da auch allgemeine Zellschäden sekundär zu abweichenden Spleißmustern führen können (Muñoz et al., 2009). Während deshalb die biochemische Analyse *in vitro*-transkribierter prä-mRNA das Mittel der Wahl zum Nachweis einer defekten Spleißmaschinerie bleibt, können im Zebrafisch Spleißdefekte hinsichtlich ihrer Kausalität für die Photorezeptorschäden untersucht werden. Dazu können zu testende Transkripte als *in vitro* transkribierte mRNAs oder als cDNA-Transgene eingebracht werden, die damit gegenüber einem Spleißfaktormangel unempfindlich sind. Die Abmilderung des Phänotyps der Spleißfaktormorphanten kann dann Aufschluss über die Beteiligung des entsprechenden Transkripts am Pathomechanismus geben.

6.1.5 *PRPF4* ist ein neues Kandidatengen für RP

Auch wenn bislang nicht zweifelsfrei geklärt ist, ob tatsächlich das fehlerhafte Spleißen bestimmter Transkripte zu RP führt, scheint ein unbeeinträchtigtes tri-snRNP für Photorezeptoren essentiell zu sein. Drei integrale Bestandteile des tri-snRNPs waren zu Beginn dieser Arbeit als RP-Krankheitsgene bekannt: *PRPF31*, *PRPF8* und *PRPF3*. Die daraus hervorgehende Hypothese, dass auch andere, bisher nicht mit RP in Verbindung gebrachte Komponenten des tri-snRNPs essentiell für Photorezeptoren sind, wurde durch zwei komplementäre Vorgehensweisen getestet. Zum einen wurde in RP-Patienten nach Mutationen in Spleißfaktorgen gesucht. Zum anderen wurde durch reverse Genetik im Zebrafisch untersucht, ob durch einen Mangel an Prpf4 der retinaspezifische Phänotyp der *prpf31*-Morphanten nachgebildet werden kann. Letzteres gelang nicht nur auf funktioneller und morphologischer Ebene (Abbildung 5.9 und Abbildung 5.8), auch der Effekt auf die Expression RP-relevanter Transkripte war verblüffend ähnlich (Abbildung

5.10). Daher kann vermutet werden, dass der Mangel an Prpf4 im Zebrafisch einen ähnlichen Pathomechanismus in Gang setzt wie die Prpf31-Defizienz, welcher dann zu einem spezifischen Defekt der Photorezeptoren führt. Die in den RP-Patienten gewonnenen Daten waren dagegen weniger eindeutig: Eine Patientin wurde als heterozygote Trägerin einer Punktmutation in Prpf4 identifiziert, die zum Austausch eines hochkonservierten Aminosäurerests führt (p.R192H). Die Kausalität der Mutation für die RP-Erkrankung konnte jedoch nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zum einen verhinderte ein relativ kleiner Stammbaum umfangreiche Segregationsanalysen (Abbildung 5.12), zum anderen wurde die Mutation auch in einer Tochter der Indexpatientin gefunden, die nicht an RP erkrankt ist und auch keine derartige Prognose hat (H. Bolz, pers. Mitteilung). Während dies bei einem klassischen autosomal dominanten Erbgang bereits als Ausschlusskriterium für eine Kausalität angesehen werden kann, muss dies bei Spleißfaktor-assoziiierter RP keineswegs der Fall sein. Komplexe Vererbungsmuster mit inkompletter Penetranz sind bei Mutationen von *PRPF31* sehr häufig (Audo et al., 2010) und auch für *PRPF3*- und *PRPF8* Mutationen ist eine variable Expressivität beschrieben (Vaclavik et al., 2010; Maubaret et al., 2011). Es ist daher sehr gut denkbar, dass die p.R192H Mutation zwar RP auslösen kann (wie in der Indexpatientin), dies aber nicht zwangsläufig der Fall sein muss (wie in der Trägerin). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit die molekularen Konsequenzen der p.R192H-Mutation näher untersucht. Anhand von Bindungsstudien in Extrakten aus humanen Zelllinien und Zebrafischlarven konnte gezeigt werden, dass die Mutation des konservierten Argininrests in beiden Organismen zu einem Verlust der snRNP-Integration führte, der einen kompletten Funktionsverlust von Prpf4 zur Folge hat (Abbildung 5.14 und Abbildung 5.16). Die in der RP-Patientin identifizierte p.R192H-Variante ist also ein Nullallel und es kann angenommen werden, dass in den Trägern die Menge an funktionellem Prpf4 verringert ist. Im Zebrafischmodell führt ein Prpf4-Mangel zu Photorezeptorschäden (Abbildung 5.9), weshalb denkbar ist, dass – analog der Situation bei

Prpf31 – das Unterschreiten eines bestimmten Schwellenwertes auch im Menschen RP verursachen kann. Wie für Prpf31 gezeigt (Vithana et al., 2003; Rivolta et al., 2006), könnte dabei die Penetranz von der Expressionsstärke des Wildtyp-Allels abhängen, welche möglicherweise in der nicht betroffenen Tochter höher ist als in der Indexpatientin.

6.1.6 Hypothese: Spleißfaktorvermittelte RP als oligogene Erkrankung

Die Kernfrage bei der durch Mutationen in Spleißfaktoren ausgelösten RP ist nach wie vor ungeklärt: Wie können Defekte in generellen Spleißfaktoren zu einem photorezeptorspezifischen Phänotyp führen? Im derzeitigen Modell wird angenommen, dass in Photorezeptoren ein Schwellenwert für die Aktivität der jeweiligen Spleißfaktoren existiert, dessen Unterschreitung die Zellen zu Grunde gehen lässt (Mordes et al., 2006). Die in dieser Arbeit durch den graduellen Knockdown von Prpf31 gewonnenen Daten unterstützen ein solches Schwellenwert-Modell (Kapitel 6.1.2). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass es ebenso für Prpf4 gültig ist, da auch hier die Unterschreitung einer bestimmten Proteinmenge im Zebrafisch und möglicherweise auch im Menschen zu Photorezeptorschäden führt (Kapitel 6.1.5).

Aber sind Photorezeptoren tatsächlich sensitiv gegenüber den spezifischen Defekten in einer solchen Vielzahl an Spleißfaktoren? Obwohl die genaue Rolle der RP-relevanten tri-snRNP Spleißfaktoren noch unbekannt ist, ist es unwahrscheinlich, dass Proteine, die am aktiven Zentrum beteiligt sind (wie z.B. Prpf8 und Brr2) dieselbe Funktion besitzen wie diejenigen, die das Spleißosom während seiner Aktivierung verlassen (wie z.B. Prpf3 und Prpf31). Daraus resultiert die Vermutung, dass nicht der Defekt der Einzelproteine, sondern die reduzierte Aktivität des tri-snRNPs insgesamt zur Photorezeptordegeneration führen könnte.

Mehrere Anhaltspunkte untermauern diese These:

- Fische mit einem Defekt im tri-snRNP Recyclingfaktor p110 zeigen eine beeinträchtigte Expression von Photorezeptoren (Trede et al., 2007).
- In gesunder humaner Retina sind die tri-snRNP snRNAs U4, U5 und U6 überexprimiert (Tanackovic et al., 2011b).
- Der Knockdown des bislang nicht als RP-Faktor bekannten Prpf4 im Zebrafisch führt zu einem RP-ähnlichen Phänotyp (Kapitel 5.5).

Aus diesem überarbeiteten Schwellenwert-Modell (Abbildung 6.1) ergeben sich weitreichende Konsequenzen für die genetische Diagnostik der RP: Sind Photorezeptoren sensitiv gegenüber der Aktivität des tri-snRNPs insgesamt, so müssten auch Defekte in weiteren Spleißfaktoren zu RP führen können. Damit übereinstimmend wurde während der Fertigstellung dieser Arbeit Prpf6 als RP-Krankheitsgen identifiziert (Tanackovic et al., 2011a). Besonders interessant ist aber, dass ein solches Modell eine multifaktorielle bzw. oligogene Vererbung vorhersagt, wie sie

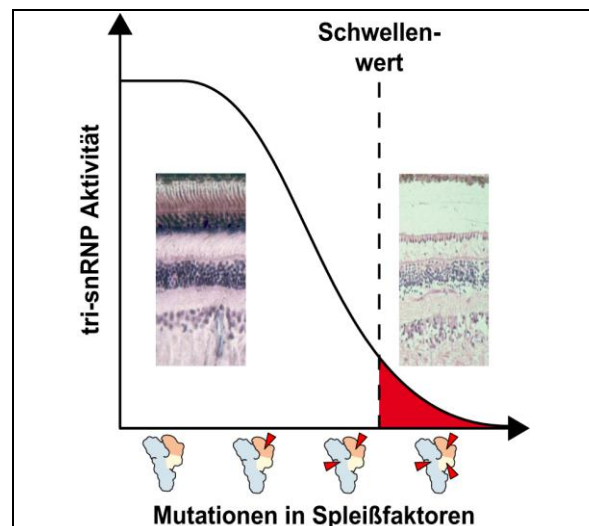


Abbildung 6.1: Schwellenwertmodell für die tri-snRNP-Aktivität

Durch Mutationen in verschiedenen Spleißfaktoren wird die Aktivität des tri-snRNPs graduell reduziert. Solange ein bestimmter Schwellenwert nicht unterschritten wird, können Photorezeptoren dies tolerieren, danach sterben sie ab.

beispielsweise auch für das Bardet-Biedel-Syndrom bekannt ist (Badano & Katsanis, 2002). Dabei können mehrere nicht funktionelle Spleißfaktor-Allele in Kombination dazu führen, dass die tri-snRNP Aktivität unter den Schwellenwert fällt (Abbildung 6.1). Wird der Schwellenwert jedoch nicht unterschritten, tritt keine Photorezeptordegeneration auf (Abbildung 6.1). Da diese Allele also nur in Kombination zum Ausbruch der Krankheit führen, wird eine hohe Anzahl an nicht erkrankten Trägern und vor allem Simplex-Fällen (Einzelne Betroffene innerhalb einer Familie) erwartet. Genau dies ist bei RP der Fall, wo die Simplex-Fälle einen erhöhten Anteil von nahezu 50% ausmachen (Jay, 1982; Hu, 1982; Nájera et al., 1995; Haim, 2002). Auch Segrega-

tionsanalysen weisen auf eine multifaktorielle genetische Ursache hin und sagen RP-Allele mit reduzierter Penetranz voraus (Boughman & Fishman, 1983; Boughman, 1983).

Zusammenfassend lässt sich also vermuten, dass es eine Reihe von RP-Patienten gibt, bei denen mehrere Komponenten des tri-snRNPs mutiert oder vermindert exprimiert sind. Neuere Methoden der genetischen Diagnostik, wie beispielsweise die Hochdurchsatz-Sequenzierung, könnten zur Überprüfung dieser Hypothese beitragen. Dies würde nicht nur wichtige Hinweise auf den zugrundeliegenden Pathomechanismus liefern, sondern könnte auch zur Verbesserung der RP-Diagnostik beitragen.

7 Material & Methoden

7.1 Material

7.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Feinchemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, in p.A.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und BD-Biosciences (Heidelberg) sowie der Chemikalienausgabe des Instituts für Organische Chemie der Universität Würzburg bezogen. Radiochemikalien stammten von den Firma GE Healthcare (Freiburg) und Perkin Elmer (Rodgau).

7.1.1.1 Enzyme

Taq-Polymerase (2x MM)	Promega, Mannheim
Phusion-Polymerase (2x MM; HF)	Finnzymes, Espoo (FI)
Reverse Transkriptase (Superscript RT)	Invitrogen, Karlsruhe
Polynucleotid-Kinase	Fermentas, St. Leon-Rot
Shrimp Alkaline Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
diverse Restriktionsenzyme	Fermentas, St. Leon-Rot

7.1.1.2 Chromatographische Matrices

Glutathion-Sepharose	Amersham, Freiburg
Ni-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA)	QIAGEN, Hülse
FLAG M2-Agarose affinity Matrix	Sigma, München
Protein G-Sepharose	Amersham, Freiburg
CNBr activated Sepharose 4B	Amersham, Freiburg

7.1.1.3 Längenstandards

PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot



7.1.1.4 Reaktions-Sets (Kits)

Effectene Transfection Reagent	QIAGEN, Hilden
Nanofectin Transfection Reagent	PAA, Linz (A)
Oligofectamine Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
NucleoSpin® Extract	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy RNA Purification Kit	Qiagen, Hilden
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translation System	Promega, Mannheim
mMessage Machine SP6	Ambion/Appl. Biosys., Darmstadt
RNeasy Mini	Qiagen, Hilden
Promega Midi	Promega, Mannheim

7.1.1.5 Dialyse- und Filtermaterial

Whatman 3MM Filterpapier	Hartenstein, Würzburg
Dialyseschlauch MWCO 30kD	Roth, Karlsruhe
Rundfilter 11cm	Macherey-Nagel, Düren
MF-Millipore Membranfilter	Sigma, München

7.1.1.6 Kunststoffwaren und -gefäße

DC-Plastikfolien PEI Cellulose F	Merck, Darmstadt
Gewebekulturflasche, steril 50 ml, 25 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflasche, steril 250 ml, 75 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflasche, steril 550 ml, 175 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 100 mm	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 145 mm	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Peske, Aindling-Pichl
15 ml und 50 ml PP Test Tubes	Noras, Würzburg
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg



Zellkulturpipetten, steril 5, 10 und 25 ml Greiner, Frickenhausen

7.1.1.7 Röntgenfilme und Screens

BioMax TranScreen High Energy (HE)/(LE) Noras, Würzburg

Röntgenfilme Kodak Biomax MR/MS Noras, Würzburg

7.1.1.8 Transfermembranen

Hybond-N+ Amersham, Freiburg

Protran Nitrocellulosemembran BA85 PerkinElmer, Rodgau

7.1.2 Lösungen, Puffer und Nährmedien

7.1.2.1 Allgemeine Lösungen

Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	SERVA Blue R (SERVA)

Coomassie-Entfärbelösung	30 %	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure

ECL I	6,8 mM	p-Cumarsäure in DMSO
-------	--------	----------------------

ECL II	1,25 mM	Luminol
	100 mM	Tris/HCl
	pH 8,5	

IP-Puffer:

IPP300/0,5%:	20 mM	Tris pH 7,0
	300 mM	NaCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	0,5 %	NP-40
	0,5 mM	DTT (frisch)
	je 1:1000	Leupeptin/Pepstatin, AEBSF, Aprotinin (frisch)

IPP300/0,5%: Wie oben, jedoch nur 0,05% NP-40

PK-Puffer	150 mM	NaCl
	100 mM	Tris pH 7.0
	12.5 mM	EDTA pH 8.0
	1%	SDS
PBS	130 mM	NaCl
	40 mM	Na ₂ HPO ₄
	20 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
PBST	10 %	Tween 20
	in PBS	
Ponceau S-Färbelösung	0,5%	Ponceau
	1% (v/v)	Essigsäure
RIPA-Puffer	150 mM	KCl
	50 mM	Tris/HCl
	2 mM	EDTA
	0,5 mM	DTT
	0,1% (v/v)	NP40
	pH 7,4	
RNA-Elutionspuffer	300 mM	NaOAc
	2 mM	EDTA
	0,1 M	SDS
RNA-Polyacrylamid-Gele (denaturierend)	10 %	40%ige Acrylamid-Lsg. (19:1)
	8 M	Harnstoff
	0,5x	TBE
	500 µl/ 100 ml	APS
	50 µl/ 100 ml	TEMED
SDS-Polyacrylamid-Gele (High-TEMED), für 1 Gel:		
5%ige Sammelgellösung	1,65 ml	30%ige Acrylamid-Lsg. (37,5:1)
	2,45 ml	0,5 M Tris pH 6,8
	50 µl	20% SDS
	5,85 ml	ddH ₂ O
	12,5 µl	TEMED
	50 µl	10% APS



12%ige Trenngellösung	12 ml	30%ige Acrylamid-Lsg. (37,5:1)
	5,5 ml	1,5 M Tris pH 8,8
	112,5 µl	20% SDS
	12,4 ml	ddH ₂ O
	100 µl	TEMED
	100 µl	10% APS
SSC-Puffer	150 mM	NaCl
	15 mM	Natriumcitrat
10x TBT	1,5 M	NaCl
	60 mM	Tris-Base
	190 mM	Tris/HCl
	5 % (v/v)	Tween 20
TCA-Waschpuffer	70% (v/v)	Aceton
	20% (v/v)	Ethanol
	7,5% (v/v)	ddH ₂ O
	50 mM	Tris/HCl
	pH 8,0	
Tfb I Puffer	30 mM	KOAc
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl ₂
	50 mM	MnCl ₂
	15% (w/v)	Glyzerin
	pH 5,8	
Tfb II Puffer	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl ₂
	10 mM	RbCl
	15% (w/v)	Glyzerin
7.1.2.2 Gelelektrophoresepuffer		
SDS-Sammelgelpuffer 4 x	0,5 M	Tris/HCl
	0,4 % (w/v)	SDS
	pH 6,8	

SDS-Trenngelpuffer 4 x	1,5 M	Tris/HCl
	0,4 % (w/v)	SDS
	pH 8,8	
10x Lämmli-Puffer	440 mM	Tris-base
	2 M	Glyzin
	1,5% (w/v)	SDS
	pH 8,3	
10x TAE	0,04 M	TrisHCl
	0,11% (v/v)	Eisessig
	0,01 M	EDTA
10x TBE	890 mM	Tris
	890 mM	H3BO4
	20 mM	Na2EDTA
	pH 8,3	

7.1.2.3 Probenpuffer

DNA-Ladepuffer (Acridin-Orange)

15 %	Ficoll 400
0,4 %	Acridin-Orange in ddH ₂ O

DNA-Ladepuffer (6x)

10 mM	Tris/HCl
60 mM	EDTA
1% (w/v)	SDS
30% (w/v)	Glyzerin
0,1% (w/v)	Bromphenolblau
0,1% (w/v)	Xylencyanol FF
pH 8,0	

Denaturierender Protein-Probenpuffer nach Laemmli (4x)

400 mM	Tris/HCl
50 % (w/v)	Glyzerin
5 % (w/v)	SDS
5 mM	EDTA
1 ‰ (w/v)	Bromphenolblau
pH 6,8	

Bei Gebrauch	0,9 Vol	Protein-Probenpuffer 4x
	0,1 Vol	β-Mercaptoethanol



Fischprobenpuffer 1 : 1 Mischung von Laemmli-Probenpuffer und Puffer B (100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris pH 8.0, 8 M Harnstoff)

Denaturierender RNA-Probenpuffer

80 % (v/v)	Formamid
0,1 %	Xylencyanol
0,1 %	Bromphenolblau
0,5x	TBE

7.1.2.4 Medien und Zusätze für die Gewebekultur

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	PAA, Linz (Österreich)
Fötale Kälber Serum (FKS)	PAA, Linz (Österreich)
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA, Linz (Österreich)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe

Medienzusammensetzungen:

Säugerzell-Standardmedium	DMEM, 10% FKS, 1% Pen/Strep
Medium für die Cryopräservierung	10% DMSO in FCS

7.1.2.5 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Clontech, Heidelberg
Bacto-Trypton	Clontech, Heidelberg
Bacto-Yeast-Extract	Clontech, Heidelberg
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Kanamycin	Boehringer, Mannheim

Medienzusammensetzungen:

LB-Medium	0,5 %	Hefe-Extrakt
	1 %	Trypton
	170 mM	NaCl



Superbroth-Medium	3,5 % (w/v)	Bactotrypton
	2 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl

Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agarose hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

7.1.2.6 Puffer zur Mikroinjektion von Zebrafisch-Embryonen

10x Danieau's (Verwendung 0,3x)

174 mM	NaCl
2,1 mM	KCl
1.2 mM	MgSO ₄
1,8 mM	Ca(NO ₃) ₂
15 mM	HEPES
pH 7.6	



7.1.3 Oligos

Primer für PCR-Klonierungen und Sequenzierungen (biomers.net, Ulm)

Name	Sequenz (5'→3')
hPrp31 BamHI for	AATAGGATCCATGTCTCTGGCAGATGAGCTCTTAGC
hPrp31 EcoRI for	ATACAGAATTCATGTCTCTGGCAGATGAGCTC
hPrp31 XhoI rev	ATACACTCGAGGGTGGACATAAGGCCACTCTTC
hPrp31 XhoI stop rev	AATACTCGAGTCAGGTGGACATAAGGCCACTCTTCT
pCS2 reverse	CTACGTAATACGACTCACTATAGGG
Rho intr3 for BglIII AflIII	AATAGATCTCTTAAGGTACGGGCCGGGGGTGG
Rho intr3 rev NheI EcoRV	AATAGATATCGCTAGCCTGCAGGACACGGGACCCGGG
zfPrp3 fl for BamHI	AATAGGATCCATGTCACTGCCTAAACGTG
zfPrp3 fl rev XbaI	AATTTCTAGATTATCAGTCATCAGTTGTCTCCAG
zfPrp3 frag for BamHI	AATAGGATCCACCAACCTAGTTGAACATC
zfPrp3 frag rev XhoI	AATACTCGAGTCACTCATCCCATTGTGATCC
zfPrp3 seq 596	GTCCATCGCTCCTTCTCAGG
zfPrp31 full for BamHI	AATAGGATCCATGTCTTTGGCAGACGAGCTGCTTGC
zfPrp31 full rev stop Xho	AATACTCGAGTCACACCTTGTCCTCCTTCTCAG
zfPrp31-3DOWN	GTCCCCACACAAGTCCATCT
zfPrp31-3UP	TTGCATGTTGGCTTCTGTTC
zfPrp4 EcoRI for	AATAGAATTCATGTCCAGATGAAGATGAAGCTCC
zfPrp4 XhoI rev nostop	AATACTCGAGTTCTGACATCCAGAGTTTAAAGG

Oligos für Linker-Ligationen (biomers.net, Ulm)

Name	Sequenz (5'→3')
HA-tag in pCS2 antisense	GATCCCAAGCTAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTATCCCATGGTGGGA
HA-tag in pCS2 sense	GATCTCCACCATGGGATACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTAGCTTGG

Primer für die zielgerichtete Mutagenese (biomers.net, Ulm)

Name	Sequenz (5'→3')
zfPRP3 MO Quick 1 rev	GGCCTCAGTTCATCAACCTCTCTCTTAGGCAGTGACATGGATCCC
zfPrp3 MO Quick 2 for	GCCTAAGAGAGAGGTTGATGAGTTAAGGCCATGGGTGGAACGC
zfPrp3 MO Quick 2 rev	GCGTTCACCCATGGCCTTAACTCATCAACCTCTCTCTTAGGC
zfPRP3 MO Quick1 for	GGGATCCATGTCACTGCCTAAGAGAGAGGTTGATGAAGTGAAGCC
zfPrp3 P493S rev quik	GGGCTCCACTTTAGTGGAGTCTGCACAGCTTCTGTGC
zfPrp3 P493S sense quik	GCACAGAAGCTGTGCAGGACTCCACTAAAGTGGAGGCC
zfPrp31 Quik A194E for	GGAGGAGGCTGTGACATGGAGCTTGAGCTCAACC
zfPrp31 Quik A194E rev	GGTTGAGCTCAAGCTCCATGTACAGGCCCTCCTCC

RT-PCR Primer für die Detektion retinaler Transkripte (biomers.net, Ulm)

Name	Sequenz (5'→3')
ASP/gapdh/195-1340	GCCATGTGTGCCATCAGGTCAC
ASP/gnat2/6287-7621	GGAAGTTGTGGCGAAGAATCTGTG
ASP/hisH1-like/161-757	CAGCCTTGGGCTTTGCAGC
ASP/irx6a/998-2457	TCTCTTTGGAGGGGAGGAGGTC
ASP/lsm7/101-653	GGTGCCGTCCAACACAAGATTC
ASP/opn1lw1/163-1878	GCAGGAGCCACAGAAGACACTTC
ASP/opn1mw1/397-1508	TGACACTGAGGAAGACTCATCGTCAC
ASP/rho/86-1147	ATGTACCAGGCCACGCCG
ASP/rx3/101-2362	TGATGAAGCTGGGCAGAGATTG
ASP/vsx1/326-1972	GCGTGCCAGGAGCTTTCTTC
crx ex1-3 FOR	CAGCGTCGCAGAGAAAAAGAGAGTG
crx ex1-3 REV	AACCACACAGTGGATCAGGGAGG
nr2e3 ex1-4 FOR	TCAGGAAGAGTCTGCGTAAACTTTTACACC



nr2e3 ex1-4 REV	CATCTAATCTGACTTGTGCAGTGCTGC
nr2e3 ex5-8 FOR	AAGAACCTGCCAGTATTTTCACATCTACC
nr2e3 ex5-8 REV	TGAAGGGAGGGAAGGAGAAGTAATAGTC
SP/gapdh/195-1340	CTCCACTGGGGCTGCCAAG
SP/gnat2/6287-7621	TCCAGAGCTGGCAGACGTCATC
SP/HisH1-like/161-757	CATCGTGAAGCGGTTGCTG
SP/irx6a/998-2457	CTTGCTGCGATTTCGATATCCAG
SP/lsm7/101-653	GCGGGCGTAGAGGAGTTTTG
SP/opn1lw1/163-1878	ACCACAAGGGAAGCAATGTTCCAC
SP/opn1mw1/397-1508	ATTAGGCTGTGTAATGGAGGGATTCTTC
SP/rho/86-1147	GGTACAGAGGGACCGGCATTC
SP/rx3/101-2362	AGGATCCACAGCATTGAGTCAATTC
SP/vsx1/326-1972	CCATGTTTTCTCCCGAGCCAC

RT-PCR Primer und Northern-blot Sonden zur Detektion von snRNAs (biomers.net, Ulm)

Name	Sequenz (5' → 3')
hU1snRNA-FOR	ATACTTACCTGGCAGGGGAGATACC
hU1snRNA-REV	CAGGGGAAAGCGCAACGC
hU2snRNA-FOR	ATCGCTTCTCGGCCTTTTGGCTAAG
hU2snRNA-REV	GGTGCACCGTTCTCGGAGG
hU4snRNA-FOR	AGCTTTGCGCAGTGGCAGTATCG
hU4snRNA-REV	CCAGTCTCCGTAGAGACTGTCAAAAATTG
hU5snRNA-FOR	ATACTCTGGTTTCTTCTCAGATCGCATAAATC
hU5snRNA-REV	TAGCCTTGCCAAGGCAAGGCTC
hU6snRNA-FOR	GTGCTCGCTTCGGCAGCAC
hU6snRNA-REV	AAAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCG
U5 SLI northern	GAAAGGCGAAAGATTTATGCGATCTGAAG
zf+h U4 northern	GGCGGGTATTGGGAAAAGTTTTCAATTAGC
zfU4-R	TCTCTGTCGAGACCGTCAAA
zfU5 NB SL	GGCGAAAGATTTATACGATCTGAAGAAAAGTC
zfU5-R	AAAATTAGTAAATACTCAAGGTGTTCC
zfU6 NB	GCTAATCTTCTCTGTATCGATCCAATTTAGTA
zfU6-R	GAGCGCTTCACGGATTTG

Antisense Morpholino-Oligos für die Injektion in Zebrafisch-Eier (GeneTools, Oregon)

Name	Sequenz (5' → 3')
zfPrp4 MO	TGGAGCTTCATCTTCATCTGACATC
zfPrp31 MO	CAAGCAGCTCGTCTGCCAAAGACAT
standard kontroll-MO	CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA



7.1.4 Plasmide

Name	Beschreibung	Klonierung	Herkunft
pHA	HA-tag in pcDNA3.1		Dissertation O. Plöttner
pCS2			Geschenk von C. Winkler
pCS2-HA	HA-tag durch linker-Ligation in BamHI-Schnittstelle		Diese Arbeit
pcDNA3.1			
zfPrpf31 in pHA		BamHI / XhoI	Diese Arbeit
zfPrpf31 in pET28a		BamHI / XhoI	Diese Arbeit
zfPrpf31 in pGEX-6P1		BamHI / XhoI	Diese Arbeit
zfPrpf31 in pCS2-HA			Diese Arbeit
zfPrpf4 in pHA			Diese Arbeit
zfPrpf4 in pET28a			Diese Arbeit
zfPrpf4 in pGEX-6P1			Diese Arbeit
zfPrpf4 in pCS2-HA			Diese Arbeit

7.1.5 Antikörper

Name	Antigen	Beschreibung	Herkunft
Y12	Methylierte Sm-Proteine	Maus monoklonal	
HA.11	HA-Epitop	Maus monoklonal	HISS Diagnostics (Freiburg)
α -zfPrpf31	6xHIS-zfPrpf31 (volle Länge)	Kaninchen polyklonal	Fa. Immunoglobine, eigene Immunisierung
α -zfPrpf4	6xHIS-zfPrpf4 (volle Länge)	Kaninchen polyklonal	Fa. Immunoglobine, eigene Immunisierung
α -hPrpf3	His-hPrpf3 Δ aal-554	Kaninchen polyklonal	Geschenk von Dr. Bernhard Lagerbauer
Rhodopsin 1D4	Bos taurus Rhodopsin	Maus monoklonal; Epitop: TETSQVAPA (C-Terminus v. B.t Rhodop.)	Abcam (Cambridge UK), ab5417 Siehe Anhang!
Rhodopsin Polyklonal	Immunisiert mit „1D4-Peptid“ SKTETSQVAPA	Kaninchen polyklonal	Abcam (Cambridge UK), ab3424
zpr1	Unbekannt	Färbt Doppelzapfen; (Larison & Bremiller, 1990)	Zebrafish International Resource Center (Oregon)
zpr3	Unbekannt	Färbt Stäbchen; (Larison & Bremiller, 1990)	Zebrafish International Resource Center (Oregon)
U5-116K		Kaninchen polyklonal	Reinhard Lührmann
Anti-Maus POD	Maus IgG Fc	Ziege polyklonal	Sigma
Anti-Kaninchen POD	Kaninchen IgG Fc	Ziege polyklonal	Sigma
Anti-Maus Alexa 488	Maus IgG Fc	Ziege F(ab') ₂ Fragment	Invitrogen
Anti-Kaninchen Alexa 594	Kaninchen IgG Fc	Ziege F(ab') ₂ Fragment	Invitrogen

7.1.6 Organismen und Zelllinien

Bakterienstämme

Name	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	endA1 gyrA96(nal ^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺)
<i>E. coli</i> BL21	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal</i> [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)
<i>E. coli</i> BL21-Rosetta	F ⁻ <i>ompT hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> pRARE (Cam ^R)
<i>E. coli</i> DH5-alpha	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻

Zelllinien

Name	Herkunft	Nr.
HeLa	ECACC	93021013 (Sigma)
HEK293T	ATCC	CRL-11268
HEK293	DSMZ	ACC 305

Zebrafischlinien

Name	Beschreibung	Herkunft
Wü AB	Inzuchtstamm, etabliert in Würzburg	C. Winkler
Tü AB	Inzuchtstamm, etabliert in Tübingen	C. Winkler



7.2 Methoden

Die in dieser Arbeit angewendeten Methoden wurden, soweit nicht anders beschrieben, nach Sambrook & Russel (2000) oder Harlow & Lane (1988) durchgeführt. Lösungen und Plastikgefäße wurden autoklaviert (20 min bei 120 °C), alle Glasgeräte gebacken (2 h bei 150 °C).

7.2.1 Molekularbiologie

7.2.1.1 Amplifikation von DNA durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur selektiven Amplifikation von DNA-Sequenzen wurde die Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt. Als Polymerase-Enzym wurde entweder die DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase) oder Phusion-Polymerase (Finnzymes) verwendet. Für die Bestimmung der Anlagerungstemperatur der Oligonukleotide wurde OligoCalc verwendet (Kibbe, 2007).

7.2.1.2 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für je 1 µg DNA wurden 1 bis 5 U Restriktionsenzym eingesetzt. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug, bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur, mindestens 2 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol DNA Probenpuffer beendet. Doppelspaltungen erfolgten in den geeigneten Puffern nach den Angaben der Hersteller oder wurden, falls dies nicht möglich war, seriell durchgeführt. Die DNA wurde anschließend entweder direkt mit dem PCR Purification Kit der Firma Qiagen aus den Reaktionsansätzen isoliert oder zuvor in einem Agarose-Gel aufgetrennt, um nur gewünschte Fragmente zu erhalten.

7.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA Enden mit alkalischer Phosphatase

Um bei Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung angeschlossen. Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 1 µl CIAP, SAP oder FastAP versetzt, 1-2 h bei 37°C weiterinkubiert und die Phosphatase anschließend bei 65°C für 15 min inaktiviert.

7.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten

In einem Endvolumen von 20 µl wurden 20 bis 100 ng geschnittener Plasmid-DNA und ein zehnfacher molarer Überschuss des zu ligierenden DNA-Fragments für 3-4h bei RT oder über Nacht bei 14°C mit 1,5µl T4-DNA Ligase (Roche) ligiert.

7.2.1.5 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Hitzeschock-kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut und mit Plasmid-DNA für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 45 Sekunden bei 42°C Hitzeschock-behandelt und sofort wieder auf Eis transferiert. Nach weiteren 2 Minuten wurden die Proben mit LB-Medium ohne Antibiotikum auf 1ml aufgefüllt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C selektioniert.



7.2.1.6 Kolonie-PCR-Analyse

Um Kolonien zu identifizieren, die das gewünschte Plasmid aufgenommen hatten, wurde eine Analyse mittels Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden PCR-Reaktionen im 10µl-Maßstab mit dem Phusion-Polymerase 2x HF Master-Mix angesetzt, die mit einer direkt von der Selektionsplatte gepickten Kolonie als Templat „angeimpft“ wurden. Wenn möglich wurden ein Insert-spezifischer und ein Plasmid-spezifischer gewählt, so dass nur richtig orientierte Inserts zu einem Produkt führten.

7.2.1.7 Flachbettelektrophorese von Agarosegelen

Die Auftrennung von DNA-Proben erfolgte in Ethidiumbromid-haltigen (0,5µg/ml) Agarosegelen auf der Basis von 1xTBE-Puffer mit einem Agarosegehalt von 0,8% bis 2,5% (w/v). Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 100V bis 200V angelegt. Zur Visualisierung wurde langwelliges UV-Licht (302nm) benutzt.

7.2.1.8 Isolierung von Plasmid- DNA

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* Bakterien im kleinen Maßstab wurden 4 ml LB-Medium mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Zwei ml der Übernachtskultur wurden 10 min bei 5000 rpm abzentrifugiert, die Aufarbeitung erfolgte nach Protokoll des verwendeten Kits.

Für die Aufreinigung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab wurde das Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System verwendet (200ml Kulturvolumen, Kombiniertes Protokoll mit Zentrifugation und Vakuum). DNA die zur Transfektion in Säugerzellen eingesetzt wurde, wurde mit Endotoxin-Waschpuffer behandelt und/oder phenolextrahiert.

7.2.1.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration und einer groben Abschätzung des Reinheitsgrades gereinigter Nukleinsäuren wurde deren Absorption bei 260nm, 280nm und 320nm photometrisch bestimmt. Proben mit zu hoher Konzentration wurden mit TE-Puffer verdünnt.

7.2.1.10 Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Zur Einführung von definierten Mutationen wurde eine gerichtete *in vitro* Mutagenese nach dem „QuikChange“-Protokoll (Qiagen) durchgeführt. Mit parental-DNA (Vektor) und Primern wurde die Reaktion wie folgt angesetzt:

125 ng	Vorwärtsprimer
125 ng	Revers-Primer
5 µl	Expand-Polymerase-Puffer II
1 µl	dNTP-Mix (10mM)
10 µg	parental-DNA
1 µl	Expand-DNA-Polymerase
ad 50 µl	ddH ₂ O

Die Umlaufende PCR wurde dann in einem Thermocycler nach folgendem Programm durchgeführt:

1. 95 °C 30 Sekunden
2. 95 °C 30 Sekunden
3. 55 °C 1 Minute
4. 68 °C 7 Minuten (entspricht 1 Minute / kb Plasmidlänge)
5. 4 °C ∞

Schritte 2-4 wurden in 16 Zyklen wiederholt. Nach DpnI-Verdau der parental-DNA erfolgte die Transformation von *E. coli* DH5 α . Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung verifiziert.

7.2.1.11 Alkohol-Fällung von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NH₄OAc (pH 5,2) und 3 Vol. eiskaltem 96 % Ethanol bzw. 0,7 Vol. Isopropanol für mindestens 30 min bei -20 °C. Als Fällungshelfer wurde Glykogen eingesetzt. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (17000 g, 4 °C, 30 min) pelletiert, nach Abnahme des Überstandes mit 1 Vol. 80 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13000 g, 4 °C, 10 min). Das Nukleinsäurepellet wurde bei RT getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O oder Puffer (TE) aufgenommen.

7.2.1.12 Präparation kompetenter Bakterienzellen

Hitzekompetente *E. coli* wurden nach der Methode von Hanahan gewonnen. 1 ml DYT Medium wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert (180 rpm). Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ = 0,5 geschüttelt. Hatte die Kultur die geforderte Zelldichte erreicht, wurde die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter Tfb I-Lösung resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (4000 rpm, 4 °C, 5 min) und nach Entfernen des Überstandes in 8 ml eisgekühlter Tfb II-Lösung aufgenommen. Die hierdurch durch kompetent gemachten Bakterien wurden in 100 μ l Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

7.2.2 Biochemie

7.2.2.1 Expression und Reinigung von rekombinantem GST-Prpf31 aus *E. coli*

Reinigungs- und Waschpuffer:

A:	500 mM	NaCl
	50 mM	Tris pH 7,5
	10 %	Glyzerin
	5 mM	β -Mercaptoethanol
	0,01 %	NP-40
	1 mM	ATP
	2,5 mM	MgCl ₂
B:	1 M	NaCl
	20 mM	Hepes pH 7,5
	10 %	Glyzerin
	5 mM	β -Mercaptoethanol
	0,01 %	NP-40
C:	300 mM	NaCl
	20 mM	Hepes pH 7,5
	10 %	Glyzerin
	5 mM	β -Mercaptoethanol
	0,01 %	NP-40

Für die Expression von Prpf31 wurden *E. coli* Tuner-Zellen mit pGEX-6P1 basierten Plasmiden transformiert. Nach Selektion auf Platten (Ampicillin + Chloramphenicol) wurde eine 200ml SB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert. Eine 1,8l Expressionskultur wurde mit der kompletten Vorkultur angeimpft, nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,8 wurde die Temperatur auf 16°C reduziert. Bei Erreichen einer Kulturtemperatur von 16°C wurde mit 0,1mM IPTG über Nacht induziert. Die Bakterien wurden pelletiert (4.500 rpm; 4°C; 15 min), in zwei 50-ml Falcon-Gefäße überführt und in je 35ml Puffer A resuspendiert (mit Proteaseinhibitoren Aprotinin, Leupeptin/Pepstatin und AEBSF). Die Lyse erfolgte durch Sonifizieren (normale Spitze; 3x 2,5 min; Stufe 7; output 50%). Das durch Ultrazentrifugation geklärte Lysat (41.000 rpm; 4°C; 1h) wurde mit 600 μ l Gluthathion-Sepharosematrix für 2h bei 4°C h.o.t. inkubiert. Dann wurde im batch-Verfahren mit 1x 50ml Puffer A und 1x mit Puffer B gewaschen. Nach Überführen in eine Polyprep-Säule wurde 2x mit 10ml Puffer B gewaschen. Abschließend wurde 3x mit Puffer C gewaschen.

Die Expression und Reinigung von Prpf4 erfolgte analog, allerdings wurde für alle Schritte Puffer C verwendet.

7.2.2.2 Dialyse von Proteinen und Proteinkomplexen

Um störende Einflüsse von Salzen oder anderen Substanzen wie Imidazol für Folgereaktionen zu vermeiden, wurden rekombinant hergestellte Proteine, gewonnene Antikörper oder Proteinkom-



plexe dialysiert. Die Eluate wurden hierzu in einem Dialyseschlauch/-kammer geeigneter Ausschlußgröße über Nacht in 2,5l entsprechendem Dialysepuffer langsam bewegt (Rührer). Durch Zugabe von 20% Glycerin (v/v) in den Dialysepuffer wurde einer Verdünnung der Proteinprobe vorgebeugt. Ein zweiter Dialyseschritt für drei bis vier Stunden diente der Erhöhung der Effizienz der Dialyse.

7.2.2.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur sensitiveren Detektion von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen wurde die Silberfärbung nach Merrill verwendet. Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel nach der Auftrennung der Proteine mindestens 2 h in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel dreimal für 20 min mit 50% Ethanol p.a. gewaschen, für eine Minute in 0,02% (w/v) Natriumthiosulfat inkubiert und dreimal mit ddH₂O für je 20 s gewaschen. Das Gel wurde dann für 20 min in Silberlösung imprägniert, zweimal 20 s mit ddH₂O gewaschen und entwickelt. Nach dem Sichtbarwerden der Proteinbanden wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Reaktion mit Fixierlösung ohne Formaldehyd gestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 50 % (v/v) Methanol überführt und dokumentiert.

Fixierlösung:	50% (v/v)	Methanol
	12% (v/v)	Essigsäure
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung
Silberlösung:	2 g/l	Silbernitrat
	0,075% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung
Entwickler:	60 g/l	Natriumcarbonat (wasserfrei)
	0,05% (v/v)	37% Formaldehyd-Lösung

7.2.2.4 In vitro Translation von ³⁵S-markierten Proteinen

Zur Herstellung von Proteinen, die durch die Inkorporation von ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert waren wurde das T_NT Transkriptions- Translationssystem verwendet (Promega). Dazu wurden ein oder mehrere Plasmide mit T7-Promotor eingesetzt (je 0,5 µg). Zur radioaktiven Markierung wurde 1µl [³⁵S]-Methionin (3000 mCi/mmol) verwendet. Für Bindungsstudien mit aus E. coli gereinigten Proteinen wurden die gewünschten Proteine einzeln translatiert. Für Bindungsstudien mittels Co-immunpräzipitationen aus Translaten wurden alle Bindungspartner zusammen co-translatiert. Überstieg das Volumen der Plasmidverdünnungen 10% des Translationsansatzes (20µl TNT-Lysat), so wurde das Lösungsmittel im Vakuum verdampft. Die Translation erfolgte bei 37°C für 90 Minuten.

7.2.2.5 5'-Endmarkierung von Nukleinsäuren

Zur radioaktiven Markierung von DNA-Oligos oder RNA-Transkripten wurde deren 5'-Ende radioaktiv phosphoryliert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz für 1h bei 37 °C inkubiert.



Reaktionsmix

3 µl	γ-[³² P]-ATP (10 µCi/µl; 6000 mCi/mmol)
1 µl	PNK-Puffer A
1 µl	Oligonucleotid (10 pmol/µl)
1 µl	T4-Polynukleotidkinase (10 U/µl)
4 µl	ddH ₂ O

Die Proben wurden dann direkt in denaturierendem RNA-Probenpuffer aufgenommen und bei 70 °C für 10 min denaturiert. Nach Auftrennung der Proben mittels denaturierender RNA-PAGE, wurden die jeweiligen RNAs aus dem Gel eluiert, mit Ethanol präzipitiert und in 20 µl ddH₂O resuspendiert.

7.2.2.6 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Für denaturierende RNA-Gelelektrophoresen wurden Polyacrylamid-Gele mit Harnstoff verwendet. RNA-Proben wurden mit denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und 3 Minuten bei 95°C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Elektrophorese erfolgte bei 450V in 1x TBE.

Rezept für 1 Gel:

(20cm x 20 cm)	%	5	6	7	8	10	15	%
PAA (40%, 19:1)	[ml]	6,25	7,5	8,75	10	12,5	18,75	[ml]
Urea	[g]	24	24	24	24	24	24	[g]
5x TBE	[ml]	10	10	10	10	10	10	[ml]
ddH ₂ O	[ml]	15,45	14,2	12,95	11,7	9,2	2,95	[ml]
APS	[µl]	300	300	300	300	300	300	[µl]
TEMED	[µl]	30	30	30	30	30	30	[µl]
		32,03	32,03	32,03	32,03	32,03	32,03	[ml]

7.2.2.7 Reinigung von Nukleinsäuren aus denaturierenden Polyacrylamid-Gelen

Radioaktiv markierte DNA oder RNA wurde durch Belichtung eines Films lokalisiert. Nach Unterlegen des Films unter das in Frischhaltefolie verpackte Gel konnten die entsprechenden Bereiche des Gels ausgeschnitten werden. Nicht markierte RNA wurde durch „UV-Shadowing“ lokalisiert. Dazu wurde das Gel in Frischhaltefolie auf eine DC-PEI-Cellulose-Platte (Merck) aufgelegt und von oben mit UV-Licht (260nm) beleuchtet. RNA-banden wurden durch ihren Schatten auf der zum fluoreszieren angeregten DC-Platte lokalisiert und ausgeschnitten. Eluiert wurde mit 300µl RNA-Elutionspuffer bei RT über Nacht, anschließend erfolgte die Präzipitation mit Ethanol.

7.2.2.8 Phenol-Extraktion von RNA und Protein aus Immunpräzipitaten und Extrakten

Um RNA und Proteine aus Zellextrakten oder Immunpräzipitaten von RNPs zu trennen, wurde 1 Vol der Probe in 1 Vol PK-Puffer aufgenommen und mit 2 Vol µl Phenol (Reinheitsgrad für die



RNA-Extraktion) versetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Schüttler wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm (10 min, RT) getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, mit Ammoniumacetat und Glykogen versetzt und die RNA mit 3 Volumen Ethanol gefällt. Aus der Phenolphase wurden die Proteine mit 3 Volumen Aceton gefällt. Hierzu wurden die Proben mit eiskaltem Aceton versetzt, gut gemischt und für mindestens 1h bei -20 °C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 30 min bei 18000 g wurde das Proteinpellet getrocknet und anschließend in SDS-Probenpuffer aufgenommen.

7.2.2.9 Northern-Blot und RNA-Hybridisierung

Die mittels denaturierender PAGE aufgetrennten RNAs wurden in 1x TBE-Puffer auf eine Hybond N⁺-Membran (Amersham) bei 0,8 mA/cm² übertragen. Die auf die Membran transferierten RNAs wurden anschließend unter einer UV-Lampe bei 254 nm und einem Abstand von 1 cm für 15 min fixiert. Zur Detektion der gesuchten RNA wurde die Membran mit Rapid-Hyb-Hybridisierungspuffer (GE Life Sciences) bei 42°C in einem Hybridisierungssofen für 30 min vorinkubiert und mit der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde in RapidHyb-Puffer für 2h bei 42°C hybridisiert. Nach Abnahme der Sonde wurde die Membran 3 x in der Hybridisierungsröhre mit 1x SSC-Puffer gewaschen, in eine Schale überführt und erneut mit 1x SSC-Puffer gewaschen. Die Membran wurde anschließend autoradiographisch analysiert.

7.2.2.10 Herstellung von HeLa-Kernextrakt

Die Extraktpräparation erfolgte nach Dignam & Roeder (1983). 5 x 10⁹ HeLa-Zellen aus einer proliferierenden Fermenterkultur wurden für 12 min bei 1000 g und 4 °C pelletiert und in einem fünffachen Pelletvolumen mit Roeder-A-Puffer für 10 min auf Eis gequollen. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets im zweifachen Pelletvolumen Roeder A Puffer erfolgte der Zellaufschluß durch 10 Pistillstöße in einem Douncer. Die Kerne wurden vom Zytoplasma durch Zentrifugation in einem Ausschwingrotor bei 1500 g für 10 min (4°C) getrennt. Nach Resuspension des Pellets (Kerne) in einem 1,5 fachen Pelletvolumen Roeder C Puffer wurden die Kerne durch 15 Pistillstöße im Douncer aufgeschlossen. Diese Suspension wurde dann für 30 min auf Eis gerührt und zentrifugiert (100000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand dieser Zentrifugation wurde 2,5 h gegen Roeder D Puffer dialysiert in N2 schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

7.2.2.11 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen

Zur Herstellung von Zellextrakten von Zellen aus adhärenter Kultur wurden diese in der Zellkulturschale zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,5-1 ml Lysepuffer (0,5% NP40 in PBS) versetzt und mit einem Zellschaber vom Gefäßboden gelöst. Die erhaltene Zellsuspension wurde dann mit einer Spritze und Kanülen geschert und 20 min auf Eis inkubiert. Für eine quantitative Lyse wurde diese zusätzlich 25 mal durch eine G25 Kanüle geschert und bei 4 °C für 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) zentrifugiert. Der Gesamtproteingehalt des erhaltenen Überstandes wurde mittels Bradford bestimmt, einzelne Aliquote direkt eingesetzt oder schockgefrostet und bei -80 °C gelagert.

7.2.2.12 Protein-Bindungsstudien

Für Bindungsexperimente wurden die zu testenden Proteine *in vitro* translatiert. Mit spezifischen oder gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpern wurde dann ein Bindungspartner immunpräzipitiert. Es wurde 5x mit IPP300/0,05% gewaschen, beim letzten Waschschrift wurde das Reaktionsgefäß gewechselt. Die an der Matrix immobilisierten Komplexe wurden dann durch Zugabe

von 25 µl 4x SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert.

7.2.2.13 Konzentrieren von Proteinlösungen durch Fällung mit Trichloressigsäure

Zur Analyse von Proteinen aus verdünnten Lösungen können diese mittels der stark denaturierend wirkenden Trichloressigsäure ausgefällt werden. Hierzu wurde die Proteinlösung mit 0,1 Vol. (100 %) Trichloressigsäure versetzt und 30 min bis 12 h auf Eis inkubiert. Der Niederschlag wurde sedimentiert (18000 g, 4 °C, 30 min) und nach Abnahme des Überstandes mit 1 ml TCA-Waschpuffer versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (18000 g, 4 °C, 30 min) wurde das Pellet bei noch unzureichender Neutralisation der Trichloressigsäure erneut gewaschen. Anschließend wurde das Proteinpräzipitat im Vakuum getrocknet, in 1x SDS Probenpuffer aufgenommen, 10- 15 min unter Schütteln gelöst und nach Denaturierung der Probe für 5 min bei 95 °C mittels SDS PAGE analysiert.

7.2.2.14 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte entweder anhand eines Vergleichs einer gereinigten Proteinprobe mit einem Rinderserumalbumin-Standard (BSA) im Coomassie-gefärbten SDS-PAGE oder nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Zur Messung wurde zunächst mithilfe des Bradford-Reagenz (Bio-Rad) eine Eichkurve über 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg BSA erstellt (In 800 µl ddH₂O mit 200 µl Bradford-Lsg.). Parallel wurden 5 µl der Probe mit ddH₂O auf 800 µl aufgefüllt, mit 200 µl Reagenz versetzt und bei Raumtemperatur bei 595 nm vermessen.

7.2.3 Immunbiochemische Methoden

7.2.3.1 Gewinnung und Affinitätsreinigung polyklonaler Antiseren

Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine bzw. Proteinfragmente als 6xHis-Fusionen rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte im 2 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten in einer jeweiligen Dosis von 250 µg durch die Fa. Immunoglob (Himmelstadt).

Zur Affinitätsreinigung des Antikörpers aus den gewonnenen Seren wurden 2-4 mg des als GST-Fusionsprotein exprimierten Antigens zunächst kovalent an Glutathion-Sepharose Matrix gekoppelt. Dazu wurde diese auf Raumtemperatur überführt, mit 0,2 M Natriumtetraborat gewaschen und mit 20mM Dimethylpimelimidat in 0,2 M Natrium-Tetraborat für 30 min quervernetzt. Freie, noch reaktive Gruppen wurden danach für 1 h in 0,2 M Ethanolamin pH 8,0 geblockt. Anschließend wurde die Matrix mit 10 Vol. 0,1 M Glyzin pH 2,7 gewaschen, um nicht kovalent gekoppeltes Antigen zu entfernen. Zur Bindung der Antikörper wurde mit 10 ml Serum für 2 h inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Elution des gebunden Antikörpers in zehn Fraktionen durch pH-Schock mit 900 µl 0,1 M Glycin pH 2,7, wobei jeweils 100 µl 10x PBS und 100 µl 1 M Tris-HCl-Puffer pH 8,8 vorgelegt wurden.

7.2.3.2 Western-Blot und Immundetektion

Der Transfer von in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen auf eine Nitrozellulose-Membran (Pall) erfolgte im Semi-Dry Blotverfahren (Towbin et al., 1992). Dazu wurde das Gel zwischen je drei Lagen in Blotpuffer (30% MetOH, 70% Laemmli-Puffer) getränktem Whatman-Filterpapier auf



der Membran platziert. Der Transfer erfolgte bei Raumtemperatur und 0,8 mA je cm² Gelfläche für 2h oder für 6h bei entsprechend reduzierter Stromstärke. Zur Kontrolle der Übertragung der Proteine auf Nitrocellulosemembranen erfolgte eine reversible Anfärbung mit Ponceau S. Zur Blockierung aller potentiellen unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Nitrocellulose- oder PVDF-Membran nach dem Blotvorgang wurde diese mindestens 30 min bei Raumtemperatur in Blockierlösung (1x TBT mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) unter Schwenken inkubiert. Nach dem Waschen mit 1x TBT wurde die Membran mit dem gegen das nachzuweisende Protein gerichteten Primäntikörper inkubiert. Nach Entfernen von ungebundenen Primäntikörpern durch dreimaliges Waschen mit 1x TBT für je 10 min wurde mit einem gegen den konstanten Teil des ersten Antikörpers gerichteten, an Peroxidase gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Ungebundener Sekundäntikörper wurde anschließend erneut dreimal 10 min mit 1x TBT gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem enhanced chemoluminescence system (ECL). Dafür wurden 10 ml ECL II-Lösung mit 150 µl ECL I-Lösung und 8 µl 30 % H₂O₂ gemischt, die Membran für eine Minute in dieser Lösung inkubiert und anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

7.2.3.3 Immunpräzipitation aus Kulturzellextrakten

Für die Immunpräzipitation (IP) aus Extrakten von HeLa-Zellen wurden diese in 15cm-Schalen eingesät und mit 12µg des entsprechenden Plasmids nach Herstellerangaben transfiziert (Nanofectin-Kit, PAA). Nach 2d wurden die Zellen in 1,5ml IPP300/0,5% aufgenommen und durch Scheren (20G und 24G Kanülen) lysiert. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (30min, 13.000rpm, 4°C) und der klare Überstand wurde für die IP verwendet.

Immunpräzipitiert wurde mit einem HA-Antikörper, der kovalent an eine Sepharose-Matrix gekoppelt war (HA-Sepharose, Sigma). Pro Ansatz wurden 20µl der Matrix mit ca. 300-500 µl Extrakt in einem 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß für 1h bei 4°C inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit IPP300/0,05% wurde die Matrix in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 100µl PK-Puffer sowie 100µl saurem Phenol versetzt. Die Aufarbeitung der wässrigen und organischen Phasen erfolgte wie in Kapitel 7.2.2.8 beschrieben.

7.2.3.4 Immunpräzipitation aus Zebrafischextrakten

Für die Immunpräzipitation aus Zebrafischlarven wurden diese zunächst wie in Kapitel 7.2.5.3 beschrieben mit einer RNA injiziert, die für das entsprechende HA-Epitopmarkierte Protein kodiert. Um die Einbaurate in zelluläre Komplexe zu erhöhen wurde in einigen Ansätzen gleichzeitig die Expression des endogenen Proteins durch Co-Injektion eines Morpholinos inhibiert. Zehn Stunden nach Befruchtung (10hpf) wurden ca. 100-150 Embryonen in ein Eppendorf-Gefäß überführt und nach Abnahme des Puffers in flüssigem Stickstoff eingefroren (Aufbewahrung bei -80°C). Zur Extraktpräparation wurden 2µl IPP300/0,5% pro Embryo zugegeben, dann wurde durch Sonifizierung lysiert (Microtip, Stufe 6, 4-6 Stöße bei 50%, dazwischen 1 min auf Eis). Um den lipidreichen Dotter zu entfernen wurde mit 100µl Heptan ausgeschüttelt. Das Gemisch wurde in der Tischzentrifuge zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C, 30 min), wodurch die Zelltrümmer pelletiert wurden und die Heptanphase aufschwamm. Der klare Extrakt wurde mit einer Pipette aus der Mitte abgenommen und für die Immunpräzipitation (siehe 7.2.3.3) eingesetzt.

7.2.3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Adhärente wildtypische oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24 h nach der Transfektion) wurden auf sterile Deckgläschen in 6-well-Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40 % kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums wurde mit 4 % Formaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Nach

einem Waschschrift in PBS (5 min) wurden die Zellen mit 0,2% Triton-X100 in PBS mit 1% BSA permeabilisiert (30 min). Nach erneutem Waschen wurde mit den entsprechenden Antikörpern in 1%BSA/PBS inkubiert. Verdünnungen und Inkubationszeiten wurden je nach verwendetem Antikörper angepasst. Die Deckgläschen wurden kurz mit ddH₂O gewaschen, dann mit Vectashield+DAPI (Vector Labs, Burlingame, CA) eingedeckelt und mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Auflichtfluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) mit den Zeiss-Filtersätzen 10, 20 und 49, einer AxioCam MRm und der Bildaufnahme-software AxioVision (v4.8). Für die konfokale Laserscanningmikroskopie wurde ein Leica TCS SP2 AOBS verwendet.

7.2.4 Zellkultur

7.2.4.1 Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden in DMEM bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen (Ø 10 cm, Falcon) oder Zellkulturflaschen (175 cm², Gibco) kultiviert. Das Medium enthielt 10% (v/v) fötales Kälberserum (FCS, Gibco BRL) und wurde alle zwei Tage gewechselt. Vor Erreichen von 100 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 1% Trypsin in PBS (pH 7,4) von der Kulturschale abgelöst und in einer 1:10 Verdünnung auf neuen Kulturschalen ausgesät.

7.2.4.2 Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und in 10 ml DMEM aufgenommen. Nach Abzentrifugieren (300g, 5 min) wurden sie in Einfriermedium (10% DMSO in FCS) resuspendiert und in Cryo-Gefäße abgefüllt. Diese wurden Schrittweise (-20°C, -80°C, flN₂) eingefroren.

Das Auftauen der Zellen erfolgte schnell bei 37 °C im Wasserbad. 1 ml der aufgetauten Zellsuspension wurde mit 10 ml DMEM-Standardmedium gewaschen und in einer Zellkulturflasche weiterkultiviert.

7.2.4.3 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA in Säugerzellen

Zur Expression epitopmarkierter Proteine in Säugerzellen wurden diese mit Nanofektin (PAA, Linz) nach Herstellerangaben mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert.

7.2.5 Zebrafisch

7.2.5.1 Haltung und Zucht

Haltung und Zucht der Zebrafische erfolgte nach Standard-Methoden (Westerfield, 1994) in einem definierten Hell-/Dunkel-Zyklus (14h hell, 10h dunkel).

7.2.5.2 *In vitro*-Transkription von mRNA zur Injektion

Um Proteine in Zebrafischlarven überexprimieren zu können wurden die Leseraster in den pCS2-HA Vektor kloniert. Dieser ist ein selbst hergestelltes Derivat des pCS2p-Vektors, bei dem mittels Linker-Ligation eine für das HA-Epitop kodierende Sequenz in die BamHI-Schnittstelle der MCS eingefügt wurde. Nach der Linearisierung des Plasmids mit NotI erfolgte die *run-off* Transkription mit Hilfe des mMessage-Machine SP6-Kits (Promega) nach den Vorgaben des Herstellers. *In vitro* transkribierte RNA wurde mit einem RNeasy Mini-Kit oder durch Phenolisierung und anschließen-



de Fällung gereinigt. Zur Qualitätskontrolle wurde spektrophotometrisch die Absorption bei 260nm und 280nm bestimmt sowie eine Flachbett-Agarosegelelektrophorese nach Standardprotokoll durchgeführt.

7.2.5.3 Mikroinjektion von Embryonen

Zu injizierende Substanzen wurden in ddH₂O gelöst. Zur besseren Kontrastierung bei der Injektion wurde Phenolrot zugesetzt. Kapillaren (Harvard Apparatus, Kent, UK) wurden mit einem Nadelzieher (Sutter Instrument Co., Novato, CA; Modell P-97) selbst gezogen (heat=335, pull=150, vel.=100, time=150) und unmittelbar vor der Injektion aufgebrochen. Zur Injektion wurden Embryonen im Ein- oder Zweizellstadium in einem Agarosebett gleichmäßig ausgerichtet. Die Kapillare wurde mit Hilfe eines Mikromanipulators (Feinmechanikwerkstatt des Lehrstuhls für Biochemie) ausgerichtet, die Injektion erfolgte durch von der vegetalen Seite in den Dotter direkt unterhalb des Embryos mit einem Druckluftinjektor (Medical Systems Corp, Greenvale, NY; Modell PLI-100). Die Einstellungen wurden in Abhängigkeit von der Kapillaröffnung so gewählt das ca. 0,5 nl injiziert wurden.

7.2.5.4 Western-Blot Analyse einzelner Larven

Um einen Überblick über Erfolg und Gleichmäßigkeit der einzelnen Injektionen zu erhalten, wurden zu jedem Testzeitpunkt mehrere Larven entnommen und einzeln auf Repression beziehungsweise Überexpression der Zielproteine getestet. Dazu wurden die Embryonen einzeln in 0,5ml Eppendorf-Gefäße überführt, drainagiert und mit 20µl Fischprobenpuffer versetzt. Nach fünfminütigem Erhitzen auf 95°C wurde mit einer 20µl Gilson-Pipette homogenisiert, dann erneut für 5' erhitzt. Die so behandelten Proben wurden direkt auf ein SDS-Gel aufgetragen. Der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und die Immundetektion erfolgten nach Standardprotokoll.

7.2.5.5 Test des Optokinetischen Nystagmus (OKN)

Die Analyse des OKN erfolgte wie beschrieben (Neuhauss, 2003). Einzelne Larven wurden in einer Petrischale mit 3,5cm Durchmesser in 3%iger Methylzellulose fixiert. Das Bewegungsmuster wurde durch ein zylindrisches Metallgitter (12° Streifenbreite) erzeugt, das von Hinten beleuchtet wurde. Die Rotation erfolgte bei 6 rpm für 10 sec nach links und anschließend für 10 sec nach rechts. Von einigen Larven wurden die Augenbewegungen aufgenommen und mit den Programmen AxioVision (Zeiss), NIH-ImageJ und Excel analysiert (siehe Anhang).

7.2.5.6 Semi-quantitative RT-PCR

RNA wurde aus 20 Larven mit Trizol (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll extrahiert. Nach einem Verdau mit RQ I DNase (Promega) wurde die RNA mit Hilfe einer RNeasy-Säule (Mini-Maßstab, Qiagen) gereinigt. Danach erfolgte die reverse Transkription mit Superscript II Revers-Transkriptase (Invitrogen) und „random hexamer“ Primern.

8 Literatur

- Abramoff M, Magelhaes P & Ram S (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics Int* **11**: 36-42
- Abu-Safieh L, Vithana EN, Mantel I, Holder GE, Pelosini L, Bird AC & Bhattacharya SS (2006) A large deletion in the adRP gene PRPF31: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *Mol Vis* **12**: 384-388
- Ali RR, Reichel MB, Kanuga N, Munro PM, Alexander RA, Clarke AR, Luthert PJ, Bhattacharya SS & Hunt DM (1998) Absence of p53 delays apoptotic photoreceptor cell death in the rds mouse. *Curr. Eye Res* **17**: 917-923
- Audo I, Bujakowska K, Mohand-Said S, Lancelot M-E, Moskova-Doumanova V, Waseem N, Antonio A, Sahel J-A, Bhattacharya S & Zeitz C (2010) Prevalence and novelty of PRPF31 mutations in French autosomal dominant rod-cone dystrophy patients and a review of published reports. *BMC Medical Genetics* **11**: 145
- Ayadi L, Callebaut I, Saguez C, Villa T, Mornon JP & Banroques J (1998) Functional and structural characterization of the prp3 binding domain of the yeast prp4 splicing factor. *J Mol Biol* **284**: 673-87
- Ayadi L, Miller M & Banroques J (1997) Mutations within the yeast U4/U6 snRNP protein Prp4 affect a late stage of spliceosome assembly. *RNA* **3**: 197-209
- Badano JL & Katsanis N (2002) Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nat Rev Genet* **3**: 779-789
- Banroques J & Abelson JN (1989) PRP4: a protein of the yeast U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* **9**: 3710-3719
- Bell M, Schreiner S, Damianov A, Reddy R & Bindereif A (2002) p110, a novel human U6 snRNP protein and U4/U6 snRNP recycling factor. *EMBO J* **21**: 2724-2735
- Berget SM, Moore C & Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 3171-3175
- Bilotta J, Saszik S & Sutherland SE (2001) Rod contributions to the electroretinogram of the dark-adapted developing zebrafish. *Dev Dyn* **222**: 564-570
- Bjorn SP, Soltyk A, Beggs JD & Friesen JD (1989) PRP4 (RNA4) from *Saccharomyces cerevisiae*: its gene product is associated with the U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Mol Cell Biol* **9**: 3698-3709
- Blackshaw S, Fraioli RE, Furukawa T & Cepko CL (2001) Comprehensive Analysis of Photoreceptor Gene Expression and the Identification of Candidate Retinal Disease Genes. *Cell* **107**: 579-589
- Blencowe BJ, Ahmad S & Lee LJ (2009) Current-generation high-throughput sequencing: deepening insights into mammalian transcriptomes. *Genes & Development* **23**: 1379-1386
- Bok D (1985) Retinal photoreceptor-pigment epithelium interactions. Friedenwald lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* **26**: 1659-1694
- Bolz H (2005) Die Genetik der retinalen Dystrophien — ein Überblick. *Ophthalmologe* **102**: 661-73
- Bonnal S, Martínez C, Förch P, Bachi A, Wilm M & Valcárcel J (2008) RBM5/Luca-15/H37 Regulates Fas Alternative Splice Site Pairing after Exon Definition. *Mol Cell* **32**: 81-95
- Boon K-L, Grainger RJ, Ehsani P, Barrass JD, Auchynnikava T, Inglehearn CF & Beggs JD (2007) prp8 mutations that cause human retinitis pigmentosa lead to a U5 snRNP maturation defect in yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol* **14**: 1077-1083



- Boughman JA (1983) Deviations from the mendelian inheritance of retinitis pigmentosa. *Ophthalmic Genetics* **3**: 89–97
- Boughman JA & Fishman GA (1983) A genetic analysis of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* **67**: 449-454
- Brockerhoff SE, Hurley JB, Janssen-Bienhold U, Neuhauss SC, Driever W & Dowling JE (1995) A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10545-9
- Bujakowska K, Maubaret C, Chakarova CF, Tanimoto N, Beck SC, Fahl E, Humphries MM, Kenna PF, Makarov E, Makarova O, Paquet-Durand F, Ekstrom PA, van Veen T, Leveillard T, Humphries P, Seeliger MW & Bhattacharya SS (2009) Study of Gene-Targeted Mouse Models of Splicing Factor Gene Prpf31 Implicated in Human Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa (RP). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**: 5927-5933
- Carter-Dawson LD & Lavail MM (1979) Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy. *The Journal of Comparative Neurology* **188**: 245-262
- Chakarova CF, Hims MM, Bolz H, Abu-Safieh L, Patel RJ, Papaioannou MG, Inglehearn CF, Keen TJ, Willis C, Moore AT, Rosenberg T, Webster AR, Bird AC & Gal A (2002) Mutations in HPRP3, a third member of pre-mRNA splicing factor genes, implicated in autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Hum Mol Genet* **11**: 87-92
- Chow LT, Roberts JM, Lewis JB & Broker TR (1977) A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell* **11**: 819-836
- Clark TA, Sugnet CW & Ares M (2002) Genomewide Analysis of mRNA Processing in Yeast Using Splicing-Specific Microarrays. *Science* **296**: 907 -910
- Curcio CA, Sloan KR, Packer O, Hendrickson AE & Kalina RE (1987) Distribution of cones in human and monkey retina: individual variability and radial asymmetry. *Science* **236**: 579-582
- Daiger SP, Bowne SJ & Sullivan LS (2007) Perspective on Genes and Mutations Causing Retinitis Pigmentosa. *Arch Ophthalmol* **125**: 151-158
- Dignam JD, Lebovitz RM & Roeder RG (1983) Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475–1489
- Dowling JE (1987) The retina: an approachable part of the brain Harvard University Press
- Easter SSJ & Nicola GN (1996) The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Dev Biol* **180**: 646-63
- Evans K, al-Magthteh M, Fitzke FW, Moore AT, Jay M, Inglehearn CF, Arden GB & Bird AC (1995) Bimodal expressivity in dominant retinitis pigmentosa genetically linked to chromosome 19q. *Br J Ophthalmol* **79**: 841-846
- Fain GL (2006) Why photoreceptors die (and why they don't). *Bioessays* **28**: 344-54
- Fischer U, Liu Q & Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 Complex Has an Essential Role in Spliceosomal snRNP Biogenesis. *Cell* **90**: 1023-1029
- Fitzgibbon J, Hope A, Slobodyanyuk SJ, Bellingham J, Bowmaker JK & Hunt DM (1995) The rhodopsin-encoding gene of bony fish lacks introns. *Gene* **164**: 273-277
- Fleisch VC, Jametti T & Neuhauss SCF (2008) Electroretinogram (ERG) Measurements in Larval Zebrafish. *Cold Spring Harb Protoc* **2008**: pdb.prot4973
- Flicek P, Amode MR, Barrell D, Beal K, Brent S, Chen Y, Clapham P, Coates G, Fairley S, Fitzgerald S, Gordon L, Hendrix M, Hourlier T, Johnson N, Kahari A, Keefe D, Keenan S, Kinsella R, Kokocinski F, Kulesha E, et al. (2010) Ensembl 2011. *Nucleic Acids Research* **39**: D800-D806



- Gilbert W (1978) Why genes in pieces? *Nature* **271**: 501
- Golas MM, Sander B, Bessonov S, Grote M, Wolf E, Kastner B, Stark H & Lührmann R (2010) 3D Cryo-EM Structure of an Active Step I Spliceosome and Localization of Its Catalytic Core. *Mol. Cell* **40**: 927-938
- Goldsmith P (2001) Modelling eye diseases in zebrafish. *Neuroreport* **12**: A73-7
- Goldsmith P & Harris WA (2003) The zebrafish as a tool for understanding the biology of visual disorders. *Semin Cell Dev Biol* **14**: 11-8
- Gozani O, Feld R & Reed R (1996) Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A. *Genes & Development* **10**: 233 -243
- Graziotto JJ, Farkas MH, Bujakowska K, Deramaudt BM, Zhang Q, Nandrot EF, Inglehearn CF, Bhattacharya SS & Pierce EA (2011) Three Gene-Targeted Mouse Models of RNA Splicing Factor RP Show Late-Onset RPE and Retinal Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**: 190 -198
- Graziotto JJ, Inglehearn CF, Pack MA & Pierce EA (2008) Decreased levels of the RNA splicing factor Prpf3 in mice and zebrafish do not cause photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **49**: 3830-3838
- Griffith M, Tang MJ, Griffith OL, Morin RD, Chan SY, Asano JK, Zeng T, Flibotte S, Ally A, Baross A, Hirst M, Jones SJM, Morin GB, Tai IT & Marra MA (2008) ALEXA: a microarray design platform for alternative expression analysis. *Nat Meth* **5**: 118
- Häcker I, Sander B, Golas MM, Wolf E, Karagoz E, Kastner B, Stark H, Fabrizio P & Lührmann R (2008) Localization of Prp8, Brr2, Snu114 and U4/U6 proteins in the yeast tri-snRNP by electron microscopy. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 1206-1212
- Haider NB, Naggert J & Nishina PM (2001) Excess cone cell proliferation due to lack of a functional NR2E3 causes retinal dysplasia and degeneration in rd7/rd7 mice. *Human Molecular Genetics* **10**: 1619 -1626
- Haim M (2002) Epidemiology of retinitis pigmentosa in Denmark. *Acta Ophthalmol Scand Suppl*: 1-34
- Hamel C (2006) Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **1**: 40
- Harlow E & Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* 1st ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Hartong DT, Berson EL & Dryja TP (2006) Retinitis pigmentosa. *Lancet* **368**: 1795-809
- Hegedus Z, Zakrzewska A, Ágoston VC, Ordas A, Rácz P, Mink M, Spaink HP & Meijer AH (2009) Deep sequencing of the zebrafish transcriptome response to mycobacterium infection. *Molecular Immunology* **46**: 2918-2930
- Hennig AK, Peng G-H & Chen S (2008) Regulation of photoreceptor gene expression by Crx-associated transcription factor network. *Brain Research* **1192**: 114-133
- Hopp RM, Ransom N, Hilsenbeck SG, Papermaster DS & Windle JJ (1998) Apoptosis in the murine rd1 retinal degeneration is predominantly p53-independent. *Mol. Vis* **4**: 5
- Horowitz DS, Kobayashi R & Krainer AR (1997) A new cyclophilin and the human homologues of yeast Prp3 and Prp4 form a complex associated with U4/U6 snRNPs. *RNA* **3**: 1374-1387
- House AE & Lynch KW (2006) An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 937-944

- Hu D (1982) Genetic aspects of retinitis pigmentosa in China. *American Journal of Medical Genetics* **12**: 51-56
- Ivings L, Towns KV, Matin MA, Taylor C, Ponchel F, Grainger RJ, Ramesar RS, Mackey DA & Inglehearn CF (2008) Evaluation of splicing efficiency in lymphoblastoid cell lines from patients with splicing-factor retinitis pigmentosa. *Mol Vis.* **14**: 2357–2366
- Jay M (1982) On the heredity of retinitis pigmentosa. *Br J Ophthalmol* **66**: 405-416
- Jeon C-J, Strettoi E & Masland RH (1998) The Major Cell Populations of the Mouse Retina. *The Journal of Neuroscience* **18**: 8936 -8946
- Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R & Shoemaker DD (2003) Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science* **302**: 2141-2144
- Kajiwara K, Berson EL & Dryja TP (1994) Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* **264**: 1604-1608
- Katsanis N, Ansley SJ, Badano JL, Eichers ER, Lewis RA, Hoskins BE, Scambler PJ, Davidson WS, Beales PL & Lupski JR (2001) Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science* **293**: 2256-2259
- Kawamura S & Tachibanaki S (2008) Rod and cone photoreceptors: Molecular basis of the difference in their physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* **150**: 369-377
- Kawashima T, Pellegrini M & Chanfreau GF (2009) Nonsense-mediated mRNA decay mutes the splicing defects of spliceosome component mutations. *RNA* **15**: 2236-2247
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Research* **35**: W43-W46
- Kisselev OG (2005) Focus on Molecules: Rhodopsin. *Experimental Eye Research* **81**: 366-367
- Laggerbauer B, Ostareck D, Keidel EM, Ostareck-Lederer A & Fischer U (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum Mol Genet* **10**: 329-38
- Lamond AI & Spector DL (2003) Nuclear speckles: a model for nuclear organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**: 605-12
- Larison KD & Bremiller R (1990) Early onset of phenotype and cell patterning in the embryonic zebrafish retina. *Development* **109**: 567-576
- LaVail M (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* **194**: 1071 -1074
- Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frezal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A & Melki J (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80**: 155-65
- Legrain P & Rosbash M (1989) Some cis- and trans-acting mutants for splicing target pre-mRNA to the cytoplasm. *Cell* **57**: 573-583
- Li L, Nakaya N, Chavali VRM, Ma Z, Jiao X, Sieving PA, Riazuddin S, Tomarev SI, Ayyagari R, Riazuddin SA & Hejtmancik JF (2010a) A mutation in ZNF513, a putative regulator of photoreceptor development, causes autosomal-recessive retinitis pigmentosa. *Am. J. Hum. Genet* **87**: 400-409



- Li N, Mei H, MacDonald IM, Jiao X & Hejtmancik JF (2010b) Mutations in ASCC3L1 on 2q11.2 Are Associated with Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa in a Chinese Family. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **51**: 1036-1043
- Li ZY, Possin DE & Milam AH (1995) Histopathology of bone spicule pigmentation in retinitis pigmentosa. *Ophthalmology* **102**: 805-816
- Liu S, Li P, Dybkov O, Nottrott S, Hartmuth K, Luhrmann R, Carlomagno T & Wahl MC (2007) Binding of the Human Prp31 Nop Domain to a Composite RNA-Protein Platform in U4 snRNP. *Science* **316**: 115-120
- Liu S, Rauhut R, Vornlocher H-P & Luhrmann R (2006) The network of protein-protein interactions within the human U4/U6.U5 tri-snRNP. *RNA* **12**: 1418-30
- Madhani H (1992) A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome. *Cell* **71**: 803-817
- Maeder C, Kutach AK & Guthrie C (2009) ATP-dependent unwinding of U4/U6 snRNAs by the Brr2 helicase requires the C terminus of Prp8. *Nat Struct Mol Biol* **16**: 42-48
- Makarov EM, Makarova OV, Urlaub H, Gentzel M, Will CL, Wilm M & Luhrmann R (2002) Small nuclear ribonucleoprotein remodeling during catalytic activation of the spliceosome. *Science* **298**: 2205-8
- Makarova OV, Makarov EM, Liu S, Vornlocher H-P & Luhrmann R (2002) Protein 61K, encoded by a gene (PRPF31) linked to autosomal dominant retinitis pigmentosa, is required for U4/U6*U5 tri-snRNP formation and pre-mRNA splicing. *EMBO J* **21**: 1148-57
- Makarova OV, Makarov EM, Urlaub H, Will CL, Gentzel M, Wilm M & Luhrmann R (2004) A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. *EMBO J* **23**: 2381-91
- Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat. Neurosci* **4**: 877-886
- Maubaret CG, Vaclavik V, Mukhopadhyay R, Waseem NH, Churchill A, Holder GE, Moore AT, Bhattacharya SS & Webster AR (2011) Autosomal Dominant Retinitis Pigmentosa with Intrafamilial Variability and Incomplete Penetrance in Two Families Carrying Mutations in PRPF8. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**: 9304-9309
- McKie AB, McHale JC, Keen TJ, Tarttelin EE, Goliath R, van Lith-Verhoeven JJ, Greenberg J, Ramesar RS, Hoyng CB, Cremers FP, Mackey DA, Bhattacharya SS, Bird AC, Markham AF & Inglehearn CF (2001) Mutations in the pre-mRNA splicing factor gene PRPC8 in autosomal dominant retinitis pigmentosa (RP13). *Hum Mol Genet* **10**: 1555-62
- McWhorter ML, Monani UR, Burghes AHM & Beattie CE (2003) Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* **162**: 919-931
- Mordes D, Luo X, Kar A, Kuo D, Xu L, Fushimi K, Yu G, Sternberg PJ & Wu JY (2006) Pre-mRNA splicing and retinitis pigmentosa. *Mol Vis* **12**: 1259-71
- Morimura H, Fishman GA, Grover SA, Fulton AB, Berson EL & Dryja TP (1998) Mutations in the RPE65 gene in patients with autosomal recessive retinitis pigmentosa or Leber congenital amaurosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 3088-3093
- Muñoz MJ, Santangelo MSP, Paronetto MP, de la Mata M, Pelisch F, Boireau S, Glover-Cutter K, Ben-Dov C, Blaustein M, Lozano JJ, Bird G, Bentley D, Bertrand E & Kornblihtt AR (2009) DNA Damage Regulates Alternative Splicing through Inhibition of RNA Polymerase II Elongation. *Cell* **137**: 708-720
- Murphy D (2002) Gene expression studies using microarrays: principles, problems, and prospects. *Adv Physiol Educ* **26**: 256-270

- Nájera C, Millán JM, Beneyto M & Prieto F (1995) Epidemiology of retinitis pigmentosa in the valencian community (Spain). *Genetic Epidemiology* **12**: 37-46
- Nasevicius A & Ekker SC (2000) Effective targeted gene “knockdown” in zebrafish. *Nat Genet* **26**: 216-220
- Neubauer G, King A, Rappsilber J, Calvio C, Watson M, Ajuh P, Sleeman J, Lamond A & Mann M (1998) Mass spectrometry and EST-database searching allows characterization of the multi-protein spliceosome complex. *Nature Genetics* **20**: 46-50
- Neuenkirchen N, Chari A & Fischer U (2008) Deciphering the assembly pathway of Sm-class U snRNPs. *FEBS Lett*
- Neuhauss SCF (2003) Behavioral genetic approaches to visual system development and function in zebrafish. *J Neurobiol* **54**: 148-160
- Nilsen TW (2003) The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *BioEssays* **25**: 1147-1149
- Nottrott S, Urlaub H & Luhrmann R (2002) Hierarchical, clustered protein interactions with U4/U6 snRNA: a biochemical role for U4/U6 proteins. *EMBO J* **21**: 5527-38
- Novotny I, Blazikova M, Stanek D, Herman P & Malinsky J (2010) In vivo kinetics of U4/U6bulletU5 tri-snRNP formation in Cajal Bodies. *Mol. Biol. Cell*: mbc.E10-07-0560
- Ordas A, Hegedus Z, Henkel CV, Stockhammer OW, Butler D, Jansen HJ, Racz P, Mink M, Spaink HP & Meijer AH (2010) Deep sequencing of the innate immune transcriptomic response of zebrafish embryos to Salmonella infection. *Fish Shellfish Immunol* Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20816807> [Accessed April 10, 2011]
- Osterberg G (1937) Topography of the Layer of Rods and Cones in the Human Retina. *Journal of the American Medical Association* **108**: 232
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ & Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat Genet* **40**: 1413-1415
- Patel SB & Bellini M (2008) The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Research* **36**: 6482 -6493
- Pierce ME, Sheshberadaran H, Zhe Zhang, Fox LE, Applebury ML & Takahashi JS (1993) Circadian regulation of Iodopsin gene expression in embryonic photoreceptors in retinal cell culture. *Neuron* **10**: 579-584
- Plöttner O (2002) SMNrp und TUBA : Isolierung und Charakterisierung zweier neuer Gene mit Homologie zu SMN, dem Krankheitsgen der spinalen Muskelatrophie / Dissertation vorgelegt von Oliver Plöttner
- Rader SD & Guthrie C (2002) A conserved Lsm-interaction motif in Prp24 required for efficient U4/U6 di-snRNP formation. *RNA* **8**: 1378 -1392
- Raghuathan PL & Guthrie C (1998) RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Current Biology* **8**: 847-855
- RetNet, the Retinal Information Network Available at: <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/> [Accessed January 14, 2010]
- Rieke F (2000) Mechanisms of single-photon detection in rod photoreceptors. *Meth. Enzymol* **316**: 186-202
- Rinner O, Rick JM & Neuhauss SCF (2005) Contrast sensitivity, spatial and temporal tuning of the larval zebrafish optokinetic response. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**: 137-42



- Rio Frio T, Wade NM, Ransijn A, Berson EL, Beckmann JS & Rivolta C (2008) Premature termination codons in PRPF31 cause retinitis pigmentosa via haploinsufficiency due to nonsense-mediated mRNA decay. *J Clin Invest* **118**: 1519-1531
- Rivolta C, McGee TL, Rio Frio T, Jensen RV, Berson EL & Dryja TP (2006) Variation in retinitis pigmentosa-11 (PRPF31 or RP11) gene expression between symptomatic and asymptomatic patients with dominant RP11 mutations. *Hum Mutat* **27**: 644-653
- Robu ME, Larson JD, Nasevicius A, Beiraghi S, Brenner C, Farber SA & Ekker SC (2007) p53 activation by knockdown technologies. *PLoS Genet* **3**: e78
- Rösel TD, Hung L-H, Medenbach J, Donde K, Starke S, Benes V, Rättsch G & Bindereif A (2011) RNA-Seq analysis in mutant zebrafish reveals role of U1C protein in alternative splicing regulation. *EMBO J*. **30**: 1965-1976
- Rosenfeld PJ, Cowley GS, McGee TL, Sandberg MA, Berson EL & Dryja TP (1992) A Null mutation in the rhodopsin gene causes rod photoreceptor dysfunction and autosomal recessive retinitis pigmentosa. *Nat Genet* **1**: 209-213
- Rossoll W & Bassell GJ (2009) Spinal muscular atrophy and a model for survival of motor neuron protein function in axonal ribonucleoprotein complexes. *Results Probl Cell Differ* **48**: 289-326
- Sambrook J & Russell DW (2000) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3 Vol. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory
- Sancho-Pelluz J, Arango-Gonzalez B, Kustermann S, Romero FJ, van Veen T, Zrenner E, Ekström P & Paquet-Durand F (2008) Photoreceptor cell death mechanisms in inherited retinal degeneration. *Mol. Neurobiol* **38**: 253-269
- Schaffert N, Hossbach M, Heintzmann R, Achsel T & Luhrmann R (2004) RNAi knockdown of hPrp31 leads to an accumulation of U4/U6 di-snRNPs in Cajal bodies. *EMBO J* **23**: 3000-3009
- von Schantz M, Lucas RJ & Foster RG (1999) Circadian oscillation of photopigment transcript levels in the mouse retina. *Brain Res Mol Brain Res* **72**: 108-114
- Schmitt EA & Dowling JE (1999) Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses. *J Comp Neurol* **404**: 515-36
- Seeliger MW, Rilk A & Neuhauss SCF (2002) Ganzfeld ERG in zebrafish larvae. *Doc Ophthalmol* **104**: 57-68
- Sharma S, Kohlstaedt LA, Damianov A, Rio DC & Black DL (2008) Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nat. Struct. Mol. Biol* **15**: 183-191
- Shin JT & Fishman MC (2002) From Zebrafish to human: modular medical models. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**: 311-40
- Shu X, Zeng Z, Gautier P, Lennon A, Gakovic M, Patton EE & Wright AF (2010) Zebrafish Rprgr is required for normal retinal development and plays a role in dynein-based retrograde transport processes. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 657-670
- Smith DJ, Query CC & Konarska MM (2008) "Nought May Endure but Mutability": Spliceosome Dynamics and the Regulation of Splicing. *Molecular Cell* **30**: 657-666
- Song EJ, Werner SL, Neubauer J, Stegmeier F, Aspden J, Rio D, Harper JW, Elledge SJ, Kirschner MW & Rape M (2010) The Prp19 complex and the Usp4Sart3 deubiquitinating enzyme control reversible ubiquitination at the spliceosome. *Genes & Development* **24**: 1434 - 1447

- Staněk D, Rader SD, Klingauf M & Neugebauer KM (2003) Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *J Cell Biol* **160**: 505-516
- Stevens SW & Abelson J (1999) Purification of the yeast U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein particle and identification of its proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 7226-7231
- Sung C-H & Chuang J-Z (2010) Review series: The cell biology of vision. *J. Cell Biol* **190**: 953-963
- Swaroop A, Kim D & Forrest D (2010) Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nat Rev Neurosci* **11**: 563-576
- Tanackovic G & Rivolta C (2009) PRPF31 alternative splicing and expression in human retina. *Ophthalmic Genet* **30**: 76-83
- Tanackovic G, Ransijn A, Ayuso C, Harper S, Berson EL & Rivolta C (2011a) A Missense Mutation in PRPF6 Causes Impairment of pre-mRNA Splicing and Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa. *The American Journal of Human Genetics* **88**: 643-649
- Tanackovic G, Ransijn A, Thibault P, Abou Elela S, Klinck R, Berson EL, Chabot B & Rivolta C (2011b) PRPF mutations are associated with generalized defects in spliceosome formation and pre-mRNA splicing in patients with retinitis pigmentosa. *Hum. Mol. Genet* **20**: 2116-2130
- Teigelkamp S, Achsel T, Mundt C, Gothel SF, Cronshagen U, Lane WS, Marahiel M & Luhrmann R (1998) The 20kD protein of human [U4/U6.U5] tri-snRNPs is a novel cyclophilin that forms a complex with the U4/U6-specific 60kD and 90kD proteins. *RNA* **4**: 127-41
- Towbin H, Staehelin T & Gordon J (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**: 145-9
- Trede NS, Medenbach J, Damianov A, Hung L-H, Weber GJ, Paw BH, Zhou Y, Hersey C, Zapata A, Keefe M, Barut BA, Stuart AB, Katz T, Amemiya CT, Zon LI & B (2007) Network of coregulated spliceosome components revealed by zebrafish mutant in recycling factor p110. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 6608-6613
- Vaclavik V, Gaillard M-C, Tiab L, Schorderet DF & Munier FL (2010) Variable phenotypic expressivity in a Swiss family with autosomal dominant retinitis pigmentosa due to a T494M mutation in the PRPF3 gene. *Mol. Vis* **16**: 467-475
- Valadkhan S & Jaladat Y (2010) The spliceosomal proteome: At the heart of the largest cellular ribonucleoprotein machine. *Proteomics* **10**: 4128-4141
- Valcárcel J, Gaur RK, Singh R & Green MR (1996) Interaction of U2AF65 RS Region with Pre-mRNA of Branch Point and Promotion Base Pairing with U2 snRNA. *Science* **273**: 1706 -1709
- Verkerk AJMH, Pieretti M, Sutcliffe JS, Fu Y-H, Kuhl DPA, Pizzuti A, Reiner O, Richards S, Victoria MF, Zhang F, Eussen BE, van Ommen G-JB, Blonden LAJ, Riggins GJ, Chastain JL, Kunst CB, Galjaard H, Thomas Caskey C, Nelson DL, Oostra BA, et al. (1991) Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* **65**: 905-914
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Allen MJ, Carey A, Papaioannou M, Chakarova C, Al-Magthteh M, Ebenezer ND, Willis C, Moore AT, Bird AC, Hunt DM & Bhattacharya SS (2001) A human homolog of yeast pre-mRNA splicing gene, PRP31, underlies autosomal dominant retinitis pigmentosa on chromosome 19q13.4 (RP11). *Mol Cell* **8**: 375-81
- Vithana EN, Abu-Safieh L, Pelosini L, Winchester E, Hornan D, Bird AC, Hunt DM, Bustin SA & Bhattacharya SS (2003) Expression of PRPF31 mRNA in patients with autosomal dominant retinitis pigmentosa: a molecular clue for incomplete penetrance? *Invest Ophthalmol Vis Sci* **44**: 4204-4209



- Wahl MC, Will CL & Lührmann R (2009) The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701-718
- Weidenhammer EM, Ruiz-Noriega M & Woolford JLJ (1997) Prp31p promotes the association of the U4/U6 x U5 tri-snRNP with prespliceosomes to form spliceosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 3580-8
- Weidenhammer EM, Singh M, Ruiz-Noriega M & Woolford JLJ (1996) The PRP31 gene encodes a novel protein required for pre-mRNA splicing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **24**: 1164-1170
- Westerfield M (1994) *The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish Rep Spiral*. Inst of Neuro Science
- Wilkie SE, Vaclavik V, Wu H, Bujakowska K, Chakarova CF, Bhattacharya SS, Warren MJ & Hunt DM (2008) Disease mechanism for retinitis pigmentosa (RP11) caused by missense mutations in the splicing factor gene PRPF31. *Mol Vis* **14**: 683-90
- Will CL, Urlaub H, Achsel T, Gentzel M, Wilm M & Luhrmann R (2002) Characterization of novel SF3b and 17S U2 snRNP proteins, including a human Prp5p homologue and an SF3b DEAD-box protein. *EMBO J* **21**: 4978-4988
- Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Lagerbauer B & Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* **19**: 2320-2330
- Wittkopp N, Huntzinger E, Weiler C, Sauliere J, Schmidt S, Sonawane M & Izaurralde E (2009) Nonsense-Mediated mRNA Decay Effectors Are Essential for Zebrafish Embryonic Development and Survival. *Mol. Cell. Biol.* **29**: 3517-3528
- Wright AF, Chakarova CF, Abd El-Aziz MM & Bhattacharya SS (2010) Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait. *Nat Rev Genet* **11**: 273-284
- Xu Y-Z & Query CC (2007) Competition between the ATPase Prp5 and Branch Region-U2 snRNA Pairing Modulates the Fidelity of Spliceosome Assembly. *Molecular Cell* **28**: 838-849
- Yuan L, Kawada M, Havlioglu N, Tang H & Wu JY (2005) Mutations in PRPF31 inhibit pre-mRNA splicing of rhodopsin gene and cause apoptosis of retinal cells. *J Neurosci* **25**: 748-57
- Zhao C, Bellur DL, Lu S, Zhao F, Grassi MA, Bowne SJ, Sullivan LS, Daiger SP, Chen LJ, Pang CP, Zhao K, Staley JP & Larsson C (2009) Autosomal-Dominant Retinitis Pigmentosa Caused by a Mutation in SNRNP200, a Gene Required for Unwinding of U4/U6 snRNAs. *The American Journal of Human Genetics* **85**: 617-627



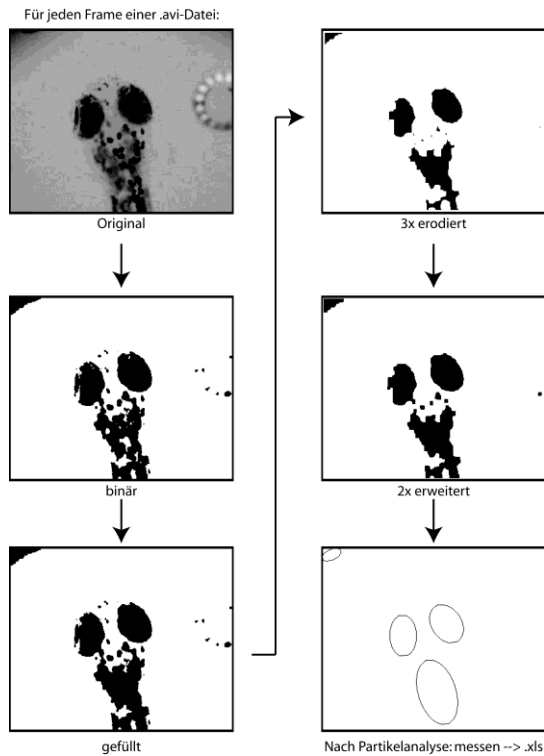
9 Abbildungsverzeichnis & Copyright

ABBILDUNG 3.1: KRANKHEITSBILD DER RETINITIS PIGMENTOSA	5
Augenfundus: verändert nach: http://www.nei.nih.gov/photo/eyedis/images/eye15-72.jpg , National Eye Institute, NIH	
RP-Augenfundus: verändert nach: http://www.ojrd.com/content/1/1/40/figure/F2 , Autor: Christian Hamel, CC BY-NC 2.0	
"Gesichtsfeld" verändert nach: http://www.flickr.com/photos/oufc_gav/3364187652 , Autor: OUFC_Gav, CC BY-NC 2.0	
ABBILDUNG 3.2: ÜBERSICHT DER ADRP-KRANKHEITSGENE.....	6
Nach: Hartong et al., 2006, mit Genehmigung von Elsevier	
ABBILDUNG 3.3: AUFBAU DES AUGES UND DER RETINA.....	7
Augenschema: verändert nach http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eye-diagram.svg#file , Autor: Chabacano, CC BY-SA 3.0	
Retinaschnitt: Nach: Hartong et al., 2006, mit Genehmigung von Elsevier	
ABBILDUNG 3.4: AUFBAU UND VERTEILUNG DER PHOTOREZEPTOREN	8
Photorezeptorverteilung: Nach Osterberg, 1937	
ABBILDUNG 3.5: MECHANISMUS DES SPLEIßENS	10
ABBILDUNG 3.6: ZUSAMMENSETZUNG DER SPLEIßOSOMALEN SNRNPS	11
ABBILDUNG 3.7: PROTEINZUSAMMENSETZUNG DER SPLEIßOSOMALEN SNRNPS.....	12
ABBILDUNG 3.8: DER SPLEIßOSOMALE ZYKLUS.....	13
ABBILDUNG 3.9: DER EINTRITT DES TRI-SNRNPS IN DEN ZYKLUS KANN DAS SPLEIßMUSTER BEEINFLUSSEN.	13
ABBILDUNG 3.10: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES TRI-SNRNPS	14
Nach: Häcker et al., 2008, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd	
ABBILDUNG 3.11: DIE FEHLSPLEIß-HYPOTHESE FÜR RP.....	15
tri-snrNP nach: Häcker et al., 2008, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd	
Retinaschnitte nach: Hartong et al., 2006, mit Genehmigung von Elsevier	
ABBILDUNG 5.1: DIE INJEKTION EINER LETALEN DOSIS VON <i>PRPF31</i> -MORPHOLINO WIRD DURCH <i>PRPF31</i> -MRNA GERETTET	19
ABBILDUNG 5.2: DER SUBLETALE KNOCKDOWN VON <i>PRPF31</i> ERLAUBT EINE NORMALE EMBRYONALENTWICKLUNG.....	20
ABBILDUNG 5.3: DER OPTOKINETISCHE NYSTAGMUS IST IN <i>PRPF31</i> -MORPHANTEN STARK REDUZIERT	21
ABBILDUNG 5.4: HA- <i>PRPF31</i> BESITZT EINE GERINGE HALBWERTSZEIT	21
ABBILDUNG 5.5: PHOTOREZEPTORDEFEKTE IN <i>PRPF31</i> -MORPHANTEN	22
ABBILDUNG 5.6: KONTROLLEN ZUR SPEZIFITÄT DES PHÄNOTYPS.....	23
ABBILDUNG 5.7: MICROARRAY-ANALYSE DER AUGEN <i>PRPF31</i> -DEFIZIENTER ZEBRAFISCHLARVEN.....	25
ABBILDUNG 5.8: OKN-TEST DER <i>PRPF4</i> -MORPHANTEN	26
ABBILDUNG 5.9: PHOTOREZEPTORDEFEKTE IN <i>PRPF4</i> -DEFIZIENTEN ZEBRAFISCHLARVEN.....	26
ABBILDUNG 5.10: REGULATION RP-RELEVANTER TRANSKRIPTE IM <i>PRPF31</i> - UND <i>PRPF4</i> -MODELL	27
ABBILDUNG 5.11: SUBLETALE <i>PRPF4</i> -MORPHANTEN ENTWICKELTEN SICH WEITGEHEND NORMAL	27
ABBILDUNG 5.12: STAMMBAUM DER P.R192H FAMILIE.....	28
ABBILDUNG 5.13: P.R192H- <i>PRPF4</i> BINDET NICHT MEHR AN <i>PRPF3</i> , LOKALISIERT ABER IM ZELLKERN	28
ABBILDUNG 5.14: RP-MUTANTES P.R192H- <i>PRPF4</i> INTEGRIERT NICHT MEHR IN SNRNPS	29
ABBILDUNG 5.15: <i>PRPF4</i> -P.R192H IST NICHT DOMINANT NEGATIV.....	30
ABBILDUNG 5.16: DIE MUTATION P.R192H FÜHRT ZU EINEM FUNKTIONSVERLUST VON <i>PRPF4</i>	30
ABBILDUNG 6.1: SCHWELLENWERTMODELL FÜR DIE TRI-SNRNP-AKTIVITÄT	36
tri-snrNP nach: Häcker et al., 2008, mit Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd	
Retinaschnitte nach: Hartong et al., 2006, mit Genehmigung von Elsevier	

10 Anhang

10.1 ImageJ- und Excel-Skripte zur OKN-Analyse

10.1.1 Augenvermessung in ImageJ



Die mit AxioVision (Carl Zeiss, Jena) erstellten 20 Sekunden langen OKN-Aufnahmen wurden als AVI-Filme exportiert. Die semi-automatische Analyse erfolgte dann mit dem Programm NIH ImageJ (Abramoff et al., 2004) nach dem links dargestellten Schema. Nach dem Freistellen der Augen über Kontrasterhöhung, Umwandlung in Binärbilder und Algorithmen zur Partikelseparation wurde eine Partikelanalyse durchgeführt. Die in Fläche und Winkel mit den Augen übereinstimmenden Partikel wurden dann mit Hilfe des untenstehenden ImageJ-Makros vermessen und die Werte in einer Excel-Tabelle gespeichert. Zur Kontrolle der Bewegung der Körperachse wurde auch diese in die Analyse miteinbezogen (Reihenfolge der Messung: linkes Auge / Körperachse / rechtes Auge).

```
// This tool uses the wand tool to measure particle size and orientation of the left
eye/body axis/right eye, which are then written into separate tabs of an Excel spreadsheet
```

```
macro "Wand Auge-Measure Tool -C00b-Lee22-o2244" {
    requires("1.30k");

    run("Set Measurements...", "area mean centroid perimeter fit redirect=None decimal=2");

    getCursorLoc(x, y, z, flags);

    for(i=1; i<(nSlices+1); i++) {
        doWand(x, y);
        if (selectionType!=0)
            run("Measure");
        run("Next Slice [>]");
    }

    run("Excel...", "menuWriteRT=%userprofile%\Result.xls");
    run("Clear Results");

    setSlice(1);
    run("Select None");
}
```

10.1.2 Excel Datenauswertung

Die durch das ImageJ-Makros erstellten Excel Dateien wurden mit einer Dokumentvorlage (siehe Abbildung) und den unten aufgeführten VisualBasic-Makros „data“ und „diag_neu“ ausgewertet.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	time [sec]	left abs	body	right abs	left rel	right rel					framerate	
2											0	
3											n frames	length
4												20
5											data aq.	
6											diagram	diag here

```

Sub data()
'
' data aquisition from ImageJ eye analysis spreadsheet (left eye/body axis/right eye)
'
Columns("A:D").Select
Selection.NumberFormat = "0.00"
Range("K4").Select
ActiveCell.FormulaR1C1 = "=COUNT(IJResults1!C[-10])"
Range("A2").Select
n = Cells(4, 11).Value
i = 1
10
If i < n Then

    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(IJResults1!RC/Tabelle1!R2C11)"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(IJResults1!RC9)"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(IJResults2!RC9)"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(IJResults3!RC9)"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(Tabelle1!RC2-Tabelle1!RC3)"
    ActiveCell.Offset(0, 1).Range("A1").Select
    ActiveCell.FormulaR1C1 = "(Tabelle1!RC4-Tabelle1!RC3)"
    ActiveCell.Offset(1, "-5").Range("A1").Select
    i = i + 1
    GoTo 10
End If
Range("A2").Select

End Sub

Sub diag_neu()

Sheets("Tabelle1").Select
Charts.Add
ActiveChart.ChartType = xlXYScatter
ActiveChart.SetSourceData Source:=Sheets("Tabelle1").Range("A1:F625"), _
    PlotBy:=xlColumns
ActiveChart.Location Where:=xlLocationAsNewSheet
With ActiveChart
    .HasTitle = False
    .Axes(xlCategory, xlPrimary).HasTitle = False
    .Axes(xlValue, xlPrimary).HasTitle = False
End With

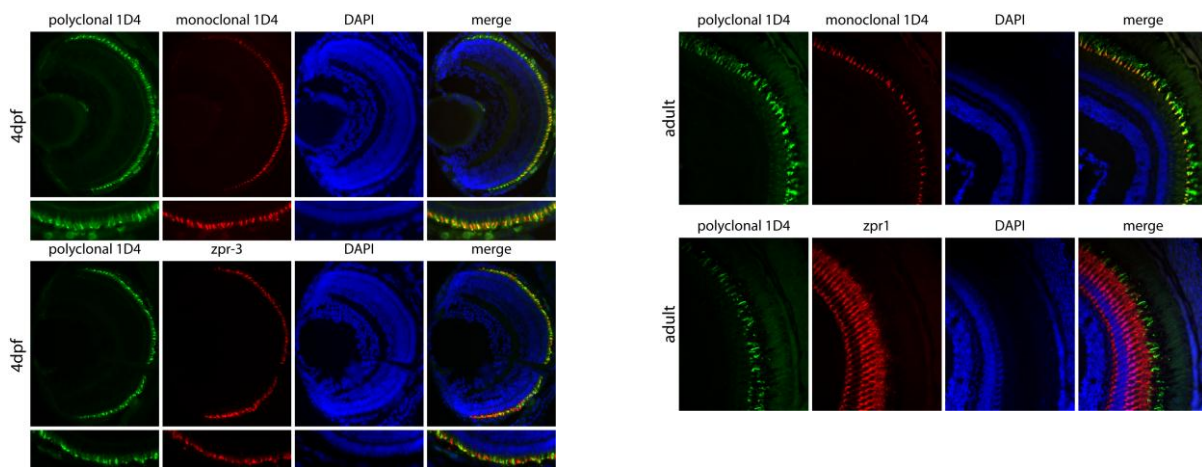
ActiveSheet.Buttons.Add(4946332.5, 189891.75, 461200.5, 120936.75).Select
Selection.OnAction = "PERSONL.XLS!Trend1"
ActiveSheet.Buttons.Add(5515546.5, 189891.75, 456057, 120936.75).Select
Selection.OnAction = "PERSONL.XLS!TrendWeg1"

End Sub

```

10.2 Charakterisierung des 1D4-Epitops

	10	20	30	40	50
D.r. UV opsin	PLIYAFM	NKQFNACIMETVFGKK	---	IDES-SEVS-SKTETS	-----SVSA--
D.r. blue opsin	PVIYVLM	NKQFRSCMMKMVFNKN	---	IEEDEASSSSQVTQVS	-----SVAPEK
D.r. red opsin	PVIYVFM	NKQFRVCIMQ-LFGKK	---	VDDG-SEVSTSKTEVS	-----SVAPA-
D.r. green opsin 2	PVIYVLL	NKQFRNCMLTTLFCGKNPLGDDESSTVSTSKTEVS	-----	SVSPA-	
D.r. green opsin 1	PVIYVLL	NKQFRSCMLNTLFCGKSPLGDESSTVSTSKTEVS	-----	SVSPA-	
D.r. rhodopsin	PCIYICM	NKQFRHCMITTLCCGKNPFEEEEGASTTASKTEASSVSSSSVSPA-			
B.t. rhodopsin	PVIYIMM	NKQFRNCMVTTLCCGKNPLGDDEASTT-VSKTETS	-----	QVAPA-	



Während der Anfertigung dieser Arbeit wurde festgestellt, dass der kommerziell erhältliche, gegen bovines Rhodopsin gerichtete 1D4-Antikörper (Abcam; ab5417) im Zebrafisch möglicherweise mit einem Zapfen-Opisin kreuzreagiert. Dafür sprechen mehrere Hinweise: Erstens ist das Epitop des monoklonalen 1D4-Antikörpers (rot unterstrichen im obigen Alignment) im Zebrafisch-Rhodopsin nicht konserviert, stattdessen zeigt das UV-sensitive Opisin einen durchgängigen Abschnitt von 6 Aminosäuren, die zu 100% konserviert sind. Zweitens zeigten Färbungen der Zebrafischretina mit einem polyklonalen Antikörper, der durch Immunisierung mit dem 1D4-Epitop hergestellt wurde (Abcam; ab3424), sowohl in larvaler (links) als auch in adulter Retina (rechts) nur eine partielle Co-Lokalisation, obwohl beide Antikörper Rhodopsin erkennen sollten. Der polyklonale Antikörper färbte dabei einen Bereich, der über den des monoklonalen hinausging. Drittens wurde bei Verwendung des zpr-3 Marker-Antikörpers für Zebrafisch-Stäbchen (dessen genaues Epitop aber unbekannt ist; bezogen vom *zebrafish international resource center*; Larison & Bremiller, 1990) nur eine marginale Co-Lokalisation mit dem polyklonalen 1D4-Antikörper festgestellt (links, untere Reihe). Zuletzt zeigte die Co-Färbung von adulter Retina mit polyklonalem 1D4 und zpr-1, einem Marker für Zellkörper von Doppelzapfen (bezogen vom *zebrafish international resource center*; Larison & Bremiller, 1990) dass mit 1D4 Antikörpern eine Struktur gefärbt wird, die sich an die Zellkörper der Zapfen anschließt und die unterhalb der äußeren Segmente der Stäbchen lokalisiert ist (rechts, untere Reihe).

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass Antikörper gegen das 1D4-Epitop aus bovinem Rhodopsin im Zebrafisch – entgegen publizierter Daten (Shu et al., 2010; Li et al., 2010a) – wahrscheinlich die äußeren Segmente von Zapfen-Phototorezeptoren erkennen.

10.3 Listen der durch Prpf31-Mangel de-regulierten Transkripte

10.3.1 Herunterregulierte Transkripte

Genbank Acc. #	Unigene ID	Gene Symbol	Unigene Description	Fold change
AF109371	Dr.81279	opn1lw1	Opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive, 1	13,212
AF109373	Dr.8194	opn1sw1	Opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive 1	10,993
AF109369	Dr.81282	opn1mw1	Opsin 1 (cone pigments), medium-wave-sensitive, 1	10,923
BI318564	Dr.81960	wu:fk54a10	Wu:fk54a10 (gngt2)	10,272
AF109372	Dr.81284	opn1sw2	Opsin 1 (cone pigments), short-wave-sensitive 2	8,913
AY050500	Dr.81958	gnat2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2	8,069
BC076120	Dr.116975	opn1lw2	Opsin 1 (cone pigments), long-wave-sensitive, 2	6,965
BI879707	Dr.122786	arr3l	Arrestin 3, retinal (X-arrestin), like	6,258
BI671314	Dr.82605	rds4	Retinal degradation slow 4	6,243
BI879650	Dr.81932	gnb3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3	5,197
BI670920	Dr.81999	zgc:73075	Hypothetical protein LOC792069	5,031
BI671049	Dr.81958	gnat2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 2	4,785
BG308285	Dr.133096	rs1	Retinoschisis (X-linked, juvenile) 1	4,596
BG306392	Dr.117127	pde6c	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	4,485
AW117139	Dr.27787		Transcribed locus	4,483
BI670894	Dr.82951	guk1	Hypothetical protein LOC791705	4,438
AF105152	Dr.354	rho	Rhodopsin	4,277
AY050507	Dr.19203	gngt2	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 2	4,197
AW116389	Dr.79368	sf3a3	Splicing factor 3a, subunit 3	4,082
BG305602	Dr.9871	rcv1	Hypothetical protein LOC792025	3,970
BG305533	Data Not Found			3,627
BG304888	Dr.82827	zgc:73153	Zgc:73153	3,422
BI670875	Dr.81929		highly similar to Pde6h and Pde6g	3,234
CN507688	Dr.90388	zgc:114180	Zgc:114180	3,226
BM024636	Dr.119164	gnb5	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5	3,157
BI879829	Dr.9836	nme2l	Non-metastatic cells 2-like, protein (NM23B) expressed in	3,151
BI880387	Dr.121473	pd2	Similar to Pdc2 protein	3,113
BI851025	Dr.123168		Transcribed locus	3,095
AI601716	Dr.77996	LOC560585	Hypothetical LOC560585	3,064
BI879178	Dr.117127	pde6c	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	3,059
AF210643	Dr.81979	rds2	Retinal degradation slow 2	3,051
BI706530	Dr.117127	pde6c	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	3,039
BI879339	Dr.41804	zgc:153443	Zgc:153443	3,024
AF210644	Dr.82605	rds4	Retinal degradation slow 4	3,016
BI670974	Dr.133101	syph	Zgc:136469	2,991
AW116726	Data Not Found			2,973
BM103297	Dr.81227		Transcribed locus	2,949
AF091594	Dr.7598	snapt25b	Synaptosome-associated protein 25 b	2,948
AW279749	Dr.132827	wu:fj44c04		2,941
BC079490	Dr.84694	ncald	Hypothetical LOC554871	2,911
BI879430	Dr.81940	gngt1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma transducing activity polypeptide 1	2,884
AY050499	Dr.32527	gnat1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha transducing activity polypeptide 1	2,880
AF373869	Dr.113565	prom1b	Prominin-like 2	2,875
BI879855	Dr.12823		Transcribed locus	2,778
BI879406	Dr.81960	wu:fk54a10	Wu:fk54a10	2,769
BG308205	Dr.117127	pde6c	Phosphodiesterase 6C, cGMP-specific, cone, alpha prime	2,766
BI671117	Dr.83356	LOC565715	LOC565715 similar to Dynamin-1	2,727
BE015730	Dr.135477		Transcribed locus	2,709
BI671188	Dr.83363	bz1O1.1	similar to NMDA receptor 1	2,707
AI353551	Dr.72146	crygm2d3	Crystallin, gamma M2d3	2,699
BG306391	Dr.81947	arl3l2	ADP-ribosylation factor-like 3, like 2	2,689
BM185420	Dr.12107	ndrg1	Hypothetical protein LOC792085	2,642
AW826278	Dr.81046	syt1	Synaptotagmin I	2,635
BG306471	Data Not Found			2,632
BC095039	Dr.91527	tmem127	Transmembrane protein 127	2,603
BI879890	Dr.122916		Transcribed locus	2,589
CD605211	Data Not Found			2,586
CN020335	Dr.31395	zgc:113912	Zgc:113912	2,584
BM070961	Dr.82690	calb2	Calbindin 2, (calretinin)	2,581
BG985837	Dr.80135		Transcribed locus	2,535
AI353581	Dr.48843	si:ch211-214j24.	Hypothetical protein LOC796145	2,531
BE015711	Dr.28117	si:ch211-233a1.	5 Zgc:153429	2,528
BI879475	Dr.80934	scg3	Secretogranin III	2,518
BG308711	Dr.82805		CDNA clone IMAGE:7290186	2,512
BI981058	Dr.82836	rims2	Regulating synaptic membrane exocytosis 2	2,505
BI672331	Dr.83448	piwil1	Piwi-like 1 (Drosophila)	2,455
BI846913	Dr.84696	LOC793689	Hypothetical LOC556736 (discontinued)	2,447
BI878898	Dr.9155	nsf	N-ethylmaleimide-sensitive factor	2,443
BC095139	Dr.135075	Tmx3	Tmx3 (Zgc:110025)	2,435
BC057420	Dr.12107	ndrg1	Hypothetical protein LOC792085	2,401

Al626641	Dr.185		Transcribed locus	2,382
Bl318361	Dr.11214	gnao1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	2,377
BG306071	Dr.115227	LOC100149237	LOC100149237 similar to putative zinc finger protein (ISS)	2,358
Bl842600	Dr.83858	zgc:92704	Zgc:92704	2,357
Bl427769	Data Not Found			2,356
AW280482	Dr.81046	syt1	Synaptotagmin I	2,353
BM185288	Dr.15215		Transcribed locus	2,353
BM026607		pcdh1gb2	protocadherin 1 gamma b 2	2,335
BG892360	Dr.112896	LOC565641	Hypothetical LOC565641	2,329
Bl981277	Dr.79910	olfm1b	Zgc:92039	2,328
AW116377	Dr.79396	fbxw2	Hypothetical protein LOC791589	2,319
AW233059	Dr.80263	stxbp1	Syntaxin binding protein 1	2,311
Bl877872	Dr.33193	anp32e	Acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	2,304
BE015653	Dr.81985	gad1	Glutamate decarboxylase 1	2,297
Bl670861	Dr.12451	rpe65a	Retinal pigment epithelium-specific protein a	2,294
BG305916	Dr.82883		Transcribed locus	2,291
BC074037	Dr.32176	zgc:91852	Zgc:91852	2,276
Bl879765	Dr.82650	pp	Hypothetical protein LOC791859	2,255
Bl670895	Dr.69635	zgc:175209	Zgc:175209	2,241
AW165130	Dr.80632	zgc:73124	Zgc:73124	2,226
Al959661	Dr.43835	zgc:153148	Zgc:153148	2,224
Al793690	Dr.78986	dmbx1a	Diencephalon/mesencephalon homeobox 1a	2,222
Al793401	Data Not Found			2,209
BC095109	Dr.89401	zgc:109988	Zgc:109988	2,201
Al957521	Data Not Found			2,200
X85957	Dr.75802	irbp	Similar to interphotoreceptor retinol-binding protein	2,198
AW076850	Dr.22344	LOC100151239	Similar to family with sequence similarity 89, member B	2,188
Bl325993	Dr.133593	atp2b1b	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 1b	2,187
BG303549	Dr.77009	LOC792230	Hypothetical LOC792230	2,186
Bl533153	Dr.76395	zgc:110340	Zgc:110340	2,186
BC081396	Dr.80825	ms4a17a.5	Zgc:101739	2,180
AW076959	Dr.143616	tpi1b	Triosephosphate isomerase 1b	2,178
AW305605	Dr.116682	vamp2	Vesicle-associated membrane protein 2	2,167
AW203115	Dr.106912	zgc:85981	carboxypeptidase E Transcribed locus, strongly similar to NP_001026165.1 engulfment and cell motility 1 [G. e.]	2,164
Al816701	Dr.78038			2,164
AA658733	Dr.76003		Transcribed locus	2,156
AW232005	Data Not Found			2,155
Bl879770	Dr.119174	syt5	synaptotagmin V	2,144
Bl982778	Dr.107033	zgc:153426	Zgc:153426	2,142
Bl879014	Dr.18438	si:ch211-81a5.8	Si:ch211-81a5.8	2,126
Al353464	Data Not Found			2,126
BC081377	Dr.90410	zgc:101529	Zgc:101529	2,122
BM024812	Dr.84611	camk2d2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta 2	2,121
CV482579	Dr.6070	zgc:153345	Zgc:153345	2,119
AW282014	Dr.80263	stxbp1	Syntaxin binding protein 1	2,115
BC080258	Dr.82000	sag	-antigen; retina and pineal gland (arrestin)	2,111
BG308797	Data Not Found			2,111
Bl705532	Dr.123377	ift122	intraflagellar transport 122 homolog (Chlamydomonas)	2,106
AL727928	Dr.77793	kifap3	Kinesin-associated protein 3	2,105
Al330530	Dr.36926	samsn1a	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	2,100
AW454617	Dr.78413	oaz1	ornithine decarboxylase antizyme 1 glycoprotein M6Aa	2,094
BG738534	Dr.28459	gpm6aa		2,089
BM034968	Dr.14884		Transcribed locus	2,086
Bl880109	Dr.133240		Transcribed locus	2,083
Bl430145	Dr.133516		Transcribed locus	2,075
Al883366	Dr.79238		Transcribed locus	2,075
AW510119	Dr.89515	fev	Similar to FEV protein	2,074
AW153860	Dr.4520	ndrg4	NdrG4	2,056
BG305718	Dr.96738	sh3gl2	SH3-domain GRB2-like 2	2,055
BM035286	Dr.122836		Transcribed locus	2,046
AF210636	Dr.370	atp6v1g1	ATPase, H+ transporting, V1 subunit G isoform 1	2,036
BM005415	Dr.29006	gng3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	2,035
AW826726	Dr.28183	slc1a2	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2	2,027
AL727309	Dr.121651		Transcribed locus	2,019
Al957800	Dr.35714	si:ch211-201b11	Si:ch211-201b11.2	2,018
Al721920	Dr.12599		Transcribed locus	2,017
BG306043	Dr.81977	slc25a3l	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; phosphate carrier), member 3, like	2,015
Bl879731	Dr.120152	rlbp1a	Hypothetical protein LOC792180	2,014
AA658587	Dr.75970		Transcribed locus, moderately similar to XP_499363.2 PREDICTED: hypothetical protein [Homo sapiens]	2,008
BM026481	Dr.133765		Transcribed locus	2,005
Bl429322	Dr.83547	amph	Amphiphysin	2,004
BM025986	Dr.81108		Transcribed locus	1,996
BC092767	Dr.42935	zgc:110164	Zgc:110164	1,993
Bl983233	Dr.77332	atp6v0d1	ATPase, H+ transporting, VO subunit D isoform 1	1,992
Bl983039	Dr.132610		Transcribed locus	1,992
BC076127	Dr.32120	gnb3l	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3, like	1,990
AF025348	Dr.558	vsx1	Visual system homeobox 1 homolog, chx10-like	1,988

BI865609	Dr.77891	atp1b2a	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2a polypeptide	1,983
CN509347	Dr.114547	zgc:103625	Zgc:103625	1,981
AY050505	Dr.86944	gc3	Guanylyl cyclase 3	1,974
BM571795	Dr.16003		Transcribed locus	1,973
AW233556	Dr.107018	zgc:112214	Zgc:112214	1,971
BI879860	Dr.122623	fez1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	1,971
AW232264	Dr.140635	sncb	synuclein beta	1,967
AF229154	Dr.132345	syntaxin1b	Syntaxin1b	1,960
BM034958	Dr.14881	si:ch211-103f16	. Hypothetical protein LOC792830	1,957
AW826477	Dr.9860	mdh1b	Malate dehydrogenase 1b, NAD (soluble)	1,956
BM156974	Dr.75376	zgc:55580	Zgc:55580	1,950
BG305581	Dr.81046	syt1	Synaptotagmin I	1,945
BI888158	Data Not Found			1,944
BG307251	Dr.80286	atp6v1e1	ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit E isoform 1	1,940
CK707079	Dr.90935		Transcribed locus	1,939
BI846960	Dr.143409	rorab	RAR-related orphan receptor A, paralog b	1,938
BI880418	Data Not Found			1,936
AF448140	Dr.77311	rbp2a	Retinol binding protein 2a, cellular	1,934
AI522680	Dr.40978	zgc:153943	Zgc:153943	1,928
BI876291	Dr.143409	rorab	RAR-related orphan receptor A, paralog b	1,926
AF286376	Dr.77891	atp1b2a	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2a polypeptide	1,918
BI428494	Dr.78284	zgc:109987	Zgc:109987	1,913
BF938389	Dr.4520	ndrg4	Ndr4	1,912
BM102022	Data Not Found			1,910
BM024808	Dr.77258	ywhag2	3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, gamma polypeptide 2	1,905
BC096789	Dr.83836	zgc:109965	Zgc:109965	1,904
BC095086	Dr.82810	zgc:109962	Zgc:109962	1,894
BC075980	Dr.83119	rab3a	RAB3A, member RAS oncogene family	1,894
BI670844	Dr.83340	als2cr4	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 4	1,893
BI703348	Dr.107704		Transcribed locus	1,892
BM182782	Dr.6819	pgam1b	phosphoglycerate mutase 1b Similar to Ndufa9 protein	1,888
AI965290	Dr.1884	LOC100149467		1,885
AI883908	Dr.79392		Transcribed locus	1,884
BI473199	Dr.81961	atp2b3a	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3a	1,882
BM070575	Dr.82862	dpysl5b	Dihydropyrimidinase-like 5b	1,882
BM024328	Dr.75943	tspan7b	Tetraspanin 7b	1,880
AI964178	Dr.79274	zgc:55936	Zgc:55936	1,877
AF281076	Dr.82591	fezf2	FEZ family zinc finger 2	1,877
BI886791	Dr.79127	stm	Starmaker	1,872
AW116414	Dr.23391	slc16a3	Hypothetical LOC554697	1,870
BC095113	Dr.90384	irx6a	Iroquois homeobox protein 6a	1,867
AB017117	Dr.74875	oaz1	Ornithine decarboxylase antizyme 1	1,867
AI477433	Dr.28550	ptp4a1	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 1	1,866
BI882489	Dr.83539	sb:cb734	Hypothetical protein LOC100004135	1,865
BG738618	Dr.83354	glrbb	Glycine receptor, beta b	1,862
AI722380	Dr.105883	DKEY-234B16.1	Novel protein similar to mouse and human junctophilin (JPH3)	1,861
BQ092505	Dr.83625		Transcribed locus	1,859
BM184075	Dr.81634	osbpl7	Oxysterol binding protein-like 7	1,858
AW344174	Dr.122387		Transcribed locus	1,857
AW826304	Dr.81936		Transcribed locus	1,857
AW282069	Dr.81135	rnasekb	ribonuclease, RNase K b	1,857
BC059690	Dr.76468	id2b	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein, b	1,854
AB032725	Dr.8323	tnrc4	Trinucleotide repeat containing 4	1,852
BC090787	Dr.79070	fit1	Fat-inducing transcript 1	1,850
BI867375	Data Not Found			1,849
AI959658	Dr.22083		Transcribed locus	1,848
BI845731	Dr.133430		Transcribed locus	1,847
BI884339	Data Not Found			1,846
BG308789	Dr.82804		Transcribed locus	1,845
BG306318	Dr.5384	hexa	Novel protein similar to vertebrate hexosaminidase A (alpha polypeptide) (HEXA)	1,843
BI865434	Dr.13499	osr1	Odd-skipped related 1 (Drosophila)	1,840
CD606283	Data Not Found			1,838
AA542593	Dr.75525		Transcribed locus	1,838
CD283557	Dr.108907		Transcribed locus	1,838
AF364083	Dr.29006	gng3	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 3	1,838
BM024131	Data Not Found			1,835
BG306499	Dr.11184	hpca	Zgc:73126	1,832
AI723179	Dr.105911		Transcribed locus	1,830
AF001909	Dr.540	rx3	Retinal homeobox gene 3	1,830
AW279903	Dr.22751		Transcribed locus	1,828
D21135	Dr.75106	isl1	Islet1	1,823
BI880201	Dr.83847	ppp2r2b	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), beta isoform	1,823
BI670912	Dr.132819	calm1b	Calmodulin 1b	1,823
AW419493	Dr.81500		Transcribed locus	1,819
BG308757	Data Not Found			1,816
BI325696	Dr.83614		Transcribed locus	1,814
BI326336	Dr.78038	elmo1	Engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, C. elegans)	1,814
BI430204	Dr.85351	zgc:162186	Zgc:162186	1,813
BM857906	Dr.80519	LOC100007974	Similar to hCG1773661	1,811

AW019834	Dr.80071		Transcribed locus	1,811
BI840793	Dr.66020	cmas	Zgc:158506	1,811
AW281693	Dr.81206		Transcribed locus	1,808
BI885786	Dr.75462	atp6v1ba	ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit B, member a	1,808
AW115688	Dr.105194		Transcribed locus	1,808
BM186665	Dr.6173	zgc:65894	Zgc:65894	1,806
AY147850	Dr.29398	zgc:162551	Zgc:162551	1,806
BI889621	Dr.76671	hmg3a	High-mobility group box 3a	1,806
BC077108	Dr.86667	zgc:100920	Zgc:100920	1,805
BI841137	Dr.119602	scg5	secretogranin V	1,804
AI931116	Dr.119518	zgc:172238	Zgc:172238	1,803
BM183338	Dr.122845	atp1a3a	ATPase, Na+/K+ transporting, alpha 3a polypeptide	1,802
BG305103	Dr.78131	lin7a	Lin-7 homolog A (C. elegans)	1,801
AI626425	Dr.105582	zgc:73264	Hypothetical LOC554684	1,800
NM_152974	Dr.18293	mab211	Mab-21-like 1	1,798
BI981135	Dr.78922	lmo4l	LIM domain only 4, like	1,798
AW115576	Dr.75136	acvr2b	Activin receptor IIb	1,798
AL590146	Data Not Found		Engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, C. elegans)	1,797
BE017594	Data Not Found		Engulfment and cell motility 1 (ced-12 homolog, C. elegans)	1,789
BC065689	Dr.86665	zgc:77245	Zgc:77245	1,788
BI896246	Dr.76793	gpx4a	Glutathione peroxidase 4a	1,788
BM081047	Dr.76429	zgc:136591	Zgc:136591	1,784
BG737561	Dr.76864	zgc:65827	Wu:fb52e12	1,783
BC076171	Dr.82744	zgc:92689	Zgc:92689	1,782
BI429351	Dr.122316		Transcribed locus, moderately similar to NP_033171.2 neuroplastin [Mus musculus]	1,781
AW280178	Dr.48127		Transcribed locus	1,781
AW778718	Data Not Found			1,781
BI896260	Dr.118021	tdo2a	tryptophan 2,3-dioxygenase a	1,780
AI957866	Dr.79577		Transcribed locus	1,780
BQ092287	Dr.123921		Transcribed locus	1,778
AW233763	Dr.120094	atp6ap2	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 2	1,774
BI983119	Dr.103979	im:7159195	Im:7159195	1,774
BI880135	Dr.65703		Transcribed locus	1,773
AW420843	Dr.79148	LOC565706	Similar to cyclic AMP specific phosphodiesterase	1,771
BG304092	Dr.132977		Transcribed locus	1,770
AI957749	Data Not Found			1,770
BG305324	Dr.82846	LOC569164	Similar to protein tyrosine phosphatase e	1,768
BI670964	Dr.14325	crx	Cone-rod homeobox	1,721
AF163310	Dr.8131	kal1a	Kallmann syndrome 1a sequence	1,720
AI667530	Dr.78662	zgc:64141	Zgc:64141	1,719
AI626609	Dr.1692	zbtb2b	Zinc finger and BTB domain containing 2b	1,717
AW466674	Dr.81660	zgc:112043	Zgc:112043	1,716
AW115594	Dr.77112	uap1	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	1,714
BG306150	Dr.28459	gpm6aa	glycoprotein M6Aa	1,712
AI878744	Dr.79259		Transcribed locus	1,711
AW116717	Dr.7839		Transcribed locus	1,711
BE015668	Dr.7375	si:ch211-281124.	Wu:fj19b07	1,710
AF373976	Dr.12400	atp1b2b	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 2b polypeptide	1,708
AI884052	Dr.30822	apl1	Apelin	1,707
AW510196	Data Not Found			1,703
BI429158	Dr.84611	camk2d2	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II delta 2	1,702
BI846526	Dr.14198	zgc:101840	Zgc:101840	1,701
AW826487	Dr.81683	rbpms2	RNA binding protein with multiple splicing 2	1,698
AW281874	Dr.90586		Transcribed locus	1,698
BQ618114	Dr.120183	LOC100006295	Hypothetical protein LOC100006295	1,698
AI444432	Dr.28505	gpm6ba	Zgc:136505	1,697
BI982810	Dr.78506	LOC100000814	Hypothetical protein LOC100000814	1,696
AL714297	Dr.76671	hmg3a	High-mobility group box 3a	1,695
AF342739	Dr.1599	bbs2	Bardet-Biedl syndrome 2	1,695
CN505126	Dr.119793	rbp4l	Retinol binding protein 4, like	1,694
BI428507	Dr.105609	stmn1b	stathmin 1b	1,694
BI563084	Dr.81071	zgc:103663	Zgc:103663	1,692
BI880674	Dr.81060	zgc:73056	Zgc:73056	1,691
CN319436	Dr.80359	zgc:112287	Hypothetical protein LOC792760	1,690
BG308485	Dr.122673		Transcribed locus	1,688
BI475857	Dr.80289		Transcribed locus	1,686
BG305568	Data Not Found			1,686
AF017266	Dr.81985	gad1	Glutamate decarboxylase 1	1,686
BG305609	Dr.82861		Transcribed locus	1,684
BC083255	Dr.85547	syng1	Synaptogyrin 1	1,683
AI723175	Dr.105910		Transcribed locus	1,681
BC049529	Dr.75625	ckbb	Creatine kinase, brain	1,680
AW116393	Dr.132732		Transcribed locus	1,680
BC075931	Dr.85772	zgc:92198	Zgc:92198	1,679
BI891338	Dr.84284	LOC572016	Hypothetical LOC572016	1,675
BI842488		LOC100149320	Similar to Triple functional domain protein	1,675
BI880231	Data Not Found			1,675
AW280656	Dr.22709		Transcribed locus	1,674

BG727080	Dr.83051	cacnb2b	Si:dkey-32m20.2	1,674
AW826496	Dr.28085		Transcribed locus, moderately similar to NP_001103213.1 hypothetical protein LOC639628 [Mus musculus]	1,673
BC095036	Dr.26640	cyp46a1	Cytochrome P450, family 46, subfamily A, polypeptide 1	1,673
BI896532	Dr.11244	gpia	Glucose phosphate isomerase a	1,672
AW280290	Dr.24246	h1fx	H1 histone family, member X	1,671
BI880684	Dr.79356	rcan3	Regulator of calcineurin family member 3	1,671
AW281636	Dr.132613	LOC567576	Similar to spectrin repeat containing, nuclear envelope 1	1,670
BG303480	Dr.79940	laptm4b	Lysosomal associated protein transmembrane 4 beta	1,669
BG306387	Dr.133079	a2bp1	Ataxin 2-binding protein 1	1,666
CN505466	Dr.90421	fabp11b	Fatty acid binding protein 11b	1,665
AF389401	Dr.132647	appa	Amyloid beta (A4) precursor protein a	1,665
CD604927	Dr.25884		Transcribed locus	1,664
AI957401	Dr.140601		Transcribed locus	1,663
BI865784	Dr.133365		Transcribed locus	1,662
AI545014	Dr.77326		Transcribed locus	1,661
AW419516	Dr.122433		Transcribed locus	1,659
AW420994	Dr.81591		Transcribed locus	1,659
BI879847	Data Not Found			1,658
CD606299	Dr.124784		Transcribed locus	1,658
NM_194376	Dr.105146	ptmaa	Prothymosin, alpha a	1,657
BC095356	Dr.38262	zgc:110662	Zgc:110662	1,656
BI839927	Dr.28459	gpm6aa	glycoprotein M6Aa	1,655
AI496880	Dr.77136	selt1a	Selenoprotein T, 1a	1,653
BI883930	Dr.13149	zgc:110326	Zgc:110326	1,651
BI428480	Dr.78528	zgc:73223	Hypothetical LOC554955	1,651
CK702848	Data Not Found			1,651
BI840896	Dr.84568	bhlhe22	basic helix-loop-helix family, member e22	1,650
AI584367	Dr.74178	golgb1	Golgi autoantigen, golgin subfamily b, macrogolgin (with transmembrane signal), 1	1,649
BI706369	Dr.4520	ndrg4	Ndr4	1,647
CD283473	Dr.134408		Transcribed locus	1,645
AI544549	Dr.17665	LOC560275	Similar to SNF1/AMP-activated protein kinase	1,643
BI896327	Dr.4724	eno1	Enolase 1, (alpha)	1,642
BI473245	Dr.84561	LOC100006857	Hypothetical protein LOC100006857	1,642
BI706776	Dr.83355		Transcribed locus	1,642
AI641220	Data Not Found			1,641
AF375872	Dr.10232	meis2.2	Myeloid ecotropic viral integration site 2.2	1,641
BG729079	Data Not Found			1,641
AW826383	Dr.105651	si:ch211-210h11	Si:ch211-210h11.4	1,641
BG884401	Dr.108339	jmjd3	Jumonji domain containing 3, histone lysine demethylase	1,640
AW018731	Dr.28593	rbp1a	Retinol binding protein 1a, cellular	1,640
BM316751	Data Not Found			1,640
BC076497	Dr.76055	pkm2b	Pyruvate kinase, muscle, b	1,639
AW279882	Dr.81075	at1l	atlastin GTPase 1	1,639
AI722745	Dr.8506	tfap2a	Transcription factor AP-2 alpha	1,637
BC093257	Dr.43014	grk1b	G protein-coupled receptor kinase 1 b	1,636
BI880025	Dr.81974		Transcribed locus	1,635
BF157011	Dr.81071	zgc:103663	Zgc:103663	1,635
BI865799	Dr.133366	LOC100150746	Similar to hCG2045189	1,634
AW281964	Dr.81238		Transcribed locus	1,633
BG305579	Dr.82794	arl3l1	ADP-ribosylation factor-like 3, like 1	1,633
AW420396	Dr.79044		Transcribed locus	1,633
BI879949	Dr.25212		Transcribed locus	1,632
AW231974	Dr.37784	ift80	Intraflagellar transport 80 homolog (Chlamydomonas)	1,632
AF337035	Dr.83334	robo2	Roundabout homolog 2	1,631
AW279838	Data Not Found			1,631
U89710	Dr.75101	gefilitin	Gefilitin	1,630
CD606048	Dr.75112	eef2l	Eukaryotic translation elongation factor 2, like	1,630
AW116281	Dr.78480	nat10	N-acetyltransferase 10	1,629
AF036148	Dr.75801	neurod	Neurogenic differentiation	1,629
BC065863	Dr.29773	rlbp1b	Retinaldehyde binding protein 1	1,628
BI670985	Dr.83345		Transcribed locus	1,627
BI880064	Dr.122614		Transcribed locus, strongly similar to NP_058706.1 glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate 1	1,627
BI840999	Dr.76585	sox4a	SRY (sex determining region Y)-box 4a	1,626
BC066528	Data Not Found			1,626
AI816663	Dr.84225	zgc:158242	Zgc:158242	1,626
AW233664	Dr.107025	LOC558153	Hypothetical LOC558153	1,624
AW305488	Dr.81448	pvalb6	Parvalbumin 6	1,623
BI840985	Dr.83313		Transcribed locus	1,623
AW076996	Data Not Found			1,622
BI887500	Dr.79522	rogdi	Rogdi homolog (Drosophila)	1,622
AI544644	Dr.131410		Transcribed locus	1,621
BM072355	Dr.106453	nxph1	Neurexophilin 1	1,620
AW281293	Dr.28459	gpm6aa	glycoprotein M6Aa	1,618
BI430334	Dr.11214	gnao1	Guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha activating activity polypeptide O	1,618
AW281618	Dr.132849		Transcribed locus	1,616
BG306141	Dr.11225		Transcribed locus	1,616
BG308431	Dr.143244	nr1d2b	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 2b	1,614
AI667325	Dr.132452		Transcribed locus, strongly similar to XP_001342810.1 PREDICTED: similar to Mid1ip1 protein [Danio rerio]	1,613

BM095205	Dr.81532		Transcribed locus	1,613
BM103959	Dr.79687	zgc:112178	Zgc:112178	1,612
AI723196	Data Not Found			1,609
BM025117	Dr.81158		Transcribed locus	1,609
BI866918	Dr.133374		Transcribed locus	1,609
BM102028	Dr.133200	LOC560944	Similar to phosphofructokinase, platelet	1,609
AI793839	Dr.8506	tfap2a	Transcription factor AP-2 alpha	1,608
BC053118	Dr.85919	rnf11	Ring finger protein 11	1,608
BI891882	Dr.79861	pkm2a	Pyruvate kinase, muscle, a	1,607
AY008836	Dr.104705	mdkb	Midkine-related growth factor b	1,606
AW567243	Data Not Found			1,605
BM859745	Data Not Found			1,605
AF525745	Dr.133590	gria3a	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3a	1,604
CD605841	Dr.124769		Transcribed locus	1,603
AF184245	Dr.77269	hug	HuG	1,603
AI959690	Dr.106389	atp6v1c1	ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit C, isoform 1	1,602
BC085418	Dr.91611	si:busm1-194e12	Hypothetical protein LOC791727	1,602
BI706936	Dr.33131	ywhah	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	1,601
BE202058	Dr.80254	LOC559017	Similar to Rho guanine nucleotide exchange factor 4	1,601
BF937564	Dr.82660	zgc:85969	Zgc:85969	1,599
AW076507	Dr.80205	zgc:158640	Zgc:158640	1,599
AI793437	Dr.76444	wu:fc67d01	Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 2	1,598
BI888679	Dr.107017	sept5a	Septin 5a	1,597
AW171154	Dr.20697		Transcribed locus	1,597
BC097151	Dr.87441	rdh5	Retinol dehydrogenase 5 (11-cis/9-cis)	1,597
AW077477	Dr.38224		Transcribed locus	1,595
BI891681	Dr.1068	ywhaqb	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide b	1,594
BC056326	Dr.26981	pou4f1	POU domain, class 4, transcription factor 1	1,593
AI588308	Dr.77768		Transcribed locus	1,593
AY576957	Dr.52488	pcdh1gb2	Protocadherin 1 gamma b2	1,592
AI330452	Dr.104580	zgc:175106	Zgc:175106	1,591
BG307645	Dr.114579	rdh8	Retinol dehydrogenase 8	1,590
AW420900	Dr.76504	zgc:113338	Zgc:113338	1,589
AI721522	Dr.8674		Transcribed locus	1,588
AY576961	Dr.116658	pcdh1gb2	Protocadherin 1 gamma b2	1,587
BG307786	Dr.92800	LOC797619	Similar to Zinc finger protein 533	1,587
BM185116	Dr.77191	tuba2	Tubulin, alpha 2	1,586
BF717713	Dr.32819	id2a	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein, a	1,584
BG305033	Dr.75597	silvb	Silver homolog (mouse) b	1,584
BC092877	Dr.134210	adss	Adenylosuccinate synthase	1,584
BC076354	Dr.87817	dnajc5aa	Dnaj (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5aa	1,584
AI641192	Dr.136758		Transcribed locus	1,583
BC076342	Dr.116045	atp2b3a	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3a	1,583
BI842337	Dr.42009		Transcribed locus	1,583
NM_212854	Dr.85297	rnd1	Ras-like protein Rnd1b	1,581
AW342634	Dr.105663	atp6v1a1	ATPase, H+ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A, like	1,581
BM185901	Dr.119943	zgc:73142	Zgc:73142	1,581
AW282035	Dr.75221		Transcribed locus	1,580
AY850386	Dr.93053	guca1g	Guanylate cyclase activator 1g	1,580
U16310	Dr.48765	msxa	Muscle segment homeobox A	1,580
BG307552	Dr.81071	zgc:103663	Zgc:103663	1,578
BG305931	Data Not Found			1,577
CD605610	Dr.52291		Transcribed locus	1,575
BG305686	Dr.75761	rx1	Retinal homeobox gene 1	1,575
BI896442	Dr.2432	cs	Citrate synthase	1,575
BI705585	Dr.105042	got2a	glutamic-oxaloacetic transaminase 2a, mitochondrial (aspartate aminotransferase 2)	1,575
AF387819	Dr.143616	tpi1b	Triosephosphate isomerase 1b	1,574
BI671368	Dr.107707		Transcribed locus	1,574
AW281850	Dr.114378	zgc:77462	Zgc:77462	1,574
BG892390	Dr.123421		Transcribed locus, weakly similar to XP_685230.1 PREDICTED: hypothetical protein [Danio rerio]	1,574
AW116670	Dr.16422	diras1	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1	1,574
AW154758	Dr.12800	ptplb	Protein tyrosine phosphatase-like (proline instead of catalytic arginine), member b	1,574
AA658739	Dr.76004	psmb9a	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 9a	1,573
AW170921	Dr.80664	zgc:77057	Zgc:77057	1,571
AW826605	Dr.77286	zgc:123214	Zgc:123214	1,571
AA605655	Dr.673	rtn1b	Reticulon 1b	1,570
AI588163	Dr.104946	wu:fb09b10		1,569
AF387341	Dr.82922	unc119.2	Unc-119 homolog 2	1,568
BG308582	Dr.80309	bcat1	Branched chain aminotransferase 1, cytosolic	1,568
BI983171	Dr.108356	LOC100149316	Similar to L-lactate dehydrogenase B chain (LDH-B) (LDH heart subunit) (LDH-H) (Renal carcinoma antigen N	1,567
BG308888	Dr.133100		Transcribed locus	1,567
BQ074581	Dr.86461		Transcribed locus	1,566
AI641222	Data Not Found			1,566
BC052116	Dr.53665	clstn1	Calsyntenin 1	1,565
AI384393	Dr.75236		Transcribed locus	1,565
BI671046	Dr.82855	six6b	SIX homeobox 6	1,565
BM103901	Dr.82431	mocs3	Zgc:55696	1,564
BI351006	Dr.84995		Transcribed locus	1,564

BG305829	Dr.82782		Transcribed locus	1,562
AI667618	Dr.26330	gnb1l	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1, like	1,561
AI816612	Dr.79148	LOC565706	Similar to cyclic AMP specific phosphodiesterase	1,560
CK702677	Data Not Found			1,560
BG305775	Dr.77290		Transcribed locus	1,556
AY576959	Dr.93252	pcdh1gb2	Protocadherin 1 gamma b2	1,556
BF938407	Dr.14325	crx	Cone-rod homeobox	1,555
AF293369	Dr.96696	atp1b3b	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 3b polypeptide	1,555
BG306450	Data Not Found			1,554
CD606128	Dr.75112	eef2l	Eukaryotic translation elongation factor 2, like	1,553
AF164441	Data Not Found			1,552
AI974171	Data Not Found			1,551
CD606558	Data Not Found			1,551
AW184676	Dr.78294		Transcribed locus	1,550
BC068374	Dr.107591	ttyh2l	Zgc:85736	1,550
AW777762	Dr.81020		Transcribed locus	1,549
AI545909	Dr.75594	LOC564337	Similar to calcineurin B	1,547
AW059245	Dr.103751	arrdc3	arrestin domain containing 3	1,546
BI886121	Dr.132718	snx9l	Sorting nexin 9-like	1,546
BF938356	Dr.133056	arl13a	ADP-ribosylation factor-like 13A	1,544
BI878656	Dr.122889		Transcribed locus	1,544
BF938781	Dr.105209	ogt	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase (UDP-N-acetylglucosamine:polypeptide-N-acetylglucosam	1,544
BE200753	Data Not Found			1,542
AI330527	Data Not Found			1,542
AI601297	Dr.132377		Transcribed locus	1,542
BI865459	Dr.74540	si:ch211-133n4.4	Zgc:153988	1,542
BI877909	Dr.99009	LOC555713	Hypothetical LOC555713	1,542
BI880784	Dr.117640	LOC562002	Similar to testican 3	1,541
BI890954	Dr.112766	LOC566443	Hypothetical LOC566443	1,541
BG883649	Dr.133393	daam1	Dishevelled associated activator of morphogenesis 1	1,541
AI544746	Dr.24158	srgn	serglycin	1,540
BG306190	Dr.82917		Transcribed locus	1,539
BI430050	Dr.75236		Protocadherin 2 gamma 29	1,539
AI959722	Dr.75579		Transcribed locus, strongly similar to NP_034110.1 C-terminal binding protein 2 [Mus musculus]	1,538
AI331854	Dr.76014	calm2b	Calmodulin 2b, (phosphorylase kinase, delta)	1,537
AI964264	Dr.75931	ckmt1	Creatine kinase, mitochondrial 1	1,536
BI671185	Dr.116121	ahcyl1	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	1,536
AI884039	Dr.35736		Transcribed locus	1,535
BI879966	Dr.370	atp6v1g1	ATPase, H+ transporting, V1 subunit G isoform 1	1,534
BI325077	Dr.105933		Transcribed locus	1,534
AI331352	Data Not Found			1,534
BC076532	Dr.120392	ada	Hypothetical protein LOC792200	1,533
BG303501	Dr.122602		Transcribed locus	1,533
BG307975	Dr.17800	zgc:77326	Transcribed locus, strongly similar to NP_991268.1 hypothetical protein LOC403006 [Danio rerio]	1,532
AW202989	Dr.114917		Hypothetical protein LOC100003996	1,531
BC065621	Dr.88453	zgc:77182	Zgc:77182	1,531
AI384352	Data Not Found			1,531
AF359242	Dr.75365	cited3	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 3	1,529
AI584390	Dr.2533		Transcribed locus	1,529
AF375226	Dr.12618	efnb2b	Ephrin B2b	1,529
CN020535	Dr.76432	zgc:86706	Zgc:86706	1,528
BG308899	Dr.82839		Transcribed locus	1,528
CD606168	Dr.75112	eef2l	Eukaryotic translation elongation factor 2, like	1,527
BM859827	Dr.133812		Transcribed locus	1,526
BC095116	Dr.81045	lin7b	Lin-7 homolog B (C. elegans)	1,525
AI522769	Dr.77214	tjp2b	Tight junction protein 2b (zona occludens 2)	1,524
BM101515	Dr.79191	zgc:85857	Zgc:85857	1,524
AF091593	Dr.79639	snap25a	Synapsome-associated protein 25a	1,523
AW282112	Dr.95079	tmem59l	Transmembrane protein 59-like	1,523
BI673864	Data Not Found			1,523
AB180939	Dr.92813	kcnj11l	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 11, like	1,522
BM154034	Dr.76034	mb	Myoglobin	1,521
AW280053	Dr.33791	oxct1a	3-oxoacid CoA transferase 1a	1,521
U43671	Dr.32598	tef	Thyrotroph embryonic factor	1,520
BG891867	Dr.140739	nr3c1	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)	1,520
AI884133	Dr.121995		Transcribed locus	1,520
BC092857	Dr.81097	zgc:110298	Zgc:110298	1,520
AW280152	Dr.116641	atp6v1b2	ATPase, H+ transporting, lysosomal V1 subunit	1,519
AI444469	Dr.26330		Transcribed locus	1,519
AI722358	Dr.78847	si:ch211-140f21	. Si:ch211-140f21.1	1,518
AL729856	Dr.5098	tmod2	tropomodulin 2	1,518
AW420563	Data Not Found			1,518
AF286375	Dr.76046	atp1b1a	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1a polypeptide	1,518
BM102195	Dr.133674	zgc:77409	Hypothetical protein LOC791928	1,518
BI865765	Dr.81051	cdipt	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase (phosphatidylinositol synthase)	1,516
BC078331	Dr.49097	zgc:113878	Zgc:113878	1,516
BI892074	Dr.75577	h3f3c	H3 histone, family 3C	1,516

BM156061	Dr.85104	zgc:109968	Zgc:109968	1,516
AW280647	Dr.67263		Transcribed locus, strongly similar to XP_690169.2 PREDICTED: similar to G protein-coupled receptor 75	1,515
BI325575	Dr.84763		Transcribed locus	1,514
AW019349	Dr.36780	acox1	Acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl	1,514
BI866244	Dr.84433		Transcribed locus	1,514
AF067201	Dr.4212	ldha	Lactate dehydrogenase A4	1,513
X63183	Dr.24244	pax6a	Paired box gene 6a	1,513
BI710031	Dr.113886	si:ch211-105d4.5	Hypothetical LOC567037	1,512
BI887067	Data Not Found			1,512
AL715360	Dr.75064	her3	Hairy-related 3	1,511
AI545079	Dr.31085	tsg101	Tumor susceptibility gene 101	1,511
AW281926	Dr.7874		Transcribed locus	1,510
AA494583	Dr.75157	myl9	Myosin, light polypeptide 9, regulatory	1,510
BM181742	Dr.122634		Transcribed locus	1,510
BI880303	Dr.122927	rufy3	RUN and FYVE domain containing 3	1,510
AF030281	Dr.75402	six3b	Sine oculis homeobox homolog 3b	1,509
AI943132	Dr.79499	stmn2a	stathmin-like 2a	1,506
AI588160	Dr.132308		Transcribed locus	1,506
BI891507	Dr.81528	zgc:77724	Zgc:77724	1,506
AW420722	Dr.9526	fam49b	Family with sequence similarity 49, member B	1,505
AY556397	Dr.118937	esrrg	Estrogen-related receptor gamma	1,505
BC096923	Dr.133459	zgc:113389	Similar to hCG1773661	1,505
AI497566	Dr.105098	zgc:109930	Zgc:109930 (highly similar to RGR)	1,504
AI878053	Dr.76947	rab2a	RAB2A, member RAS oncogene family	1,504
AY684930	Dr.82747	pcdh21	Protocadherin 21	1,503
BI840930	Dr.1866	ndfp1	Nedd4 family interacting protein 1	1,503
BM071894	Dr.14847	atp6v1c1l	ATPase, H+ transporting, lysosomal, V1 subunit C, isoform 1, like	1,503
BC081617	Dr.113699	zgc:92169	Zgc:92169	1,502
AI959567	Dr.33371	LOC569471	Similar to chromodomain helicase DNA-binding protein 7	1,502
BC055251	Dr.133710	msi2b	musashi homolog 2b	1,502
BQ617101	Dr.87033	si:dkey-222b8.4	Si:dkey-222b8.4	1,502
BI844046	Dr.141544	rh30	Rh30-like protein	1,501
BI671030	Dr.122611		Transcribed locus	1,501
BI476367	Dr.43918	si:ch211-63o20.5	Si:ch211-63o20.5	1,501
BM184863	Dr.123318	dlg1	discs, large (Drosophila) homolog 1	1,501
AW058837	Dr.29133	lrrn1	Leucine rich repeat neuronal 1	1,501
AI601696	Dr.76453	arl4d	ADP-ribosylation factor-like 4D	1,501
BI880094	Dr.76525	fkbp1b	FK506 binding protein 1b	1,500
AI331593	Data Not Found			1,500

10.3.2 Heraufregulierte Transkripte

Genbank Acc. #	Unigene ID	Gene Symbol	Unigene Description	Fold change
AI959372	Dr.76134	ccng1	Cyclin G1	4,498
AI943081	Dr.79489		Transcribed locus	4,411
U60804	Dr.75100	tp53	Tumor protein p53	4,136
BM155067	Dr.78145	zgc:136826	Zgc:136826	3,788
BI980843	Dr.77014	wu:fb51a10	Wu:fb51a10	3,320
BI878247	Dr.394	c13orf22l	c13orf22 homolog (H. sapiens), like	2,798
BI879454	Dr.106895	LOC799690	wu:fb63a09	2,659
AI384650	Data Not Found			2,392
AW128352	Dr.32734	ywhae1	Tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, epsilon polypeptide 1	2,384
BI888166	Dr.144136		Si:dkey-113g17.2	2,379
BC090478	Dr.24793	scfd2	Sec1 family domain containing 2	2,324
AW305388	Dr.10033	lsm7	LSM7 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	2,320
AW116127	Dr.132598	eftud2	Elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	2,298
BM037469	Dr.83576	snrpd3	Small nuclear ribonucleoprotein D3 polypeptide	2,286
BM182277	Dr.76397	mmp2	Matrix metalloproteinase 2	2,248
CK702997	Dr.19189		Transcribed locus	2,237
BI708483	Dr.123649		Transcribed locus, moderately similar to NP_035175.1 proliferating cell nuclear antigen [Mus musculus]	2,234
BM026429	Dr.114661	lsm8	LSM8 homolog, U6 small nuclear RNA associated	2,191
BM185145	Dr.76439	prpf31	PRP31 pre-mRNA processing factor 31 homolog (yeast)	2,178
BM101524	Dr.143248		Transcribed locus	2,149
BI533160	Dr.83589	zgc:103688	Zgc:103688	2,139
BM184694	Dr.117027	snrpe	Zgc:56682	2,136
BI886815	Dr.123044		Transcribed locus, moderately similar to NP_001076542.1 hypothetical protein LOC100034505 [Danio]	2,120
AW116703	Dr.80445	wu:fi18h02	Wu:fi18h02	2,081
BF156211	Dr.11446	acad11	Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11	2,065
BI897147		zgc:158463		2,060
BI475794	Dr.76122	snrpd1	Small nuclear ribonucleoprotein D1 polypeptide	2,055
AI353265	Dr.76483	LOC571762	Hypothetical LOC571762	2,042
AW077025	Dr.132697		Transcribed locus	2,016
BI891065	Dr.75518	ribp1b	Similar to LOC494737 protein	1,961
AW115859	Dr.80379	kiaa0947l	KIAA0947-like (H. sapiens)	1,959
AW165240	Dr.75242	prpf3	PRP3 pre-mRNA processing factor 3 homolog (yeast)	1,955

BI704395	Dr.32574	LOC799690	Similar to Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	1,935
AW232828	Data Not Found			1,925
AI958571	Dr.105901	wu:fi19h12	Family with sequence similarity 60, member A, like	1,913
AF259079	Dr.30320	snrpb	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptides B and B1	1,912
BG307513	Dr.81507	zgc:92153	Zgc:92153	1,903
AW115857	Dr.143610	wdr43	WD repeat domain 43, like	1,902
BE693172	Data Not Found			1,902
AI522767	Dr.21114		Transcribed locus	1,895
AI979356	Dr.32574	LOC799690	Similar to Activating signal cointegrator 1 complex subunit 3-like 1	1,894
BI846219	Data Not Found			1,879
BM082805	Dr.48536	zgc:158305	Zgc:158305	1,874
AA495158	Dr.75324	pola1	Polymerase (DNA directed), alpha 1	1,873
AW233714	Data Not Found			1,871
CD606702	Dr.124884		Transcribed locus	1,868
AI588280	Data Not Found			1,862
AI496849	Data Not Found			1,859
AI601325	Data Not Found			1,858
BI888138	Data Not Found			1,854
AI793703	Dr.121926		Transcribed locus	1,854
AW279975	Dr.81145	snn	Stannin	1,841
AI384701	Data Not Found			1,832
BI673846	Dr.83507	LOC565594	Similar to glycoprotein (predicted)	1,822
AA658775	Dr.76012	dsg2	Desmoglein 2	1,821
AI959704	Dr.75245		Transcribed locus	1,819
X87581	Dr.75056	ccnd1	Cyclin D1	1,810
AW510279	Dr.52445	zgc:123010	Hypothetical protein LOC553339	1,808
Z22762	Dr.483	foxa2	Forkhead box A2	1,804
BM005077	Dr.84644	tph2	Tryptophan hydroxylase 2 (tryptophan 5-monoxygenase)	1,800
BI704422	Dr.45839	prpf8	Pre-mRNA processing factor 8	1,800
BI847037	Dr.84701		Transcribed locus	1,799
BC066474	Dr.87083	zgc:65987	peroxisomal short-chain alcohol dehydrogenase	1,796
BI563303	Dr.14560		Transcribed locus	1,794
AW466783	Dr.75069	msxb	Muscle segment homeobox B	1,788
BM183873	Dr.32418	lamp2	Lysosomal membrane glycoprotein 2	1,778
AW777430	Dr.47436	mcm7	Hypothetical LOC554619	1,777
AI626438	Data Not Found			1,768
AI384875	Data Not Found			1,767
AI667106	Dr.105734	ak311	adenylate kinase 3-like 1	1,749
AW154380	Dr.106787	wu:fj46h08		1,747
AW165157	Dr.80636		Transcribed locus	1,746
AW232681	Dr.80867	atad4a	ATPase family, AAA domain containing 4a	1,743
AI721552	Dr.3052		Transcribed locus	1,738
AI884300	Data Not Found			1,730
AL591482	Data Not Found			1,729
U14587	Dr.314	ascl1a	Achaete-scute complex-like 1a (Drosophila)	1,729
AI332223	Dr.121617		Transcribed locus	1,724
AW232631	Dr.80848	zgc:100856	Zgc:100856	1,723
AI588400	Dr.75909	brd3a	Bromodomain containing 3	1,713
AW279686	Data Not Found			1,712
BI879868	Dr.6473		Transcribed locus	1,709
AW826593	Data Not Found			1,707
AF010255	Dr.75764	mdm2	Transformed 3T3 cell double minute 2 homolog (mouse)	1,702
X85735	Dr.132864	wt1a	Wilms tumor 1a	1,702
AW058748	Dr.132673		Transcribed locus	1,702
BI882240	Dr.12977		Transcribed locus, weakly similar to NP_958848.1 periphilin 1 isoform 4 [Homo sapiens]	1,697
AW116650	Dr.1505	sf3b4	Splicing factor 3b, subunit 4	1,696
BM080950	Dr.81719	lsm6	LSM6 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	1,694
BI887633	Dr.123054		Transcribed locus, strongly similar to XP_695384.2 PREDICTED: similar to spindle checkpoint protein Bu	1,693
AW115535	Dr.7242	si:dkey-46a10.	Wu:fd42g01	1,692
BI705180	Data Not Found			1,686
AL591401	Data Not Found			1,684
AW281716	Dr.46344	zgc:76977	Hypothetical protein LOC792029	1,680
BI888360	Dr.75056	ccnd1	Cyclin D1	1,679
AI793462	Data Not Found			1,677
AY424304	Dr.90074	lhb	Hypothetical protein LOC791865	1,675
CV490465	Dr.130105		Transcribed locus, strongly similar to XP_001923486.1 PREDICTED: similar to zinc finger protein 544 [D	1,674
AW116461	Dr.76208	sart1	Squamous cell carcinoma antigen recognised by T cells	1,670
CN018776	Dr.83374	lgals1l2	Lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)-like 2	1,664
AI721333	Dr.77619	ruvbl1	RuvB-like 1 (E. coli)	1,662
BG304082	Dr.80559	gclm	Glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	1,660
AI957652	Dr.78316	tsr1	TSR1, 20S rRNA accumulation, homolog (yeast)	1,659
AI667141	Dr.107394	zgc:158312	Im:7160827	1,658
BI885991	Dr.82712	srrm2	Serine/arginine repetitive matrix 2	1,653
AW165055	Dr.22483		Transcribed locus	1,652
AW422344	Dr.80707	rhd12	Hypothetical protein LOC792002	1,649
AY225416	Dr.21063	nkx3.2	NK3 homeobox 2	1,645
BI982968	Dr.140548		Transcribed locus, moderately similar to NP_059337.1 cytochrome c oxidase subunit III [Danio rerio]	1,645
BQ450370	Dr.133852		Transcribed locus	1,645
BI845843	Dr.14156		Transcribed locus	1,644

CB361437	Dr.29153	hbbe3	Hemoglobin beta embryonic-3	1,644
BE015672	Dr.135405	LOC10000200	7 Similar to ornithine decarboxylase antizyme 2	1,640
AI444455	Dr.76956	pnn	Pinin, desmosome associated protein	1,640
CD606330	Data Not Found			1,640
BG728523	Dr.83154		Transcribed locus	1,638
BC090267	Dr.88758	supt7l	suppressor of Ty 7 (<i>S. cerevisiae</i>)-like	1,637
BC092961	Dr.118073	ppp2ca	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform	1,636
BI673296	Dr.80630	zgc:73340	Zgc:73340	1,631
AW420265	Dr.125906		Transcribed locus	1,630
AF112374	Data Not Found			1,630
CK864671	Dr.75381	zgc:92739	Hypothetical protein LOC792080	1,628
AW420896	Dr.15605	LOC570167	Similar to KIAA1012 protein	1,628
BC056576	Dr.106528	carhsp1	Calcium regulated heat stable protein 1	1,627
X69088	Dr.75753	notch1a	Notch homolog 1a	1,626
AY007434	Dr.1831	lfng	Lunatic fringe homolog	1,624
BC078320	Dr.86122	zgc:100947	Zgc:100947	1,623
AI497573	Dr.113486	slc34a2a	Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2a	1,622
AI974151	Dr.36945	zgc:103421	Zgc:103421	1,622
BM025977	Dr.133758		Transcribed locus	1,617
BG728805	Dr.83181		Transcribed locus	1,617
AW232809	Data Not Found			1,617
AI884147	Dr.79420		Solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 2b	1,616
CK705185	Data Not Found			1,616
BG884613	Data Not Found			1,615
BI882209	Dr.119918	nsd1b	Nuclear receptor binding SET domain protein 1b	1,609
BE693140	Dr.122594		Transcribed locus	1,609
BI883971	Dr.83990		Transcribed locus	1,608
BI673487	Dr.76176	sf3b3	Splicing factor 3b, subunit 3	1,605
AI878433	Dr.121954		Transcribed locus	1,603
AW343858	Dr.107845	LOC795944	Similar to proteophosphoglycan 5	1,602
BI883935	Dr.31849	zgc:136380	Zgc:158165	1,602
BI845592	Dr.123215		Transcribed locus	1,602
BI476891	Dr.76397	mmp2	Matrix metalloproteinase 2	1,601
BG892031	Data Not Found			1,600
BG985441	Data Not Found			1,599
AW171499	Data Not Found			1,596
BI886268	Data Not Found			1,595
BC095833	Dr.86124	zgc:112491	Hypothetical protein LOC791613	1,595
BG891864	Dr.1128	cpn1	Carboxypeptidase N, polypeptide 1	1,594
AW510250	Dr.23092		Transcribed locus	1,594
AW777765	Dr.81892		Transcribed locus	1,593
AW058750	Dr.77625	zgc:92074	Zgc:92074	1,593
AI396956	Data Not Found			1,585
BI474953	Dr.85873	eya4	Eyes absent homolog 4 (<i>Drosophila</i>)	1,584
AY398375	Dr.32551	ccdc124	Coiled-coil domain containing 124	1,582
AI584441	Dr.77595		Transcribed locus	1,582
BM187252	Data Not Found			1,582
BE201733	Dr.82162	polr2e	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E	1,580
BI533952	Dr.17446	phf5a	Hypothetical LOC569801	1,576
AI641460	Dr.122410		Transcribed locus	1,575
BI705720	Dr.83285		Transcribed locus	1,574
AI641130	Data Not Found			1,573
AI331264	Data Not Found			1,573
BC083262	Dr.78025	nipa1	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1	1,572
BC078220	Dr.29919	mett10d	Methyltransferase 10 domain containing	1,571
BG304208	Dr.133114	LOC10000052	8 Hypothetical protein LOC100000528	1,569
BM184837	Dr.114009	zgc:153346		1,569
AI331605	Dr.75575	col1a2	Collagen, type I, alpha 2	1,567
BI533424	Dr.14578		Transcribed locus	1,567
BI890345	Data Not Found			1,561
AI601390	Dr.105262	wu:fc10f03		1,559
BI710022	Dr.109645	zgc:152986	Zgc:152986	1,559
BI888732	Dr.143379	zfx	zinc finger protein, X-linked	1,556
AI497232	Dr.75610	bhmt	Betaine-homocysteine methyltransferase	1,555
AI588403	Dr.75753	notch1a	Notch homolog 1a	1,554
AI496740	Data Not Found			1,554
AI723142	Dr.105907	neb	nebulin	1,549
BE605325	Dr.140690		Transcribed locus, weakly similar to XP_414935.1 PREDICTED: similar to Epithelial membrane protein 2	1,549
CN020745	Dr.113782	polr2d	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D	1,549
BC076042	Dr.106237	metap1	Methionyl aminopeptidase 1	1,548
AI721420	Data Not Found			1,547
AI957809	Data Not Found			1,546
BI983402	Data Not Found			1,545
AI641660	Dr.79080	LOC10014839	3 Tumor necrosis factor receptor superfamily member 14-like	1,544
AI584425	Data Not Found			1,544
BI886415	Data Not Found			1,543
BG728552	Dr.93140	lama5	laminin, alpha 5	1,543
AI601363	Data Not Found			1,543
CD606677	Dr.26104		Transcribed locus	1,543

AW165074	Dr.79035		Transcribed locus	1,542
AW154197	Dr.129656	dhx16	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 16	1,540
AI626802	Data Not Found			1,539
CK703237	Data Not Found			1,538
BI672057	Dr.81196	zgc:153787	Zgc:153787	1,537
BI840114	Dr.78919	zgc:171831	Zgc:171831	1,537
AW344260	Dr.77094	pola2	Polymerase (DNA directed), alpha 2	1,537
AW420381	Dr.81345	wu:ff80h05	Hypothetical protein LOC798299	1,537
AI882821	Dr.32699	zgc:158861	Wu:fd21f07	1,536
AW116947	Dr.9018	rab43	RAB43, member RAS oncogene family	1,536
BC056304	Dr.31936	dnase1l3	Wu:fb44e02	1,533
BI885994	Dr.77831	snrnp27	small nuclear ribonucleoprotein 27 (U4/U6.U5)	1,531
AI667367	Data Not Found			1,529
AI545423	Data Not Found			1,528
BM025911	Dr.118303	zgc:101797	Zgc:101797	1,528
AW232679	Data Not Found			1,528
BI845523	Data Not Found			1,527
AW171160	Dr.75367	Hmga1b	Hmga1b	1,527
BI865067	Dr.143414		Transcribed locus	1,526
BM187416	Data Not Found			1,525
BI877328	Dr.83502	zgc:56310	Zgc:56310	1,525
AW115942	Dr.132725	zp3.2	Zona pellucida glycoprotein 3.2	1,525
AI437490	Dr.132277		Transcribed locus	1,524
BC056702	Dr.83382	cyba	Cytochrome b-245, alpha polypeptide	1,524
AB075937	Dr.84574	pcdh2ab2	Hypothetical protein LOC791897	1,523
BG305705	Dr.82870		Transcribed locus	1,522
AI943029	Data Not Found			1,522
AW117144	Data Not Found			1,521
BI983522	Dr.79042	zgc:110443	Zgc:110443	1,521
BI981322	Dr.16746		Transcribed locus	1,519
CN510870	Dr.87346	zgc:92715	Zgc:92715	1,519
BC075926	Dr.90111	zgc:92192	Zgc:92192	1,518
U57975	Dr.75827	notch3	Notch homolog 3	1,516
CD283135	Dr.116143	rhoab	ras homolog gene family, member Ab	1,516
AW019628	Dr.80031		Transcribed locus	1,516
AI322210	Dr.1053	zgc:113191	Zgc:113191	1,515
BI671665	Dr.85988		Transcribed locus	1,515
AI959677	Data Not Found			1,515
BM186643	Dr.85055		Transcribed locus	1,514
AW116624	Data Not Found			1,512
AF030031	Dr.30326	dla	DeltaA	1,512
AW420397	Dr.122449	prcp	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	1,512
AW777545	Dr.27180		Transcribed locus	1,512
AI722548	Dr.122161	si:rp71-1g18.1		1,511
BI672246	Data Not Found			1,510
BI878354	Dr.122879		Transcribed locus	1,509
AF301264	Dr.78757	her9	Hairy-related 9	1,507
BM185821	Dr.85016		Transcribed locus	1,505
BI891618	Dr.123037		Transcribed locus	1,504
BI886358	Data Not Found			1,502
BG303651	Dr.81062	ppm1d	Protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	1,502
AI331251	Data Not Found			1,502

10.4 Das Tudor-Domänen Protein Tdrd3

Aufgrund seiner partiellen Homologie zum snRNP-Biogenesefaktor SMN wurde in der Arbeitsgruppe Fischer ein weiteres Tudor-Domänen identifiziert. Oliver Plöttner konnte in seiner Doktorarbeit zeigen, dass das als *Tudor domain containing 3* (Tdrd3) bezeichnete Protein nicht an der Biogenese des Spleißosoms beteiligt ist (Plöttner, 2002). Stattdessen konnte mit FMRP, dem Krankheitsgenprodukt des Fragilen X Syndroms (OMIM #300624; Verkerk et al., 1991), ein Interaktor identifiziert werden, der mit Ribosomen wechselwirkt und hierüber offenbar die Translation von mRNA reguliert (Laggerbauer et al., 2001). Die Charakterisierung von Tdrd3 hinsichtlich seiner zellulären Funktion und Lokalisation stellte einen weiteren Teil meiner Arbeit dar. Die Ergebnisse aus diesem Teilprojekt konnten 2008 publiziert werden.

Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP

Bastian Linder^{1,†}, Oliver Plöttner^{2,†,‡}, Matthias Kroiss¹, Enno Hartmann³,
 Bernhard Lagerbauer^{1,§}, Gunter Meister², Eva Keidel² and Utz Fischer^{1,*}

¹Department of Biochemistry, Theodor Boveri Institute, Am Hubland, D-97074 Würzburg, Germany, ²Max Planck Institute of Biochemistry, Am Klopferspitz 18, D-82152 Martinsried, Germany, and ³Institute for Biology University of Lübeck, Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck, Germany

Received April 16, 2008; Revised July 4, 2008; Accepted July 24, 2008

Tudor domains are widespread among proteins involved in RNA metabolism, but only in a few cases their cellular function has been analyzed in detail. Here, we report on the characterization of the ubiquitously expressed Tudor domain containing protein Tdrd3. Apart from its Tudor domain, we show that Tdrd3 possesses an oligosaccharide/nucleotide binding fold (OB-fold) and an ubiquitin associated domain capable of binding tetra-ubiquitin. A set of biochemical experiments revealed an interaction of Tdrd3 with FMRP, the product of the gene affected in Fragile X syndrome, and its autosomal homologs FXR1 and FXR2. FMRP has been implicated in the translational regulation of target mRNAs and shown to be a component of stress granules (SG). We demonstrate that overexpression of Tdrd3 in cells induces the formation of SGs and as a result leads to its co-localization with endogenous FMRP in these structures. Interestingly, the disease-associated FMRP missense mutation I304N identified in a Fragile X patient severely impairs the interaction with Tdrd3 in biochemical experiments. We propose a contribution of Tdrd3 to FMRP-mediated translational repression and suggest that the loss of the FMRP–Tdrd3 interaction caused by the I304N mutation might contribute to the pathogenesis of Fragile X syndrome.

INTRODUCTION

Tudor domains are discernable sequence motifs of about 60 amino acids in numerous proteins and adopt a β barrel-like tertiary structure (1). An emerging functional theme for proteins containing this domain is their involvement in various aspects of the metabolism of RNA (2). This connection is easily inferred in the case of many Tudor domain containing (Tdrd) proteins, as these possess additional conserved sequence motifs predicted to bind RNA, for example in the case of Tdrd2 that bears a hnRNP K homology (KH) domain (3) or Tdrd10 that is predicted to contain an RNA recognition motif. Some members of this protein family

contain domains in addition to the Tudor domain that do not directly point to an RNA related function, for example a myeloid–Nervy–DEAF-1 domain (MYND-domain; Tdrd1) (4) or a serine/threonine kinase domain (Tdrd8) (5). Again others like SMNrp/SPF30, which has experimentally been proven to function in pre-mRNA splicing (6), or the name-giving *Drosophila* Tudor-protein itself lack additional motifs. While the precise function of the latter protein and the identity of its interacting partners remain elusive, it has been shown to play a role in the organization of the pole plasm in oocytes and the nurse cell nuage (7). The oocyte pole plasm gives rise to the germ cell lineage and is characterized by a large abundance of ribonucleoprotein particles (RNPs) (8).

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +49 9318884029; Fax: +49 9318884028; Email: utz.fischer@biozentrum.uni-wuerzburg.de

[†]The authors wish it to be known that, in their opinion, the first two authors should be regarded as joint First Authors.

Sequence information has been submitted to GenBank with the accession number EU643838.

[‡]Present address: Roche Diagnostics GmbH, Nonnenwald 2, D-82377 Penzberg, Germany.

[§]Present address: TRION Pharma GmbH, Frankfurter Ring 193a, D-80807 München, Germany.



The Tudor domain containing protein studied thus far in most detail is the Survival Motor Neuron (SMN) protein. Reduced expression levels of this protein are the underlying cause for the neuronal disease spinal muscular atrophy (9). SMN is part of a macromolecular complex (termed SMN complex), which mediates assembly of Sm proteins onto U snRNA (10). During this essential step in the biogenesis of spliceosomal U snRNPs, the Tudor domain of SMN engages in important interactions, specifically in the binding of Sm proteins onto the SMN complex (1,11). Interestingly, this interaction appears to be stimulated by the modification of arginine residues within a subset of Sm proteins to symmetric di-methyl arginine (sDMA) (12,13). These observations along with structural studies have put forward the idea that Tudor domains are protein-protein interaction modules specifically designed to recognize sDMA-containing regions of proteins. In keeping with this notion, the Tudor domain of the splice factor SPF30/SMNrp and of the thus far uncharacterized Tdrd3 protein have been suggested to bind sDMA-containing sequences (14).

In the present study, we have performed experiments to gain insight into the cellular function of Tdrd3. This 83 kDa protein is unique in the Tdrd family, as it possesses an N-terminal oligosaccharide/nucleotide binding (OB) fold domain, a central ubiquitin binding associated (UBA) domain and a C-terminal Tudor domain. We find Tdrd3 to be expressed in a variety of tissues with a predominant cytosolic localization. The protein binds to tetraubiquitin by means of its UBA domain *in vitro*, suggesting a role for this protein in the proteolytic turnover of proteins mediated by the ubiquitin-proteasome system. Interestingly, a series of biochemical and genetic protein interaction studies suggest that the Tdrd3 protein associates with the Fragile X mental retardation protein (FMRP), and its autosomal homologs FXR1 and FXR2. Limiting amounts of functional FMRP cause Fragile X syndrome, the most common form of inherited mental retardation worldwide (MIM no. 300624) (15). Experimental evidence suggests that FMRP is engaged in post-transcriptional gene silencing events, in which mRNAs from actively translating polyribosomes are sequestered into translationally silent mRNPs. These mRNPs are generated as a consequence of various conditions of cellular stress, whereupon they accumulate in discrete cytoplasmic foci termed stress granules (SGs). Overexpression of Tdrd3 in HeLa cells results in the induction of such foci, where it co-localizes with endogenous FMRP. Strikingly, Tdrd3 interaction is abolished by the I304N missense mutation in FMRP associated with severe Fragile X syndrome. Taken together, our data reveal a novel FMRP-associated protein and suggest a role of Tdrd3 in FMRP-mediated translational repression.

RESULTS

Tdrd3 is a conserved protein with a unique domain composition

We initially identified Tdrd3 in the ENSEMBL database by homology searches using the Tudor domain of SMN. Homology was restricted to the Tudor domain, but N- and C-terminal sequences were highly divergent to SMN.

BLAST searches revealed a high degree of conservation in a wide range of species including insects, the nematode *C. elegans* and deuterostomians such as the sea urchin and vertebrates. No Tdrd3-ortholog was detected in fungi and only a distantly related ortholog was present in plants. Together with the absence from *S. cerevisiae* and *S. pombe*, these findings point towards a function of Tdrd3 that developed later in eukaryotic evolution. To functionally analyze Tdrd3, PCR was performed from a human brain cDNA library using primers derived from the annotated EST sequences. Subsequent 5'- and 3'-RACE resulted in a cDNA of 2578 nucleotides encoding an open reading frame of 744 amino acids. This is in contrast to the Tdrd3 entry in ENSEMBL, where an open reading frame of only 651 amino acids is predicted (ENSP00000196169). The difference most likely arises from different 5' and 3' splice sites for the first and second intron, respectively (data not shown), and results in the addition of 93 amino acids to the N-terminus of the protein. Importantly, this N-terminal sequence is annotated in Tdrd3 proteins from several other species such as rat, zebrafish or *Drosophila* (Fig. 1A, lower panel) and found in human EST databases (data not shown). The N-terminus of Tdrd3 shows homology to the OB-fold domain (16), a single-stranded nucleic acid binding domain (17). The structural hallmark of this motif is a β barrel consisting of five β sheets and an optional N-terminal α helix. Our full-length amino acid sequence is predicted to contain the complete five β -sheets typical of an OB-fold domain (Fig. 1A, lower panel). Homology searches identified in addition a UBA domain located in between the N-terminal OB-fold and the Tudor domain. The domain organization of Tdrd3 is depicted in Figure 1A.

Tdrd3 is a ubiquitously expressed protein with cytosolic localization

In a series of experiments, we analyzed the expression pattern of Tdrd3 among tissues and its intracellular localization. Northern blot analysis of eight different tissues revealed a single band at 2.9 kb which was detected in all tissues studied (Fig. 1B). The mRNA length corresponds to the size of the cloned cDNA with an additional poly(A) tail. Thus, Tdrd3 is expressed in a wide variety of tissues, which indicates a function common to a variety of cell types. To determine the sub-cellular localization of the protein in individual cells, a polyclonal antibody against human Tdrd3 was raised in rabbits, affinity purified and used for western blotting and indirect immunofluorescence experiments. In western blots of HeLa cytoplasmic extract and 293T total cell extract, a single band at ~83 kDa was observed, matching the predicted molecular weight of Tdrd3 protein (Fig. 1C). A corresponding signal was observed only in the cytosolic fraction of *Xenopus laevis* oocytes, but not in extracts derived from dissected nuclei (Fig. 1C). Consistently, indirect immunofluorescence microscopy revealed a strong cytosolic localization with perinuclear accumulation in HeLa (Fig. 1D) and COS-1 cells (data not shown). Similar results were obtained when HA-Tdrd3 transfected cells were analyzed (data not shown). Thus, Tdrd3 is a housekeeping gene with a predominant cytosolic localization.

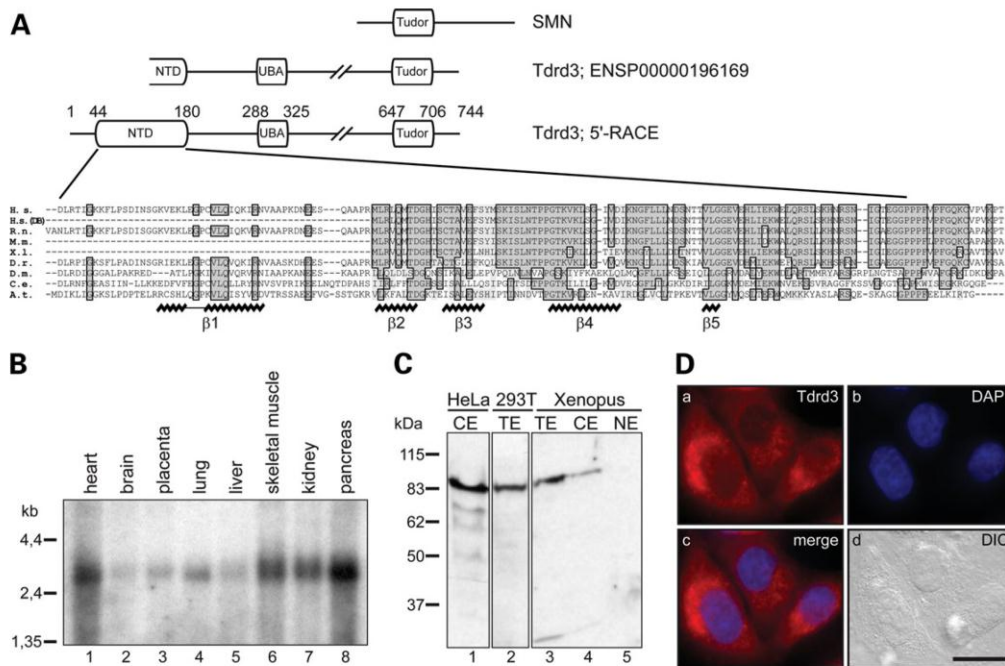


Figure 1. Tdrd3 is widely expressed and localizes predominantly to the cytoplasm. (A) Upper panel: schematic view of the domain structure of SMN, the human Tdrd3 database entry and cloned human Tdrd3 sequence. Numbering corresponds to amino acid residues of cloned Tdrd3. Lower panel: alignment of the human Tdrd3 N-terminal domain annotated in the ENSEMBL database (H.s.[DB]), the Tdrd3 sequence identified in this study (H.s.) and Tdrd3 homologs from different model organisms. Shaded residues are >60% conserved. Four of the five β -strands characteristic of OB-fold domains (β 2– β 5) were inferred from Yin *et al.* (16), β 1 was predicted with PSI-PRED. (B) A Northern blot membrane (Clontech) containing 2 μ g of poly(A)-RNA each from various tissues was probed with [32 P]-labeled Tdrd3 cDNA. A single band of 2.9 kb was detected in any tissue tested. (C) HeLa cytosolic extract (lane 1), HEK-293 total extract (lane 2) or total cytosolic and nuclear extract of *Xenopus* oocytes (lanes 3–5) were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with an anti-Tdrd3 antibody. (D) Indirect immunofluorescence microscopy of HeLa cells with an anti-Tdrd3 antibody showed a cytosolic distribution (a). Nuclei were stained with DAPI (b), (c) and (d) show merged image and Nomarski optics, respectively. Scale bar is 20 μ m.

The UBA domain of Tdrd3 specifically binds to Lys48-linked tetraubiquitin

Next we set out to identify interactors of Tdrd3. We initially turned our attention to the UBA domain. Although originally discovered in proteins involved in ubiquitin-mediated proteolysis (18), this domain has been shown more recently to be capable of acting as a general protein–protein interaction motif (19–21). Therefore, we immobilized GST fusions of full-length Tdrd3, Tdrd3 lacking the UBA domain or the isolated UBA domain on Glutathione–Sepharose beads. The immobilized fusions were then incubated either with monoubiquitin, Lys₄₈-linked tetraubiquitin (the signal for proteasomal degradation of proteins), Lys₆₃-linked ubiquitin dimers (often found as non-proteolytic signals) or the small ubiquitin-related modifier 1 (SUMO-1), which is structurally similar to ubiquitin yet divergent in its cellular function (22). As shown in Figure 2A, the UBA domain of Tdrd3 is both necessary and sufficient for binding to Lys₄₈ linked tetraubiquitin. In contrast, no binding occurred to monoubiquitin, Lys₆₃-linked ubiquitin or the small ubiquitin related modifier SUMO-1 (Fig. 2B). As the major function of this type of modification is the targeting to proteasomes, these results suggest a role of Tdrd3 in turnover of proteins mediated by the ubiquitin-proteasome system.

FMRP and its paralogs interact with Tdrd3

In order to identify additional binding partners of Tdrd3, 2×10^6 cDNA clones were tested in a yeast two hybrid (Y2H) interaction screen using Tdrd3 as bait. This approach revealed a strong interaction of Tdrd3 with the FXR1 protein. FXR1 is encoded by one of the two autosomal paralogs of the FMR1 gene, which is affected in patients suffering from Fragile X syndrome (23). To verify this interaction and to elucidate whether Tdrd3 also interacts with the other FXR1 homologs, FXR2 and FMRP, we conducted *in vitro* binding studies with immobilized ZZ-tagged Tdrd3 and [35 S]-labeled FMRP, FXR1 and FXR2 translated in reticulocyte lysate. Efficient binding of all three FMR paralogs to ZZ–Tdrd3 was observed but not to a control column containing ZZ tag only (Fig. 3A). Of note, the same results were obtained when experiments were conducted with immobilized GST–Tdrd3 and *in vitro* translated FMRP, FXR1 and FXR2 (data not shown). As binding of the investigated two proteins in these assays may be mediated by an unknown factor present in the reticulocyte lysate, direct interaction studies were performed with purified recombinant proteins. FMRP, FXR1 and FXR2 were expressed as ZZ-tagged fusion proteins, immobilized onto IgG-Sepharose and incubated with GST–Tdrd3 protein. Tdrd3 bound to all ZZ-fusion proteins tested

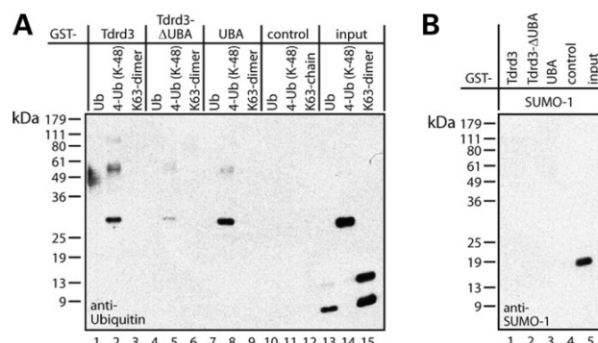


Figure 2. Tdrd3 specifically binds Lys₄₈ linked tetraubiquitin. (A) GST–Tdrd3 (lanes 1–3), GST–Tdrd3– Δ UBA (lanes 4–6), GST–UBA (lanes 7–9) or GST as a control (lanes 10–12) were immobilized on glutathione–sepharose and incubated with monomeric ubiquitin (lanes 1, 4, 7 and 10), Lys₄₈-linked tetraubiquitin (lanes 2, 5, 8 and 11) or Lys₆₃ linked ubiquitin (lanes 3, 6, 9 and 12). Bound proteins were eluted and ubiquitin was detected by western blotting. Lanes 13–15 show 10% of the input material. (B) Binding experiment as in (A) with recombinant SUMO-1. The bound fraction was detected by western blotting using an anti-SUMO-1 antibody.

but not to the ZZ control (Fig. 3B). Thus, Tdrd3 directly binds to FMRP and its homologs FXR 1 and 2 *in vitro*.

Next we analyzed whether the observed interaction between FMRP and Tdrd3 also occurs in the context of a living cell. To address this question, co-immunoprecipitation experiments of endogenous Tdrd3 and FMRP from cellular extracts were performed. As shown in Figure 3C, immunoprecipitation of FMRP leads to the co-precipitation of Tdrd3, and FMRP can be co-precipitated with Tdrd3 (Fig. 3C). Taken together, by means of yeast two-hybrid assays, protein–protein interaction experiments and co-immunoprecipitation studies from cellular extracts, we establish Tdrd3 as a novel interactor of proteins of the FMRP/FXR family.

Tdrd3 is a novel component of stress granules

Previous studies have revealed a role of FMRP and its paralogs in posttranscriptional gene regulation. FXR1 has been shown to upregulate translation of certain mRNAs as a consequence of binding to AU-rich elements within the 3'-UTR of these RNAs (24). In contrast, FMRP negatively regulates mRNA translation, most likely by interfering with ribosome subunit joining on mRNAs and thus formation of 80S ribosomes (25). More recently, FMRP has also been connected to the microRNA pathway, but its precise role in this process remains elusive (26,27). Translational silencing is often linked to the emergence of SGs in cells. These are cytosolic foci that contain stalled 48S pre-initiation complexes, key components of microRNPs like Argonaute 2 (AGO2) and other RNA binding proteins (28,29). Indeed, FMRP-mediated translational regulation coincides with SG formation, a process that can also be induced by FMRP overexpression (Fig. 4A–C) (30). Given that FMRP and Tdrd3 interact *in vitro* and *in vivo*, we asked whether overexpression of Tdrd3 can likewise induce SG formation. Indeed, upon overexpression, we observed a strong accumulation of both HA-tagged (Fig. 4D–F) and GFP-tagged Tdrd3 (Fig. 4G–I) into discrete cytosolic foci. To confirm that

these foci induced by Tdrd3 are indeed functional SGs, we investigated whether they are sensitive to cycloheximide or emetine. Both drugs are translational inhibitors that act by stalling ribosomes on mRNA, thus leading to the stabilization of polysomes and a decrease in 48S pre-initiation complexes. As the pool of translationally silent mRNPs in SGs is in equilibrium with the mRNAs in the polysomal fraction (31), this results in reduced number and size of SGs (32). Indeed, treatment of Tdrd3-transfected cells with either drug significantly reduced the amount of cytosolic granules in GFP–Tdrd3 positive cells (Fig. 4J–O), suggesting that these granules are functional storage compartments of mRNPs. To ensure a direct link between emetine treatment and granule dispersion, time-lapse microscopy of individual cells was performed. Although under these experimental conditions, GFP–Tdrd3 containing foci were not dissociated completely, dissemination of distinct granules was clearly observed (Supplementary Material, Fig. S1), suggesting a direct influence of polysome stabilization on the turnover of these structures. Moreover, treatment of cells with arsenite, a potent inducer of cellular stress known to disrupt polysomes and induce SGs, led to the formation of Tdrd3-containing foci even in cells expressing only low levels of GFP–Tdrd3 (Figs 4P–R and Supplementary Material, Fig. S1). Next, we tested whether known SG markers co-localize to these foci. Therefore, immunofluorescence analysis was performed of GFP–Tdrd3-transfected cells with antibodies against the known SG proteins T-cell intracellular antigen-related protein (TIAR) (33), death associated protein 5 (DAP5) (34) and FMRP. Figure 5A–D shows TIAR-positive SGs induced by GFP–Tdrd3 overexpression. Notably, even upon SG induction by arsenite treatment (Fig. 5E–H), when untransfected cells also showed TIAR-positive SGs (arrows), all SGs visible in transfected cells contained GFP–Tdrd3 (arrowheads). These results could be confirmed using DAP5 as SG marker (Fig. 5I–P). Finally, we tested the presence of FMRP in Tdrd3 containing SGs. Endogenous FMRP was efficiently recruited to GFP–Tdrd3 containing SGs in untreated and arsenite treated cells (Fig. 5Q–X). These results were confirmed by analyzing endogenous FMRP and Tdrd3 in untransfected cells (Fig. 6). While under non-stress conditions, both proteins were distributed throughout the cytosol (Fig. 6A–D), arsenite treatment resulted in the induction of SGs containing both FMRP and Tdrd3 (Fig. 6E and F). Hence, these data confirm Tdrd3 as a novel SG component and suggest a functional link to FMRP-mediated translational regulation.

Mapping of the interaction between FMRP and Tdrd3

FMRP is a protein of 632 amino acids in length with three conserved RNA binding motifs. Two KH domains (KH1 and KH2) are found in the central part of the protein and an arginine–glycine rich domain in the C-terminal region. Having established an interaction between Tdrd3 and FMRP, we were next interested in narrowing down the sites in both proteins required for their mutual interaction. In a set of experiments, *in vitro* translated truncations of FMRP were incubated with immobilized full-length Tdrd3. Interestingly, two different fragments in the primary structure of FMRP are essential for Tdrd3 binding. First, a region spanning residues 430–486 participate in the interaction. This is shown by the

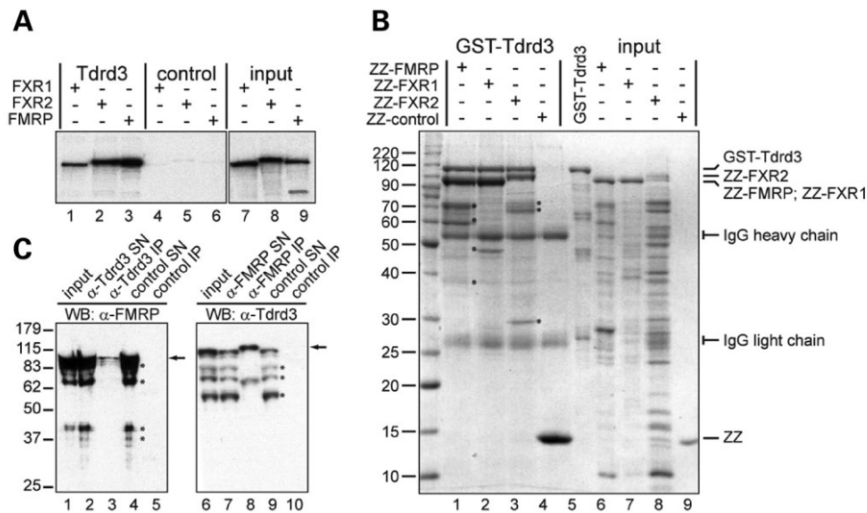


Figure 3. Tdrd3 interacts with FMRP, the product of the disease gene for Fragile X syndrome, and its paralogs FXR1 and FXR2 both *in vitro* and *in vivo*. (A) *In vitro* translated, [35 S]-labeled FXR1 (lanes 1 and 4), FXR2 (lanes 2 and 5) or FMRP (lanes 3 and 6) efficiently bound to immobilized ZZ-Tdrd3 (lanes 1–3) but not ZZ-domain alone (lanes 4–6). Lanes 7–9 show 30% of the translated proteins used in the binding experiments. (B) ZZ-FMRP (lane 1), ZZ-FXR1 (lane 2), ZZ-FXR2 (lane 3) or ZZ-domain alone (lane 4) was immobilized on IgG-Sepharose and incubated with GST-Tdrd3. Bound proteins were analyzed by SDS-PAGE and Coomassie-blue staining. Lanes 5–9 show 10% of the protein inputs. (C) Anti-Tdrd3 and anti-FMRP immunoprecipitates from HEK-293 whole cell extracts were analyzed by western blotting for the presence of co-precipitated FMRP (lanes 1–5) and Tdrd3 (lanes 6–10), respectively. FMRP and Tdrd3 are marked by arrows. Unspecific degradation products are indicated by asterisks in (B) and (C).

fact that binding of FMRP_{1–430} is not significantly higher than the background (Fig. 7B, compare lanes 4 and 15), while FMRP_{1–486} shows strong binding (Fig. 7B, compare lanes 5 and 16). Second, a region encompassing the two KH domains (amino acids 216–332) is necessary for interaction with Tdrd3, as FMRP_{216–632} is efficiently bound (Fig. 7B, lane 7) while FMRP_{332–632} fails to do so (Fig. 7B, lane 8). Fragments lacking any one of these binding sites lose the ability to interact with Tdrd3, suggesting that both regions of the protein constituting the Tdrd3 binding site are brought into proximity of each other in the folded protein.

To map the corresponding FMRP-binding site in the Tdrd3 primary sequence, N-terminal and C-terminal truncated proteins were translated *in vitro* and tested for FMRP-binding activity. As shown in Figure 7D, the C-terminal region spanning amino acids 558–744 and encompassing the Tudor domain was sufficient for the interaction with Tdrd3 (Fig. 7D, lane 4). Surprisingly, the deletion of the Tudor domain failed to affect binding to FMRP (Fig. 7D, lane 5). However, analysis of further truncations revealed that the 20 amino acids directly adjacent to the C-terminal boundary of the Tudor domain are necessary for binding to FMRP. Taken together, these results imply a model where a small stretch neighboring the Tudor domain of Tdrd3 interacts with a binding site in the middle of FMRP comprised of the KH domains and a region from residues 430–486 (Fig. 7E).

A pathogenic amino acid substitution of FMRP prevents Tdrd3 binding

Although the majority of patients affected by Fragile-X syndrome exhibit an expansion of a CGG-repeat adjacent to the

FMR gene leading to transcriptional silencing of FMRP, a missense mutation causing a single amino acid substitution (I304N) has been described in one patient (35). Since the site of this missense mutation locates within FMRPs binding site for Tdrd3 (Fig. 7E), we asked whether interaction between both proteins was affected. Therefore, ZZ-tagged wild-type or I304N mutant FMRP (FMRP_{I304N}) was immobilized onto IgG-Sepharose and binding of *in vitro* translated Tdrd3 was assessed (Fig. 8A). Whereas wild-type FMRP bound Tdrd3 also stably under stringent conditions (750 mM NaCl, Fig. 8A, lane 4), only low levels of Tdrd3 binding to FMRP_{I304N} were detected even at physiological salt concentrations (Fig. 8A, lane 5). This indicates that the I304N mutation abolishes the binding capacity of the Tdrd3 protein to FMRP.

Previous studies had shown that wild-type FMRP forms homo-oligomers *in vitro*, and that homo-oligomerization of FMRP_{I304N} is severely compromised. Hetero-oligomerization between wild-type and mutant FMRP, in contrast, was not affected (25). Hence, we tested whether formation of FMRP oligomers is a pre-requisite for Tdrd3 binding (Fig. 8B). For this, ZZ-tagged FMRP_{wt} (Fig. 8B, lanes 1 and 2) and FMRP_{I304N} (lanes 3 and 4) were immobilized onto IgG-Sepharose. Oligomerization was initiated by the addition of His-tagged FMRP_{wt} (lanes 1 and 3) or FMRP_{I304N} (lanes 2 and 4). As expected, roughly stoichiometric FMRP_{wt}/FMRP_{wt} homo-oligomers (lane 1) and FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers (lanes 2 and 3) were formed while FMRP_{I304N}/FMRP_{I304N} homo-oligomerization was markedly reduced (lane 4). After washing, the immobilized oligomers were incubated with *in vitro* translated [35 S]-labeled Tdrd3. The residual FMRP_{I304N}/FMRP_{I304N} homo-oligomer failed entirely to pull

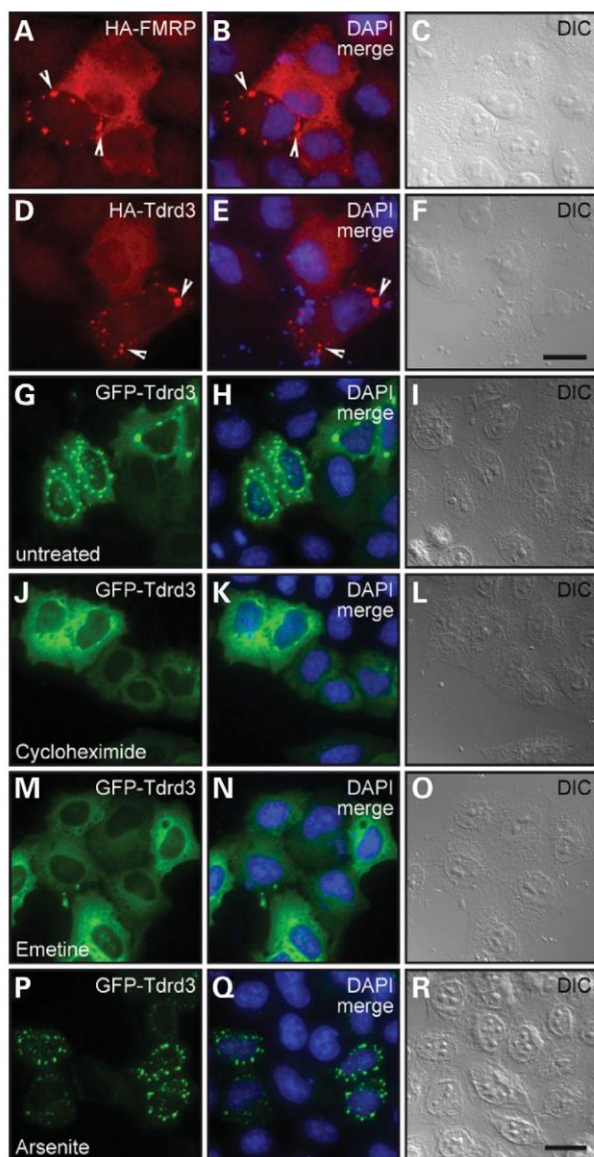


Figure 4. Expression of Tdrd3 in HeLa cells induces SGs. HeLa cells were transiently transfected with HA-FMRP (A–C), HA-Tdrd3 (D–F) or GFP-Tdrd3 (G–R). Visualization of HA-tagged FMRP revealed a cytosolic staining in transfected cells. In some cells, expression of HA-FMRP resulted in cytosolic SGs (arrowheads in A). The same staining pattern was observed when cells were transfected with HA-Tdrd3 (arrowheads in D) or GFP-Tdrd3 (G). To test whether GFP-Tdrd3 containing SGs can be dispersed by cycloheximide or emetine, transfected HeLa cells were treated with either drug 1 h prior to fixation. While untreated (G–I) cells showed a high amount of SGs, granule formation was significantly reduced in cycloheximide (J–L) or emetine (M–O) treated cells. Upon treatment with arsenite (P–R), all transfected cells contained GFP-Tdrd3 positive SGs and no cells with a diffuse GFP-Tdrd3 distribution could be observed. Scale bars in (F) and (R) are 20 μ m and apply to images (A–F) and (G–R), respectively. DAPI staining of nuclei is shown in the merged images.

down radiolabeled Tdrd3 (Fig. 8B, lane 4, lower panel). Therefore, although the loss of Tdrd3 binding seems to correlate with reduced homooligomerization, we propose that binding deficiency is a direct effect of the I304N mutation on FMRP/Tdrd3 interaction rather than a consequence of impaired oligomerization. Surprisingly, FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers bound Tdrd3 as efficient as wild-type homooligomers (Fig. 8B, lower panel, lanes 1–3). As a consequence, hetero-oligomer formation by FMRP_{I304N} expression in an FMRP_{wt} background should be sufficient to induce SGs in cells. This was tested by the transfection of HeLa cells with HA-tagged FMRP_{I304N}, which indeed resulted in the formation of SGs comparable to wild-type FMRP transfection (Fig. 8C–J). Also, no significant deficiency in the recruitment of endogenous Tdrd3 (Fig. 8B and F) or co-transfected GFP-Tdrd3 (Supplementary Material, Fig. S2) to FMRP_{I304N}-induced SGs could be observed, suggesting that FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers are functional *in vivo*.

DISCUSSION

Tdrd3 contains motifs implicated in a variety of different cellular processes

In this study, we aimed at providing a first biochemical and functional characterization of the Tudor domain containing protein Tdrd3. While the structure of murine Tdrd3's Tudor domain has recently been solved (PDB ID: 2D9T) and has been suggested to be a binding platform for proteins containing symmetrical dimethylarginine (14), functional implications for Tdrd3 remained elusive. Homology-based sequence alignment suggests that the N-terminal part of Tdrd3 constitutes an OB-fold domain. This domain is frequently found in proteins with affinity to single-stranded DNA and/or RNA. Interestingly, while only four of the five β -sheets characteristic for an OB-fold domain could be identified in the current database entries of Tdrd3, our 5'-RACE identified an additional sequence with an in-frame upstream initiator methionine codon. The open reading frame encoded by this additional sequence is predicted by PSI-PRED to contain a kinked β -strand typical for the OB-fold β 1 strand (17). In the middle part of the protein, a UBA domain is located whose structure has recently been solved by NMR spectroscopy (PDB ID: 1WJI). Complementary to this structural information, we provide evidence that the UBA domain binds to Lys₄₈-linked tetraubiquitin, i.e. the signal for the proteosomal degradation of proteins (Fig. 2). Remarkably, this interaction is highly specific as neither monoubiquitin, Lys₆₃-linked ubiquitin dimers, nor the ubiquitin-related protein SUMO bound to detectable levels to Tdrd3's UBA domain *in vitro*. It is, therefore, a possibility that Tdrd3 associates with proteins designated for proteasomal degradation (36).

Direct interaction of Tdrd3 with FMRP

By Northern blot analysis, we find the Tdrd3-mRNA to be expressed in a large spectrum of tissues, indicating a function in basal cellular processes rather than in tissue-specific pathways.

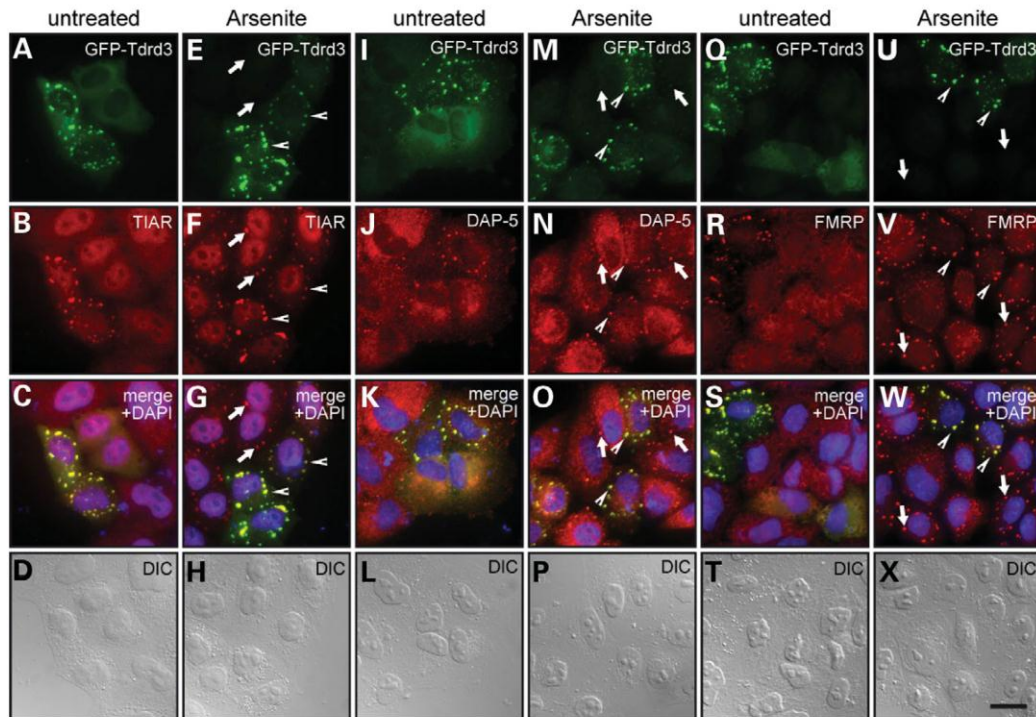


Figure 5. The SG components TIAR, DAP5 and FMRP co-localize with GFP-Tdrd3 in SGs. GFP-Tdrd3 transfected cells were analyzed by immunofluorescence with anti-TIAR (A–H), anti-DAP5 (I–P) or anti-FMRP (Q–X) antibodies. Both proteins showed a strong co-localization with GFP-Tdrd3 positive SGs. Arsenite treatment (E–H, M–P and U–X) led to the induction of SGs containing TIAR, DAP5 or FMRP in untransfected cells (arrows). SGs in transfected cells showed a strong GFP-Tdrd3 signal (arrowheads). Scale bar is 20 μm and applies to all images. DAPI staining of nuclei is shown in the merged images.

In cultured cells and in *Xenopus* oocytes, the Tdrd3 protein was found to be predominantly cytosolic. Indirect immunofluorescence in cultured cells also revealed an occasional faint nuclear staining. Whether this points to an additional function of Tdrd3 in the nucleus is currently unclear. Hence, Tdrd3 is likely to perform its function in the cytoplasm of cells.

To identify proteins interacting with the Tdrd3 protein, we performed a Y2H screen using a human brain cDNA library. Interestingly, FXR1, the autosomal paralog of the Fragile X mental retardation protein FMRP, emerged as a robust interacting protein out of this screen. Although not identified in the two hybrid screen, we also found strong binding of Tdrd3 with FXR2, the second protein closely related to FMRP, and with FMRP itself. The association with the latter is of particular interest, as this protein is known to be absent or mutated in the Fragile X-mental retardation syndrome. This interaction has been confirmed by two independent and complementary techniques. First, direct contact of FMRP with Tdrd3 was observed when recombinantly expressed proteins were analyzed by *in vitro* binding assays. Second, and most importantly, we also detected binding of FMRP and Tdrd3 to each other by co-immunoprecipitation from cellular extracts, making it likely that one direct interaction partner of Tdrd3 *in vivo* is FMRP.

Interaction mapping has revealed binding of FMRP to a stretch of 20 amino acids adjacent to the C-terminal boundary of the Tudor domain of Tdrd3 (amino acids 704–723). FMRP in turn contacts Tdrd3 via two sequence elements, the second KH domain and a stretch comprising amino acids 430–486.

As both elements are necessary but individually not competent in binding, we hypothesize that these two regions come into close proximity in the tertiary structure of the protein to form the binding platform for Tdrd3.

Most Fragile X patients exhibit mutations in the FMR1 gene that lead to transcriptional silencing and hence to the absence of FMRP. In a single case, however, also the substitution of an isoleucine to an asparagine in position 304 (I304N) elicits the disease. This mutation has been shown to interfere with several functions of FMRP, including mRNA binding, homo-dimerization and translational regulation. Remarkably, when tested in *in vitro* binding assays, FMRP_{I304N} failed to interact with Tdrd3. These data are consistent with our finding that a region surrounding this residue is important for Tdrd3 binding.

It has recently been proposed that SMN interacts with FMRP and that this interaction is dependent on the amino acids 470–485 of FMRP (37). It will be interesting to analyze whether SMN and Tdrd3 compete for FMRP binding. However, SMN interaction is unaffected by the FMRP I304N mutation (37) and hence the binding sites appear to differ at least partially.

Tdrd3 as a component of stress granules

It is known from previous work that FMRP inhibits translation of mRNAs, most likely at the level of translation initiation (25). Current research focuses on the role of FMRP after stress stimuli such as heat and osmotic shock or oxidative stress.

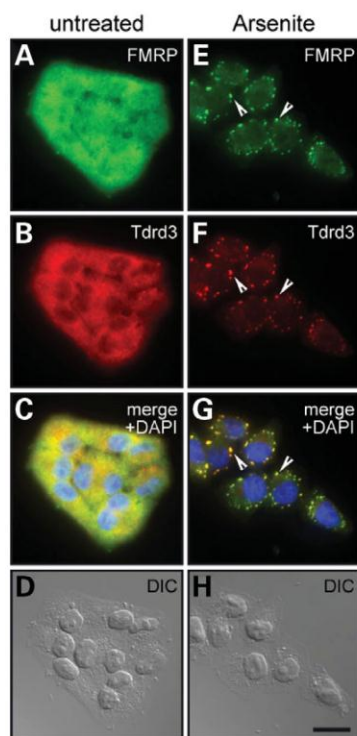


Figure 6. Endogenous Tdrd3 and FMRP co-localize in arsenite-induced SGs. HeLa cells were left untreated (A–D) or treated with arsenite (E–H). Immunofluorescence analysis with anti-FMRP (A and E) or anti-Tdrd3 antibodies (B, F) revealed a diffuse cytosolic localization of both proteins in untreated cells. Upon arsenite treatment, FMRP-positive SGs were induced and Tdrd3 co-localized in these structures (arrowheads). Scale bar is 20 μm and applies to all images. DAPI staining of nuclei is shown in the merged images.

Under these conditions, FMRP concentrates in SGs, where translational silencing of mRNAs occurs (30). It is known that overexpression of FMRP and other components involved in mRNA metabolism likewise induces formation of SGs. Several lines of evidence suggest that the cytosolic foci induced by overexpression of Tdrd3 are equivalent to these structures. First, they disperse upon treatment of cells with either cycloheximide or emetine, showing them to be in equilibrium with polyribosomes bound to translated mRNAs. Second, arsenite treatment induces Tdrd3 containing granules even in cells expressing only low levels of Tdrd3. Tdrd3 in these cells has no aggregates in the absence of this stress-inducing agent. Last, Tdrd3 co-localizes with three known SG marker proteins, namely TIAR, DAP5 and FMRP, in these foci. Based on these results, we conclude that Tdrd3 is a novel component in SGs where it interacts with FMRP.

Our data raise the possibility that Tdrd3 functions in FMRP-mediated translational silencing. Consistent with this is our preliminary observation that Tdrd3 itself represses translation in an *in vitro* system (data not shown). Since Tdrd3 binds to Lys₄₈-linked tetraubiquitin, it is tempting to speculate that Tdrd3 provides a link between translational regulation in SGs and the turnover of proteins mediated by the

ubiquitin-proteasome system. Alternatively and not mutually exclusive, Tdrd3 may aid the removal of proteins co-recruited with the silenced RNP by proteasomal degradation. It is worth to mention that HDAC6, another protein containing an ubiquitin binding motif has recently been shown to be necessary for SG formation (38) and that interfering with the ubiquitin-proteasome system can induce SGs (39). Clearly, it will be interesting to identify proteins whose stability and/or function is influenced by Tdrd3.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of Tdrd3-cDNA

Tdrd3-cDNA was amplified using the 'Marathon human brain cDNA' library (Clontech) with transcript-specific primers. 5'- and 3'-RACE-PCR was carried out using the 'Marathon RACE Kit' (Clontech) according to the manufacturer's instructions. Tdrd3-cDNA and fragments thereof, respectively, were subcloned into pET21a-ZZ for expression with a ZZ tag and pHA, an N-terminal HA tag containing derivative of pcDNA3.1 (Invitrogen). FMRP, FXR1 and FXR2 constructs were generated as described (25).

Preparation of recombinant proteins and antibodies

Recombinant FMRP, FXR1 and FXR2 proteins were expressed and purified as described previously (25). pET21a-ZZ-Tdrd3 and pGEX5X1-Tdrd3 were transformed in *E. coli* BL21(DE3) and after induction with 1 mM IPTG expression was allowed for 5 h at 26°C. Pelleted bacteria were resuspended in 500 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM MgCl₂, 0.02% (v/v) Igepal CA630 (P500) supplemented with 0.5 mM PMSF. Suspensions were lysed by sonication and cleared by centrifugation. GST- or His-tagged fusion protein containing supernatants were incubated with Glutathione-Sepharose (GE Life Sciences) or Ni-NTA (Qiagen), respectively, washed with the same buffer except for 300 mM NaCl (P300) and bound proteins were eluted with 10 mM glutathione in P300 for GST-fusion proteins or 150 mM imidazole in P300 for His-tagged proteins. After elution, proteins were dialysed against P300. *In vitro* translated proteins were generated by coupled transcription and translation in reticulocyte lysate (Promega, Madison, WI, USA). Rabbits were immunized with His-tagged Tdrd3 protein as described (6) and the serum affinity purified using His-Tdrd3 covalently bound to NHS-activated Sepharose (GE Life Sciences). Commercial primary antibodies were purchased from Santa Cruz (goat polyclonal anti-DAP5: sc-13736), Covance (mouse monoclonal anti-HA antibody: HA.11) and abcam (rabbit polyclonal anti-TIAR; ab26257).

Protein binding assays

For protein binding assays, lysates containing 1–2 μg of ZZ-tagged fusion proteins were incubated on 30 μl of IgG-Sepharose (GE Life Sciences). For GST-fusion proteins, 1–2 μg of the purified protein were incubated with 30 μl Glutathione-Sepharose. After washing, with P300, 1–5 μl of an *in vitro* translation reaction or 1–2 μg of purified

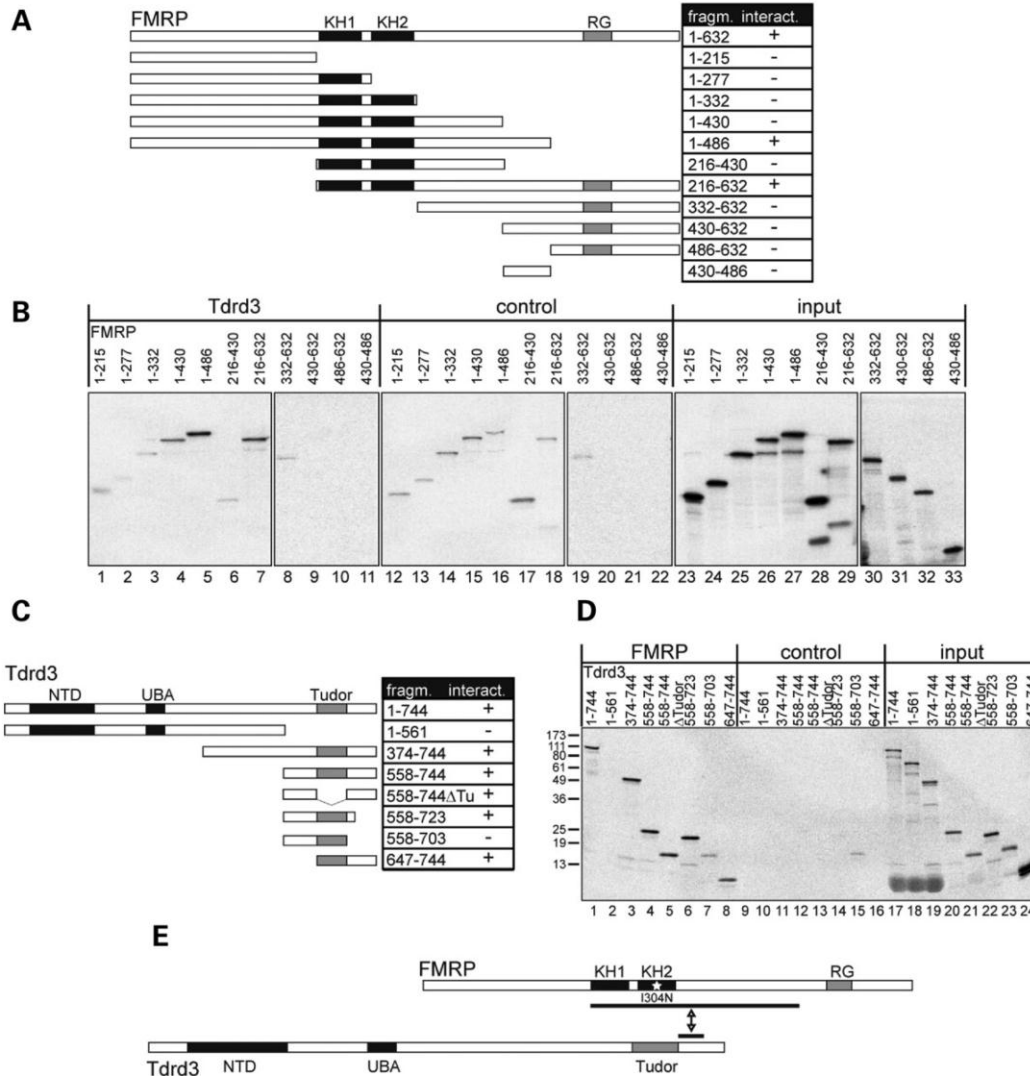


Figure 7. Mapping of the interaction domains of FMRP and Tdrd3. (A and C) Schematic drawings of the FMRP and Tdrd3 fragments used for interaction mapping. The tables summarize the results of the interaction studies shown in (B) and (D). (B) Recombinant full-length ZZ-Tdrd3 (lanes 1–11) or ZZ-domain alone (lanes 12–22) were immobilized on IgG-sepharose and incubated with FMRP deletion constructs that had been translated *in vitro* in the presence of L-[³⁵S]-methionine. The only deletion constructs that produced a signal significantly over background were those containing the KH domains and a stretch of amino acids ranging from residue 430–486 (lanes 5 and 7). (D) To map the FMRP binding domain of Tdrd3, immobilized full-length FMRP was used to precipitate fragments of Tdrd3. Interestingly, although binding could be confined to residues 558–744 (lane 4), the Tudor domain itself was not essential for interaction (lane 6). In contrast, 20 amino acids directly C-terminal to the Tudor domain seem to be necessary for interaction (compare lanes 7 and 8). (E) Schematic summary of the Tdrd3/FMRP interaction domains. The location of the pathogenic I304N missense mutation is indicated by a star.

recombinant protein were added and binding was allowed for 2 h at 4°C. After washing, the affinity matrix was transferred to a new tube and bound proteins were recovered with SDS-loading buffer and analyzed by SDS-PAGE. For ubiquitin binding assays, GST-fusion proteins were immobilized on Glutathione-Sepharex and incubated with monomeric ubiquitin, Lys₄₈- and Lys₆₃-linked tetraubiquitin, respectively. After washing with PBS containing 0.5% Tween 20, proteins were eluted with SDS-loading buffer and immunoblot was performed using anti-ubiquitin antibody.

Yeast two-hybrid screen

Tdrd3 was cloned into the pGBKT7 vector and transformed in the PJ69-2A bait strain. After selection on SDC medium without tryptophane, mating with the Y187 prey strain that was pre-transformed with a human brain cDNA-bank in the pACT2 vector (Matchmaker, Clontech) was performed. Colonies growing on SDC-Medium without leucine, tryptophane, adenine and histidine were assayed for β-galactosidase activity and positive clones recovered for plasmid preparation.

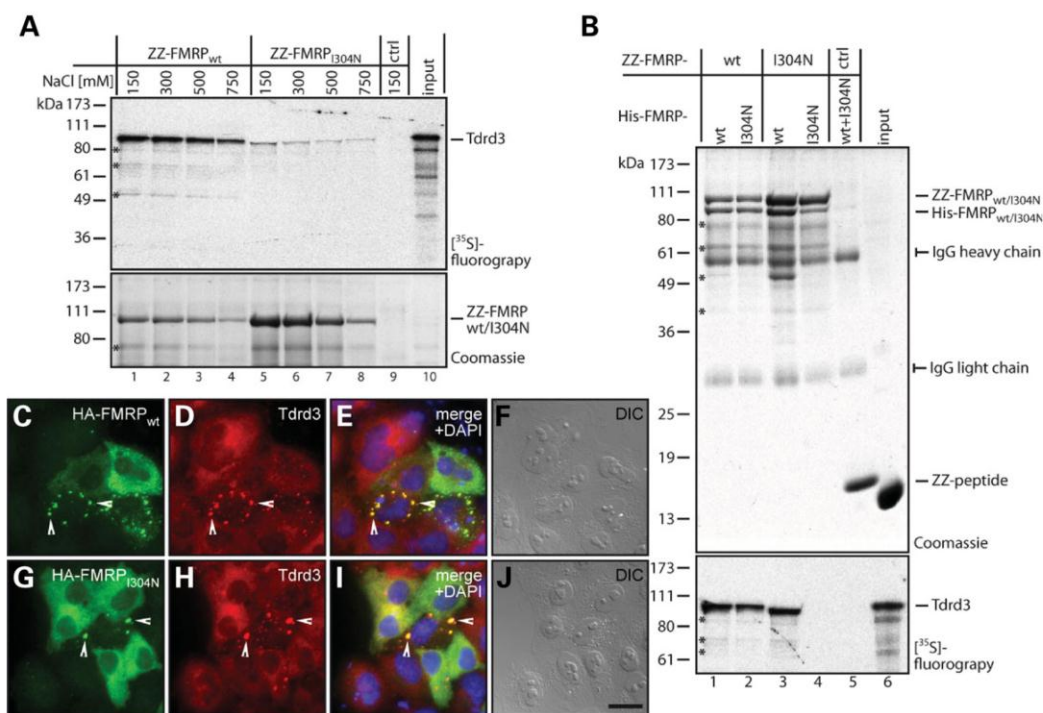


Figure 8. The pathogenic FMRP I304N mutation identified in a patient with Fragile X syndrome strongly interferes with Tdrd3 interaction. (A) To assess binding of Tdrd3, recombinant wild-type (lanes 1–4) and I304N mutant (lanes 5–8), ZZ-FMRP was immobilized on IgG sepharose. ZZ domain alone served as a control (lane 9). After incubation with *in vitro* translated Tdrd3, the beads were washed with buffers containing either 150 mM (lanes 1, 5 and 9), 300 mM (lanes 2 and 6), 500 mM (lanes 3 and 7) or 750 mM (lanes 4 and 8) NaCl. Eluted proteins were resolved by SDS-PAGE and analyzed by Coomassie-blue staining (lower panel) and autoradiography (upper panel). Binding of Tdrd3 to immobilized FMRP_{I304N} was severely reduced even at physiological salt concentration (lane 5). Thirty percent of *in vitro* translated Tdrd3 are depicted as input (lane 10). Asterisks indicate unspecific degradation products. (B) To assess whether the reduced Tdrd3 binding observed in (A) is a consequence of the known defect in homo-oligomerization of FMRP_{I304N}, immobilized ZZ-FMRP_{wt} (lanes 1 and 2) or ZZ-FMRP_{I304N} (lanes 3 and 4) were incubated with purified recombinant His-FMRP_{wt} (lanes 1 and 3) or His-FMRP_{I304N} (lanes 2 and 4). As a control, ZZ domain was incubated with a mix of His-FMRP_{wt} and His-FMRP_{I304N} (lane 5). Coomassie-blue staining (upper panel) revealed unaffected formation of FMRP_{wt}/FMRP_{wt} homo-oligomers (lane 1) and FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers (lanes 2 and 3) while only residual FMRP_{I304N}/FMRP_{I304N} homo-oligomerization could be observed (lane 4). Upon incubation with [³⁵S]-labeled *in vitro* translated Tdrd3, Tdrd3 bound to wild-type FMRP_{wt}/FMRP_{wt} homo-oligomers (lanes 1–3) and FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers, but failed to associate with FMRP_{I304N}/FMRP_{I304N} homo-oligomers (lane 4). Thirty percent of *in vitro* translated Tdrd3 is depicted as input (lane 6). IgG heavy and light chain are indicated on the right and unspecific degradation products are marked by an asterisk. (C–J) The FMRP_{wt}/FMRP_{I304N} hetero-oligomers observed in (B) were tested for their ability to induce SGs. Accordingly, HeLa cells endogenously expressing FMRP_{wt} were transfected with HA-FMRP_{wt} (C–F) or HA-FMRP_{I304N} (G–J). SG formation could be observed in both cases (arrowheads).

Immunocytochemistry and stress treatment

HeLa cells were grown on cover slips in DMEM medium containing 10% fetal calf serum at 37°C and 5% CO₂. One day after transfection with Nanofectin (PAA), cells were fixed either with 2% formaldehyde, permeabilized with 0.2% Triton X 100 and blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) or in case of drug treatment fixed with ice-cold methanol/acetone (1:1) and blocked with 1% BSA. Treatment with cycloheximide (50 µg/ml), emetine (20 µg/ml) or arsenite (500 µM) was performed for 1 h immediately before fixation. After incubation with primary antibody, cells were washed and incubated with an appropriate secondary antibody conjugated to AlexaFluor594 or AlexaFluor488 (Invitrogen). After washing, cells were embedded in DAPI containing mounting medium and analyzed with a Zeiss Axiovert 200M equipped with a Plan Apochromat 63x/1.40 Oil immersion objective and Nomarski optics. Images were

acquired with AxioVision software and processed using Adobe Photoshop CS3.

Northern blotting

A Northern blot membrane with 2 µg polyA+mRNA from eight different human tissues was purchased from Clontech. Tdrd3 cDNA was radioactively labeled using Klenow fragment with the 'Megaprime DNA labeling kit' (GE Life Sciences) according to the manufacturer's description. The membrane was blocked with 900 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, 5 mM EDTA, 50% (v/v) formamide, 0.1% (w/v) SDS, 0.04% (w/v) Ficoll 400, 0.04% (w/v) polyvinylpyrrolidone, 0.04% (w/v) BSA, 100 µg/ml herring sperm DNA followed by hybridization for 3 h at 42°C. Washing was carried out once with 2x SSC+ buffer at 42°C, and consecutively with decreasing concentration and increasing temperature until 0.1x SSC at 60°C

3246 Human Molecular Genetics, 2008, Vol. 17, No. 20

(1x SSC+ is 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0, 0.1% SDS). Finally, the membrane was exposed on X-ray film.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at *HMG* Online.

FUNDING

This work was supported by the DFG grants FOR855 and SFB581 to U.F.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank F. Melchior and S. Jentsch for reagents and A. Chari for critically reading this manuscript.

Conflict of Interest statement. None declared.

REFERENCES

- Selenko, P., Sprangers, R., Stier, G., Buhler, D., Fischer, U. and Sattler, M. (2001) SMN tudor domain structure and its interaction with the Sm proteins. *Nat. Struct. Biol.*, **8**, 27–31.
- Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.*, **22**, 51–52.
- Lamb, F.S., Bama, T.J., Goud, C., Marenholz, I., Mischke, D. and Schutte, B.C. (2000) Complex RNA processing of TDRKH, a novel gene encoding the putative RNA-binding tudor and KH domains. *Gene*, **246**, 209–218.
- Chuma, S., Hiyoshi, M., Yamamoto, A., Hosokawa, M., Takamune, K. and Nakatsuji, N. (2003) Mouse Tudor Repeat-1 (MTR-1) is a novel component of chromatoid bodies/nuages in male germ cells and forms a complex with snRNPs. *Mech. Dev.*, **120**, 979–990.
- Sabeur, K., Ball, B.A., Corbin, C.J. and Conley, A. (2008) Characterization of a novel, testis-specific equine serine/threonine kinase. *Mol. Reprod. Dev.*, **75**, 867–873.
- Meister, G., Hannus, S., Plottner, O., Baars, T., Hartmann, E., Fakan, S., Lagerbauer, B. and Fischer, U. (2001) SMNrp is an essential pre-mRNA splicing factor required for the formation of the mature spliceosome. *EMBO J.*, **20**, 2304–2314.
- Boswell, R.E. and Mahowald, A.P. (1985) Tudor, a gene required for assembly of the germ plasm in *Drosophila melanogaster*. *Cell*, **43**, 97–104.
- Breitwieser, W., Markussen, F.H., Horstmann, H. and Ephrussi, A. (1996) Oskar protein interaction with Vasa represents an essential step in polar granule assembly. *Genes Dev.*, **10**, 2179–2188.
- Lefebvre, S., Bürglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M. et al. (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, **80**, 155–165.
- Meister, G., Buhler, D., Pillai, R., Lottspeich, F. and Fischer, U. (2001) A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 945–949.
- Buhler, D., Raker, V., Luhrmann, R. and Fischer, U. (1999) Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.*, **8**, 2351–2357.
- Brahms, H., Meheus, L., de Brabandere, V., Fischer, U. and Luhrmann, R. (2001) Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein. *RNA*, **7**, 1531–1542.
- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A. and Dreyfuss, G. (2001) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell*, **7**, 1111–1117.
- Cote, J. and Richard, S. (2005) Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J. Biol. Chem.*, **280**, 28476–28483.
- Penagarikano, O., Mulle, J.G. and Warren, S.T. (2007) The pathophysiology of fragile x syndrome. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, **8**, 109–129.
- Yin, J., Sobbeck, A., Xu, C., Meetei, A.R., Hoatlin, M., Li, L. and Wang, W. (2005) BLAP75, an essential component of Bloom's syndrome protein complexes that maintain genome integrity. *EMBO J.*, **24**, 1465–1476.
- Theobald, D.L., Mitton-Fry, R.M. and Wuttke, D.S. (2003) Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **32**, 115–133.
- Hofmann, K. and Bucher, P. (1996) The UBA domain: a sequence motif present in multiple enzyme classes of the ubiquitination pathway. *Trends Biochem. Sci.*, **21**, 172–173.
- Dieckmann, T., Withers-Ward, E.S., Jarosinski, M.A., Liu, C.F., Chen, I.S. and Feigon, J. (1998) Structure of a human DNA repair protein UBA domain that interacts with HIV-1 Vpr. *Nat. Struct. Biol.*, **5**, 1042–1047.
- Bertolaet, B.L., Clarke, D.J., Wolff, M., Watson, M.H., Henze, M., Divita, G. and Reed, S.I. (2001) UBA domains mediate protein–protein interactions between two DNA damage-inducible proteins. *J. Mol. Biol.*, **313**, 955–963.
- Grant, R.P., Hurt, E., Neuhaus, D. and Stewart, M. (2002) Structure of the C-terminal FG-nucleoporin binding domain of Tap/NXF1. *Nat. Struct. Biol.*, **9**, 247–251.
- Geiss-Friedlander, R. and Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 947–956.
- Siomi, M.C., Siomi, H., Sauer, W.H., Srinivasan, S., Nussbaum, R.L. and Dreyfuss, G. (1995) FXR1, an autosomal homolog of the fragile X mental retardation gene. *EMBO J.*, **14**, 2401–2408.
- Vasudevan, S. and Steitz, J.A. (2007) AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, **128**, 1105–1118.
- Laggerbauer, B., Ostareck, D., Keidel, E.M., Ostareck-Lederer, A. and Fischer, U. (2001) Evidence that fragile X mental retardation protein is a negative regulator of translation. *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 329–338.
- Jin, P., Alisch, R.S. and Warren, S.T. (2004) RNA and microRNAs in fragile X mental retardation. *Nat. Cell Biol.*, **6**, 1048–1053.
- Jin, P., Zarnescu, D.C., Ceman, S., Nakamoto, M., Mowrey, J., Jongens, T.A., Nelson, D.L., Moses, K. and Warren, S.T. (2004) Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.*, **7**, 113–117.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2006) RNA granules. *J. Cell Biol.*, **172**, 803–808.
- Anderson, P. and Kedersha, N. (2008) Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 141–150.
- Mazroui, R., Huot, M., Tremblay, S., Filion, C., Labelle, Y. and Khandjian, E.W. (2002) Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum. Mol. Genet.*, **11**, 3007–3017.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E. and Anderson, P. (2005) Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNA remodeling. *J. Cell Biol.*, **169**, 871–884.
- Kedersha, N. and Anderson, P. (2007) Mammalian stress granules and processing bodies. *Methods Enzymol.*, **431**, 61–81.
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. and Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.*, **147**, 1431–1442.
- Nousch, M., Reed, V., Bryson-Richardson, R.J., Currie, P.D. and Preiss, T. (2007) The eIF4G-homolog p97 can activate translation independent of caspase cleavage. *RNA*, **13**, 374–384.
- De Boulle, K., Verkerk, A.J., Reyniers, E., Vits, L., Hendrickx, J., Van Roy, B., Van den Bos, F., de Graaff, E., Oostra, B.A. and Willems, P.J. (1993) A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nat. Genet.*, **3**, 31–35.
- Pickart, C.M. and Fushman, D. (2004) Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **8**, 610–616.
- Piazzon, N., Rage, F., Schlotter, F., Moine, H., Branlant, C. and Massenet, S. (2008) In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J. Biol. Chem.*, **283**, 5598–5610.
- Kwon, S., Zhang, Y. and Matthias, P. (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev.*, **21**, 3381–3394.
- Mazroui, R., Di Marco, S., Kaufman, R.J. and Gallouzi, I. (2007) Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 2603–2618.

11 Verzeichnis der Veröffentlichungen

Originalarbeiten:

Linder B*, Plöttner O*, Kroiss M, Hartmann E, Laggerbauer B, Meister G, Keidel E & Fischer U (2008) Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Human Molecular Genetics* **17**: 3236-3246

Linder B, Dill H, Hirmer A, Brocher J, Lee GP, Mathavan S, Bolz HJ, Winkler C, Laggerbauer B & Fischer U (2011) Systemic splicing factor deficiency causes tissue-specific defects: a zebrafish model for retinitis pigmentosa. *Human Molecular Genetics* **20**: 368 -377

Yin J, Brocher J, **Linder B**, Hirmer A, Fischer U & Winkler C (2011) The 1D4 antibody labels outer segments of short double cones but not rods in zebrafish. *J Neurosci*, Manuskript eingereicht.

Dill H*, **Linder B***, Fehr A & Fischer U (2012) Intronic miR-26b controls neuronal differentiation by repressing its host transcript *ctdsp2*. *Genes & Development* **26**: 25-30

Linder B, Bolz HJ, Rütter K, Gal A, Laggerbauer B & Fischer U (2012) A missense mutation in the splicing factor PRPF4 identified in a Retinitis pigmentosa patient displays defects in tri-snRNP integration. *Manuskript in Vorbereitung*.

*: gleichermaßen beigetragen

Buchbeiträge:

Dill H, **Linder B**, Hirmer A & Fischer U (2012) Analysis of Photoreceptor Degeneration in the Zebrafish *Danio rerio*. *Methods in Molecular Biology*, im Druck.

Würzburg, Januar 2012

Bastian Linder



12 Danksagung

Allen voran gilt mein Dank Prof. Dr. Utz Fischer, der mir nicht nur das Thema dieser Dissertation überlassen hat, sondern mich darüber hinaus auch bei all meinen Ideen unterstützt hat.

Prof. Dr. Dr. Lorenz Meinel und Prof. Dr. Manfred Gessler danke ich herzlich für die Übernahme des zweiten und dritten Gutachtens.

Ganz besonderer Dank geht an Bernhard „Dr. L“ Laggerbauer, der mir so oft das (Labor-)leben erheitert, die Augen geöffnet und den Rücken freigehalten hat, dass diese Arbeit ohne ihn sicher nicht die gleiche wäre (auch wenn er sie nicht auch noch korrekturgelesen hätte ;-)).

Dank gebührt auch dem Rest der Laborbesetzung, ihr habt mich wirklich bestens begleitet und immer unterstützt!

Gesondert erwähnen möchte hier ich Ashwin und Andreas, die mit mir sehr viel gelacht, geredet, geforscht, gebrüllt, gelitten, getrunken und gefeiert haben. Die „alte Garde“ komplettieren Lusy, Nils, Simon, Christian & Howie. Nicht fehlen dürfen auch die „etwas Jüngeren“ Matthias und Holger sowie die „Küken“ Anja und Schorsch. Danke!

Besonderer Dank geht an Anja und Holger, die mir sehr bei dieser Arbeit geholfen haben!

Ebenfalls ganz besonders danken möchte ich denen, die das Labor B116/B119 zu dem Arbeitsplatz gemacht haben, der mir so viel Freude bereitet hat (jedenfalls meistens...): Meine Lieblingsdiplomanden Anja, Schorsch und Conni sowie insbesondere Lissy, deren exzellente Unterstützung mir viel Arbeit abgenommen hat!

Es gibt ein Leben neben dem Labor, und auch hier gebührt vielen Menschen Dank, ganz besonders meiner Familie:

Allen voran gilt der Dank meinen Eltern. Ohne eure ununterbrochene Unterstützung und euer Vertrauen hätte ich es nicht geschafft.

Meinen Schwiegereltern Ingrid und Heinz danke ich dafür, dass sie mich so herzlich in ihre Familie aufgenommen haben.

Zu guter Letzt gilt mein Dank Dir, liebe Tina. Ich kann mir nicht vorstellen, wie ein Leben ohne Dich aussehen könnte. Ich liebe Dich.





14 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

„Systemischer Spleißfaktormangel im Zebrafisch *Danio rerio* – Etablierung und Charakterisierung eines Tiermodells für Retinitis pigmentosa“

selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, Januar 2012

Bastian Linder

