
Identifizierung und Analyse von
Proteininteraktionen bei zwei Mitgliedern der
MAGUK-p55-Subfamilie, MPP4 und MPP5

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Johanna R. Förster
aus Würzburg

Würzburg 2009

Eingereicht am: 14.04.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin J. Müller

Erstgutachter: PD Dr. Heidi Stöhr

Zweitgutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 08.07.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

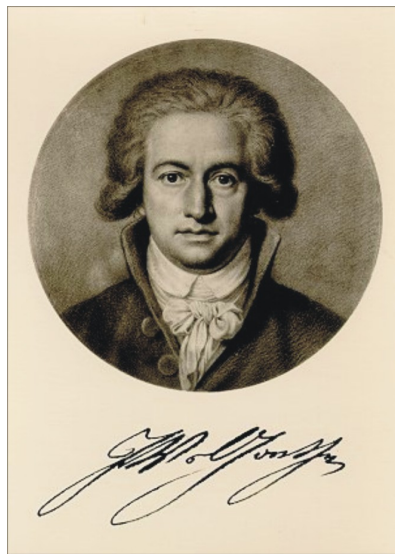
(Gemäß §4 Absatz 3 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg von 15. März 1999.)

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Diese Arbeit wurde weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegt. Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben und zu erwerben gesucht.

Die vorliegende Arbeit wurde von PD Dr. Heidi Stöhr angeleitet.

Regensburg, den 14. April 2009

Johanna Förster



Eigentlich weiß man nur, wenn man wenig weiß; mit dem Wissen wächst der Zweifel.

Johann Wolfgang von Goethe (1749-1832)

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I	ZUSAMMENFASSUNG	1
II	SUMMARY	3
III	EINLEITUNG	5
1	Die MAGUK-Proteine	5
1.1	Die Domänenstruktur der MAGUK-Proteine	5
1.1.1	Überblick über die Domänenstruktur	5
1.1.2	Die PDZ-Domäne.....	6
1.1.3	Die Einteilung der MAGUK-Proteine in Subfamilien.....	8
2	Die Retina	9
2.1	Überblick über den Aufbau der Retina.....	9
2.2	Die Ribbonsynapsen der Photorezeptoren.....	10
3	Das palmitoylierte Membranprotein 4	11
3.1	Lokalisierung von MPP4 in der Retina	11
3.2	Teilprojekt 1: Identifizierung von MPP4-Interaktionspartnern	13
4	Das palmitoylierte Membranprotein 5	14
4.1	Die Polarität von Zellen und die Rolle von Gerüstproteinen.....	14
4.2	Wichtige Proteinkomplexe in polarisierten Epithelzellen und Zellen der Retina.....	15
4.2.1	Übersicht über die Proteinkomplexe	15
4.2.2	Das CRB-Protein im Komplex mit MPP5 und PATJ	15
4.2.3	Die Lokalisierung des CRB-Komplexes in der Retina.....	17
4.3	Defekte im CRB-Komplex	18
4.3.1	Mutationen im MPP5 des Zebrafisches führen zu retinalen Schäden.....	18
4.3.2	Weitere Tiermodelle für Crumbs und seine Komplexmitglieder	18
4.3.3	Mutationen im humanen <i>CRBI</i>	20
4.3.4	Defekte im CRB-Komplex der Epithelzellen	21
4.4	Teilprojekt 2: Funktionelle Analyse einer Punktmutation in der MPP5-PDZ-Domäne	21
IV	MATERIAL UND METHODEN	22
1	Zellkultur	22
1.1	Allgemeines	22
1.2	Herstellung von Zellysat	23
1.3	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	23
1.3.1	Transiente Transfektion.....	23
1.3.2	Stabile Transfektion.....	24
1.4	Immunzytochemie.....	25
1.5	Messung des transepithelialen Widerstandes	26
1.6	Calcium- <i>switch-assay</i>	28
2	Immunhistochemie	28
3	Molekulargenetische Methoden	29
3.1	DNA-Extraktion	29
3.1.1	DNA-Extraktion aus Mausegewebe	29

3.1.2	Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien	29
3.1.3	Isolierung von Hefe-DNA	30
3.2	Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion.....	30
3.3	Reinigung von PCR-Produkten	31
3.4	Agarosegelelektrophorese	31
3.5	Sequenzierung	32
3.5.1	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	32
3.5.2	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	33
3.6	Klonierung von Genen zur Expression in Bakterien und Säugerzellen	33
3.6.1	Klonierung von PCR Produkten	33
3.6.2	Umklonierung in Vektoren zur Expression in Bakterien und Säugerzellen.....	34
3.6.3	Ligation	34
3.6.4	Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Zellen von <i>E. coli</i>	34
3.7	Transformation	35
3.7.1	Transformation in Bakterien	35
3.7.2	Transformation in Hefezellen	35
3.8	Quantifizierung von DNA und RNA	36
3.9	Oligonukleotid-gesteuerte, zielgerichtete Mutagenese	36
3.10	Isolierung von Gesamt-RNA.....	37
3.11	cDNA-Synthese.....	37
3.12	Quantitative <i>real-time</i> -PCR (qRT-PCR).....	38
3.12.1	Prinzip	38
3.12.2	Durchführung.....	38
3.12.3	Auswertung.....	41
4	Proteinbiochemische Methoden	42
4.1	Proteinexpression in <i>E. coli</i>	42
4.2	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie	42
4.3	Herstellung einer Immunaффinitätsmatrix	43
4.3.1	Dialyse der Antikörper	43
4.3.2	Aktivierung der Sepharose mit Cyanogenbromid	43
4.3.3	Antikörperkopplung	44
4.4	Solubilisierung von Proteinen aus Geweben.....	44
4.5	Koimmunpräzipitation	45
4.5.1	Koimmunpräzipitation für die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese.....	45
4.5.2	Koimmunpräzipitation im kleinen Maßstab.....	45
4.6	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford	46
4.7	GST- <i>pull-down</i> -assay.....	46
4.8	Auftrennung und Analyse von Proteinen	47
4.8.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47
4.8.2	Western-Blot	48
4.9	2D-Gelelektrophorese.....	49
4.9.1	Probenvorbereitung	49
4.9.2	Erste Dimension	50
4.9.3	Zweite Dimension	51
4.10	Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie.....	51
4.11	Das Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	52
4.11.1	Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems.....	52
4.11.2	Interaktionstest auf Minimalplatten	53
4.11.3	β -Galaktosidase- <i>assay</i>	53
V	ERGEBNISSE	55
1	Bestimmung des Epitops des monoklonalen MPP4-Antikörpers 3H10.....	55

2	Proteomische Analyse des MPP4-assoziierten Proteinkomplexes	57
2.1	Isolierung des MPP4-organisierten Proteinkomplexes aus der zytosolischen Fraktion der Rinderretina	57
2.2	Massenspektrometrische Identifizierung der MPP4-assoziierten Proteine	58
2.3	MPP4 interagiert mittels L27-Heterodimerisierung direkt mit PSD95.....	62
2.4	Expression der <i>Psd95</i> -Spleißvarianten in der Mausretina.....	65
2.5	Analyse der Assoziation zwischen MPP4 und Hsc70	66
2.6	Analyse der Assoziation zwischen MPP4 und Recoverin.....	69
2.7	Isolierung des MPP4-organisierten Proteinkomplexes aus der Membranfraktion der Rinderretina	70
3	Funktionelle Analyse der V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5.....	73
3.1	Untersuchung der Effekte von Mutationen in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Bindung zu Crumbs-Proteinen	73
3.2	Einfluss der V301N-Mutation auf die Interaktion mit Veli3 und MUPP1	77
3.3	Stabile MDCK-Zelllinien zur Untersuchung der Auswirkung der V301N-Mutation	78
3.3.1	Herstellung der stabilen MPP5-MDCK-Linien.....	78
3.3.2	Zelluläre Lokalisierung von MPP5 ^{V301N} in MDCK-Zellen.....	79
3.4	Die <i>Zonula occludens</i> in stabilen MPP5-MDCK-Zellen.....	81
3.4.1	Einfluss der V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Ausbildung der <i>Zonula occludens</i>	81
3.4.2	Einfluss der V301N-Mutation in der MPP5-PDZ-Domäne auf die Beschaffenheit der <i>Zonula occludens</i>	82
3.4.2.1	Messung des transepithelialen Widerstands.....	82
3.4.2.2	Analyse der molekularen Zusammensetzung.....	84
3.5	Einfluss der V301N-Mutation in der MPP5-PDZ-Domäne auf die Expression epithelialer Ionenkanäle	86
3.5.1	Analyse der α -, β - und γ -Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC).....	86
3.5.2	Analyse der basolateralen Na ⁺ /K ⁺ -ATPase.....	87
4	Generierung der MPP5-V301N-<i>knock-in</i>-Maus	90
4.1	Generierung des murinen MPP5-V301N- <i>knock-in</i> -Konstrukts	90
4.2	Transfektion und Überprüfung der embryonalen Stammzellen	92
4.3	Herstellung der Chimären	94
4.4	Cre-vermittelte Rekombination	95
4.5	Genotypisierung der MPP5-V301N- <i>knock-in</i> -Mäuse.....	96
VI	DISKUSSION	98
1	Analyse des MPP4-Multiproteinkomplexes	98
1.1	Identifizierung der PSD95- β -Isoform als Interaktionspartner von MPP4	98
1.2	Hsc70 und Recoverin als neue Mitglieder des MPP4-Multiproteinkomplexes.....	100
1.3	Interaktion von MPP4 mit dem Zytoskelett und integralen Membranproteinen	102
1.4	Schlussfolgerung.....	103
2	Untersuchungen zur Auswirkung einer Punktmutation in der PDZ -Domäne des MPP5-Proteins	104
2.1	Analyse der Protein-Protein-Interaktion von MPP5 ^{V301N}	104
2.2	Auswirkung der V301N-Mutation auf die MPP5-Lokalisierung in MDCK-Zellen.....	105
2.3	Einfluss von MPP5 ^{V301N} auf die Genexpression der MDCK-C7-Zellen.....	107
2.4	Hypothese für den Effekt des mutanten MPP5 in MDCK-C7-Zellen.....	110
2.5	Analyse der <i>Mpp5</i> ^{V301N} <i>knock-in</i> -Maus.....	111
VII	LITERATURVERZEICHNIS	114
VIII	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	125

IX	APPENDIX	127
1	Primerlisten	127
2	Spektren	131
X	PUBLIKATIONEN	133
1	1. Begutachtete Veröffentlichungen	133
2	2. Kongressbeiträge	133
XI	LEBENS LAUF	134

I ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungen waren das retinaspezifische palmitoylierte Membranprotein 4 (engl. *membrane palmitoylated protein 4*, MPP4) und das ubiquitär exprimierte MPP5, die beide zur großen Familie der Membran-assoziierten Guanylatkinasen (engl. *membrane-associated guanylate kinases*, MAGUKs) gehören. Beide Proteine haben wichtige organisatorische Funktionen als Adapterproteine in der Netzhaut.

MPP4 ist am Aufbau von präsynaptischen Proteinkomplexen in den Photorezeptor-Ribbonsynapsen beteiligt. Ein Fehlen von MPP4 in Mäusen führt zum Verlust von einigen präsynaptischen Proteinen von der Ribbonsynapse, was eine wichtige Rolle von MPP4 für die Organisation dieses Komplexes indiziert. Um neue Komponenten dieses Multiproteinkomplexes zu identifizieren, wurde in der vorliegenden Arbeit ein proteomischer Ansatz etabliert. Dazu wurde der MPP4-assoziierte Proteinkomplex aus Proteinextrakten der bovinen Retina durch Immunaffinitätschromatographie isoliert, mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt und resultierende Protein-*spots* massenspektrometrisch analysiert. Diese Untersuchungen identifizierten 18 kopräzipitierte Proteine. Darunter waren der bekannte Interaktionspartner Veli3 und das MAGUK-Protein PSD95. Für letzteres konnte gezeigt werden, dass speziell die β -Isoform von PSD95 mit MPP4 über die N-terminalen L27-Domänen heterodimerisiert. Daneben konnte die Assoziation von MPP4 mit Hsc70 und Recoverin durch unabhängige Bindungs-*assays* verifiziert werden, wobei diese Interaktionen indirekt waren und möglicherweise von retinaspezifischen Proteinen vermittelt werden. Diese Ergebnisse unterstützen die herausragende Rolle von MPP4 als Gerüstprotein für die Organisation eines Proteinkomplexes der Photorezeptorsynapse, der an der Regulierung der Ca^{2+} -Homöostase in den präsynaptischen Enden, sowie vermutlich auch an der Exozytose der synaptischen Vesikel beteiligt ist. Die übrigen kopräzipitierten Proteine waren Bestandteile des Zytoskeletts und verschiedener Signalwege und wahrscheinlich unspezifische Kontaminanten.

Das MPP5-Protein ist Teil eines evolutionär konservierten Proteinkomplexes, der für die Entstehung und Aufrechterhaltung der apikobasalen Polarität in Epithelzellen eine wichtige Rolle spielt und in der Netzhaut für die speziellen Zellverbindungen zwischen Müller-Gliazellen und

Photorezeptoren in der externen limitierenden Membran essentiell ist. Mutationen, die zu Störungen in der Funktion dieses Proteinkomplexes führen, verursachen retinale Defekte bei Mensch (z.B. Retinitis Pigmentosa, Lebersche kongenitale Amaurose), Maus, Zebrafisch und Fruchtfliege. Die PDZ-Domäne von MPP5 bindet an den C-Terminus der CRB-Proteine. In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung einer Punktmutation in der PDZ-Domäne von MPP5 (V301N), funktionell untersucht. Diese hat im Zebrafisch eine fehlende Photorezeptoradhäsion und die Zerstörung der retinalen Architektur zur Folge. Es wurde gezeigt, dass die V301N-Mutation die Interaktion zwischen MPP5 und den drei CRB-Isoformen verhindert. Außerdem führt sie zu einer Fehllokalisierung von heterolog exprimiertem MPP5^{V301N} in MDCK-Zellen, die zudem einen erhöhten transepithelialen Widerstand aufweisen. Über quantitative *real-time* PCR wurde in diesen Zellen eine verminderte Genexpression von Untereinheiten des apikalen epithelialen Natriumkanals ENaC und der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase festgestellt, was die Ursache für einen verminderten Ionenfluss durch die Zellschicht darstellen könnte. Somit übt heterolog exprimiertes MPP5^{V301N} in MDCK-Zellen einen dominanten Effekt aus, der möglicherweise über einen Einfluss auf die Genregulation bestimmter Proteine vermittelt wird. Zur Untersuchung welche Auswirkungen die MPP5^{V301N}-Mutation *in vivo* hat, wurde eine MPP5^{V301N}-*knock-in*-Mauslinie generiert. Die bisherige Charakterisierung der Mäuse zeigte bei heterozygoten Tieren keinen äußerlich erkennbaren Phänotyp, wohingegen homozygote Mäuse nicht lebensfähig waren. Vermutlich führt das Vorkommen beider mutanter Allele in frühen embryonalen Stadien zum Abstoßen der Embryos. Das Mausmodell bietet die Basis für weitere Untersuchungen über die molekularen Konsequenzen einer Expression von MPP5^{V301N} in der Netzhaut und anderen Geweben und wird Beiträge zur Aufklärung von Entstehungsmechanismen CRB1-MPP5-assoziierter Netzhauterkrankungen liefern.

II SUMMARY

The objects of the present study were the retina specific membrane palmitoylated protein 4 (MPP4) and the ubiquitous expressed MPP5 protein which belong to the large family of the membrane-associated guanylate kinase homologs (MAGUKs). Both proteins have important organizational functions as adaptor proteins in the retina.

MPP4 is involved in the assembly of presynaptic protein complexes in the photoreceptor synapses. The absence of MPP4 in mice leads to the loss of several presynaptic proteins from the ribbon synapse indicating an important role for MPP4 in organizing this complex. This work was aimed to identify new components of this multiprotein complex by establishing a proteomic approach. More precisely, the MPP4-associated protein complex was isolated with immunoaffinity chromatography from bovine retinal protein extracts followed by two-dimensional electrophoresis and analysis of the resulting protein spots by mass spectrometry. This analysis identified 18 co-precipitated proteins. Among these molecules the known interacting partner Veli3 and the MAGUK protein PSD95 were detected. For the latter, a selective association between MPP4 and the PSD95- β isoform was demonstrated showing specific heterodimerization of their N-terminal L27 domains. Additionally independent binding assays verified the association of MPP4 with recoverin and Hsc70. These interactions seem to be indirect and are presumably mediated by retina specific proteins *in vivo*. In summary, these findings support a protruding role for MPP4 as scaffolding protein for the organization of a protein complex of the photoreceptor synapses, which is involved in the regulation of Ca^{2+} homeostasis within the presynaptic terminals and eventually plays a role in synaptic vesicle exocytosis. The remaining co-precipitated proteins represented cytoskeletal constituents and components of different pathways and were probably unspecific contaminants.

The MPP5 protein, a member of the evolutionarily conserved CRB protein complex, plays an important role in establishing and maintaining the apicobasal polarity of epithelial cells. Furthermore, this complex is essential for specific cell junctions between Müller glia cells and photoreceptors in the outer limiting membrane of the retina. Mutations that disrupt the function of this protein complex were reported to cause retinal defects in human (e.g. retinitis pigmentosa,

Leber's congenital amaurosis), mouse, zebrafish and fruit fly. The PDZ domain of MPP5 binds to the C-terminus of the CRB proteins. The present study aimed to analyze the consequences of a point mutation within the PDZ domain of MPP5 (V301N). In zebrafish, this mutation resulted in the loss of photoreceptor adhesion and in the disruption of retinal layers. It was demonstrated that the V301N mutation prevents the interaction between MPP5 and the three CRB isoforms. Additionally, heterologously expressed MPP5^{V301N} mislocalizes in MDCK cells which furthermore develop an increased transepithelial resistance. Quantitative real-time PCR revealed decreased gene expression levels for subunits of the apical epithelial sodium channel (ENaC) and the basolateral Na⁺/K⁺-ATPase, supposedly causing the reduced ion movement through the cell layer. Thus, heterologously expressed MPP5^{V301N} apparently has a dominant effect in MDCK cells which might be mediated by an influence on the gene expression of other yet unknown proteins. To further elucidate the MPP5^{V301N} mutation *in vivo*, a knock in mouse line was generated. So far the characterization of these mice revealed no apparent phenotype for heterozygous animals, whereas homozygous mice were not viable. The presence of both mutant alleles presumably results in a rejection at early embryonic stages. The mouse model provides the basis to further analyze molecular consequences of MPP5^{V301N} expression in the retina and other tissues and will contribute to enlighten the development of CRB1-MPP5-associated retinal diseases.

III EINLEITUNG

1 DIE MAGUK-PROTEINE

1.1 Die Domänenstruktur der MAGUK-Proteine

1.1.1 Überblick über die Domänenstruktur

Die MAGUKs (engl. *membrane-associated guanylate kinase*) sind eine Familie von Gerüstproteinen. Alle Mitglieder der MAGUK-Familie sind durch eine charakteristische dreiteilige Kernstruktur gekennzeichnet. An ihrem N-terminalen Ende besitzen sie eine oder drei PDZ-Domänen, die nach ihrer Entdeckung in den drei MAGUK-Proteinen PSD95 (*Postsynaptic Density 95*), Dlg (*Drosophila Discs Large*) und ZO-1 (Zonula occludens-1) benannt sind. Die PDZ-Domäne repräsentiert die am besten charakterisierte Domäne der MAGUK-Proteine und wird weiter unten noch näher beschrieben.

An die PDZ-Domäne bzw. -Domänen schließt sich ein zentrales src-Homologie 3 (SH3)-Motiv an, auf das am C-Terminus eine Region folgt, die eine Homologie zu den Guanylatkinasen der Hefen und Säuger zeigt (GUK). Für die GUK-Domäne konnte jedoch bisher keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden (Anderson, 1996). SH3-Domänen binden typischerweise Polyprolinmotive (ProXXPro) (McGee *et al.*, 2001), jedoch bilden die der MAGUK-Proteine hierbei eine Ausnahme. Diese können nämlich mit den GUK-Domänen wechselwirken, obwohl diesen die Polyprolinsequenz fehlt (Funke *et al.*, 2005). Die Interaktion trotz fehlender Erkennungssequenz kann durch die Anwesenheit der HOOK-Sequenz zwischen SH3- und GUK-Domäne erklärt werden. Die HOOK-Sequenz stellt eine kurze basische Aminosäuresequenz dar, die bei einigen MAGUKs zusätzlich zur Kernstruktur auftritt (Hough *et al.*, 1997). Bei der Bindung von SH3- und GUK-Domäne bildet die HOOK-Sequenz einen Teil der Interaktionssequenz und ersetzt eine strukturell konservierte Helix, die normalerweise für die ProXXPro-Motiverkennung benötigt wird (McGee *et al.*, 2001). Die SH3-Domäne kann dabei in cis-Stellung mit der GUK-Domäne desselben Moleküls, oder in trans-Stellung mit einem anderen Molekül interagieren (Mayer, 2001).

Die tandemartig angeordneten L27-Domänen kommen ebenfalls nur in einigen Mitgliedern der MAGUK-Familie vor. Diese Domäne wurde nach ihrer Präsenz in zwei *Caenorhabditis elegans*-Proteinen benannt: dem MAGUK-Protein Lin-2 und dem PDZ-Protein Lin-7, die beide diese Region nahe ihrer N-Termini tragen (Doerks *et al.*, 2000). Biophysikalische Analysen haben gezeigt, dass isolierte L27-Motive ungefaltet vorliegen und erst durch die Heterodimerisierung eine helikale Struktur annehmen (Harris *et al.*, 2002). Sie stellen somit obligate Heterodimerisierungsmodule dar. Oligodimerisierungen zwischen L27-Modulen wurden für C-terminale (L27C) wie auch N-terminale L27-Motive (L27N) beschrieben (Kamberov *et al.*, 2000; Karnak *et al.*, 2002).

Eine weitere zusätzliche Domäne, die in MAGUK-Proteinen beobachtet wird, ist ein Ca^{2+} /Calmodulin (CaM)-Kinasehomolog mit einer Calmodulinbindestelle (Dimitratos *et al.*, 1999). Alle der hier beschriebenen konservierten Proteindomänen haben gemein, dass sie mit anderen Proteinen in Wechselwirkung treten können, weshalb sich mannigfaltige Interaktionsmöglichkeiten der MAGUK-Proteine ergeben (Dimitratos *et al.*, 1999).

1.1.2 Die PDZ-Domäne

Die PDZ-Domänen bestehen aus etwa 90 Aminosäurereste-langen Sequenzen und binden spezifisch an die C-Termini ihrer Zielproteine. Sie können aber auch mit einigen internen Peptidsequenzen, die in einer β -Haarnadel-Struktur gefaltet sind, interagieren (Hillier *et al.*, 1999), oder mit anderen PDZ-Domänen heterodimerisieren (Sheng and Sala, 2001). In Abbildung 1 ist die gut charakterisierte, dritte PDZ-Domäne von PSD95 als Bänderdiagramm mit einem Liganden exemplarisch dargestellt (Sheng and Sala, 2001).

Alle PDZ-Domänen besitzen einen ähnlichen Aufbau, der sich aus sechs antiparallelen β -Faltblättern und zwei α -Helices zusammensetzt. Die Peptidbindung findet in einer Grube an der Carboxylatbindeschleife zwischen dem β B-Faltblatt und der α B-Helix statt, wobei jede Domäne jeweils nur einen einzelnen Liganden binden kann. Die Architektur der Domäne erlaubt die Interaktion einer freien endständigen Carboxylgruppe eines Peptids.

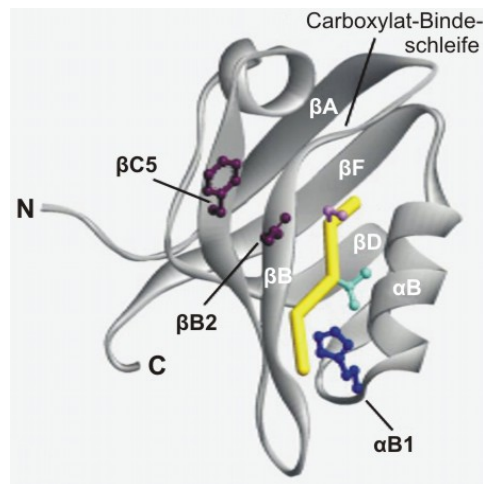


Abbildung 1: Bänderdiagramm einer PDZ-Domäne der Klasse I mit C-terminalem Peptidliganden. Beispielhafte Darstellung der dritten PDZ-Domäne von PSD95 (grau) komplexiert mit einem Liganden (Hauptkette in gelb). Der C-Terminus des Peptidliganden liegt in einer hydrophoben Tasche. Die Hydroxylgruppe des Restes an Position -2 (Threonin, hellblau) interagiert mit der Seitenkette von α B1 (Histidin, dunkelblau). Abbildung verändert nach Sheng and Sala (2001).

Dabei liegt die Seitenkette der endständigen Carboxylgruppe (Position 0) in einer hydrophoben Tasche, die von konservierten, über die ganze Primärsequenz der Domäne verteilten Aminosäureresten gebildet wird (Sheng and Sala, 2001). Innerhalb dieser Tasche bilden drei Protonen eines GLGF-Motivs Wasserstoffbrückenbindungen mit der terminalen Carboxylgruppe des Liganden, wobei ein hochkonserviertes Arginin oder Lysin über ein Wassermolekül mit dem Carboxylatanion interagiert (Doyle *et al.*, 1996).

Die Interaktion zwischen der Carboxylatbindeschleife und dem Carboxylatsauerstoff bildet somit die strukturelle Basis für die Erkennung von C-terminalen PDZ-Motiven. Generell zeigen PDZ-Domänen eine höhere Affinität für die Aminosäure an Position -2 des Liganden, weshalb diese auch als Grundlage für die Klassifizierung der PDZ-Spezifität verwendet wird (Sheng and Sala, 2001). Die Unterschiede der Spezifität für verschiedene Liganden sind nach dem heutigen Wissensstand vor allem auf Substitutionen der ersten Aminosäure der α B-Helix (α B1) zurückzuführen, die für die Bindung des Aminosäurerests an Position -2 verantwortlich ist. PDZ-Domänen der Klasse I besitzen ein Histidin an α B1 und binden spezifisch die C-terminale Sequenz X-S/T-X-V. PDZ-Domänen der Klasse II tragen eine hydrophobe Aminosäure (ϕ) an α B1 und binden X- ϕ -X- ϕ -Sequenzen. Ein Tyrosin an α B1 indiziert die Notwendigkeit einer negativ geladenen Aminosäure an Position -2 und charakterisiert Klasse III-PDZ-Domänen (Sheng and Sala, 2001).

1.1.3 Die Einteilung der MAGUK-Proteine in Subfamilien

Obwohl alle MAGUKs die gleiche Kernstruktur aufweisen, differieren sie doch in der Anzahl ihrer PDZ-Domänen und in der Verwendung von zusätzlichen Domänen. Dadurch lässt sich diese Proteinfamilie in vier Gruppen unterteilen (Dimitratos *et al.*, 1999) (Abb. 2).

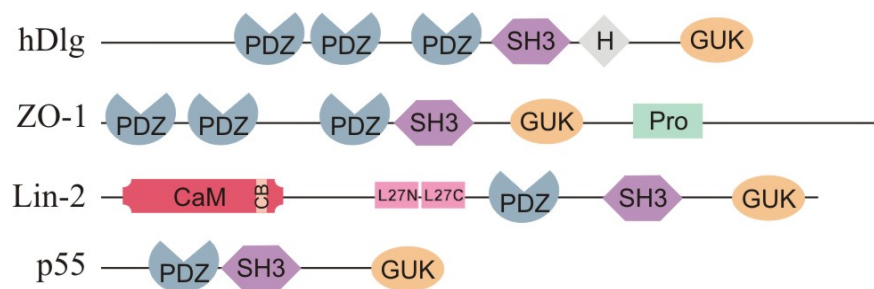


Abbildung 2: Schematische Darstellung repräsentativer Mitglieder der vier MAGUK-Subfamilien. PDZ: PSD95/Dlg/ZO-1, SH3: src-Homologie 3, H: HOOK, GUK: Guanylatkinase-homolog, Pro: Prolinreiche Region, CaM: Ca²⁺/Calmodulin-Kinasehomolog, CB: Calmodulin-Bindedomäne.

Man unterscheidet Dlg-, ZO-1-, Lin-2- und p55-ähnliche MAGUKs. Dlg-ähnliche MAGUKs sind nach dem *Discs large* Tumorsuppressor von *Drosophila* (Woods and Bryant, 1991) benannt, da diese drei PDZ-Domänen mit dem konservierten GLGF Motiv besitzen (Ponting *et al.*, 1997). Die ZO-1-ähnlichen MAGUKs zeichnen sich ebenfalls durch drei PDZ-Domänen aus, besitzen jedoch zusätzlich eine Prolinreiche Region am C-Terminus (Dimitratos *et al.*, 1999). Die Subfamilie der Lin-2-ähnlichen MAGUKs bilden Proteine ortholog zu dem Lin-2-Protein von *Chaenorhabditis elegans* mit einem N-Terminus ähnlich zur Ca²⁺/Calmodulin-Bindedomäne und anschließenden L27-Domänen. Die p55-ähnlichen MAGUKs, benannt nach dem palmitoylierten Erythrozytenprotein p55/MPP1 (engl. *membrane palmitoylated protein 1*) (Ruff *et al.*, 1991; Dimitratos *et al.*, 1999), besitzen variable N-Termini und eine einzige PDZ-Domäne. Diese Untergruppe zählt sieben Mitglieder (MPP1–7), die alle außer dem MPP1-Protein zwei zusätzliche N-terminale L27-Domänen aufweisen. Zwei Mitglieder der p55-ähnlichen MAGUKs, MPP4 und MPP5, spielen in der Retina eine wichtige Rolle und wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht.

2 DIE RETINA

2.1 Überblick über den Aufbau der Retina

Das menschliche Auge ist ein hochentwickeltes Sinnesorgan (Abb. 3). Äußerlich sichtbar sind die Iris, bedeckt von der Hornhaut (Cornea) und die Lederhaut (Sclera), die die schützende Wand des Auges bildet. Ein Schnitt durch das Auge zeigt drei Schichten, wobei Lederhaut und Hornhaut die externe Schicht darstellen. Die mittlere Schicht wird von Iris, Ziliarkörper (anterior) und Aderhaut (posterior) gebildet, während die Netzhaut (Retina) die innere Schicht, den sensorischen Teil des Auges ausmacht. Alle Vertebratenretinae bestehen aus drei Lagen Nervenzellkörper und zwei Schichten Synapsen. Die äußere Kernschicht (engl. *outer nuclear layer*, ONL) enthält die Zellkerne der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren, die innere Kernschicht (engl. *inner nuclear layer*, INL) die der Bipolar-, Horizontal- und amakrinen Zellen. In der Ganglienzellschicht (engl. *ganglion cell layer*, GCL) befinden sich die Kerne der Ganglienzellen und der verlagerten amakrinen Zellen.

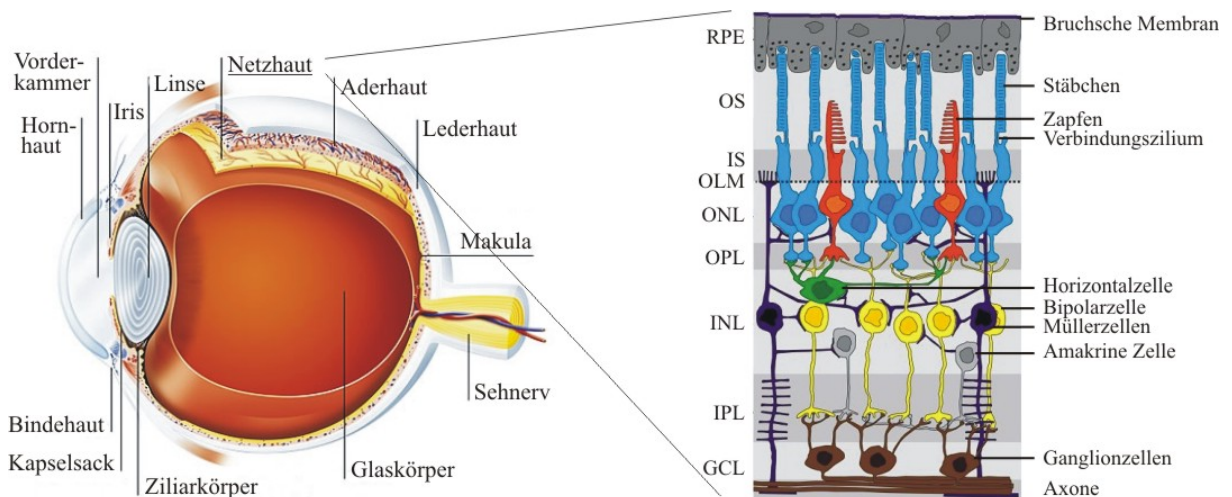


Abbildung 3: Diagramm des menschlichen Auges mit einer schematischen Abbildung der Netzhaut. Auf der linken Seite ist der Aufbau des menschlichen Auges als sagittaler Querschnitt dargestellt. Die rechte Seite zeigt die retinalen Schichten mit den verschiedenen Zelltypen. RPE, retinales Pigmentepithel; OS, äußere Photorezeptorsegmente (engl. *outer segments*); IS, innere Photorezeptorsegmente (engl. *inner segments*); OLM, äußere limitierende Membran (engl. *outer limiting membrane*); ONL, äußere Kernschicht (engl. *outer nuclear layer*); OPL, äußere plexiforme Schicht (engl. *outer plexiform layer*); INL, innere Kernschicht (engl. *inner nuclear layer*); IPL, innere plexiforme Schicht (engl. *inner plexiform layer*); GCL, Ganglienzellschicht (engl. *ganglion cell layer*); FL, Nervenfaserschicht (engl. *fiber layer*). (Verändert nach http://www.refraktiv.com/auge_und_fehlsichtigkeit/index.php und <http://commons.wikimedia.org/wiki/Image:Retina.jpg>)

Diese Lagen werden von zwei dazwischen liegenden Neuropilemen unterteilt, in denen die synaptischen Kontakte stattfinden. Die erste ist die äußere plexiforme Schicht (engl. *outer plexiform layer*, OPL), in der Verknüpfungen zwischen den Synapsen der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren mit vertikalen Bipolar- und Horizontalzellen erfolgen. In der inneren plexiformen Schicht (engl. *inner plexiform layer*, IPL), dem zweiten Neuropilem, interagieren Bipolar- mit Ganglienzellen, während zusätzlich verschiedene horizontal und vertikal ausgerichtete Amakrine über weitere Netzwerke die Ganglienzellsignale beeinflussen. Dazwischen liegen die Müllerzellen, die radialen Gliazellen der Retina. Die äußere limitierende Membran (engl. *outer limiting membrane*, OLM) der Retina wird von homo- und heterotypischen Verbindungen zwischen Müller-Gliazellen und den Innensegmenten der Photorezeptoren gebildet. Sie stellt eine semipermeable Diffusionsbarriere dar und begrenzt zusammen mit der Blut-Netzhautschanke des retinalen Pigmentepithels (RPE) den extrazellulären Raum um die Außensegmente der Photorezeptoren. Außerdem wird der OLM eine Rolle bei der adhäsionsvermittelnden Polarisierung und Orientierung der Photorezeptoren zugeschrieben (Kolb, 1991).

2.2 Die Ribbonsynapsen der Photorezeptoren

Die Synapsen der Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptoren stellen einen spezialisierten Typ der chemischen Synapsen dar und werden Ribbonsynapsen genannt. Diese sind imstande, Hochgeschwindigkeitssignale zu Neuronen zweiter Ordnung (bipolare und horizontale Zellen) in der OPL der Retina weiterzuleiten. Dabei wird die Absorption der Photonen durch das Sehpigment der Photorezeptoren zuerst in ein biochemisches und dann in ein elektrisches Signal übersetzt, das alle nachfolgenden Neuronen der Retina stimulieren kann.

Auf ultrastruktureller Ebene bilden die Ribbonsynapsen plattenartige Strukturen, die in die präsynaptische Endigung hineinragen und an einer elektronendichten Struktur an der Plasmamembran verankert sind. Hier befindet sich auch eine große Ansammlung synaptischer Vesikel, die über Filamente an die Ribbons gebunden sind. Eine wichtige Eigenschaft der Ribbonsynapse ist ihre Fähigkeit, Information über die Lichtintensität in einer tonischen und abgestuften Art weiterzuleiten. Dazu wird die kontinuierliche, Calcium-abhängige Exozytose der

Vesikel als Antwort auf die Licht-induzierte Veränderung des präsynaptischen Membranpotentials moduliert. Konventionelle chemische Synapsen verwenden dagegen einen Aktionspotential-gesteuerten, phasischen Neurotransmitterausstoß, um Signale weiterzuleiten. Der grundsätzliche Mechanismus, der dem synaptischen Vesikelzyklus unterliegt, ist dennoch zwischen den Ribbon- und den konventionellen Synapsen hochkonserviert, weshalb die meisten Proteine der konventionellen Synapsen auch in Ribbonsynapsen vorkommen (Lenzi and von Gersdorff, 2001). Die molekulare Anpassung an die spezifischen synaptischen Anforderungen der Ribbonsynapsen basiert anscheinend hauptsächlich auf der differentiellen Expression von Proteinisoformen (z.B. Complexine; Reim *et al.*, 2005) und auf der Anwesenheit weniger, einzigartiger Komponenten wie RIBEYE oder dem unc-119 Homolog (Higashide *et al.*, 1998; Schmitz *et al.*, 2000). Da das Wissen über die molekulare Architektur der Ribbonsynapse noch recht spärlich ist, stellt die weitere Aufklärung der Proteinzusammensetzung der präsynaptischen Endigungen und des dynamischen Zusammenspiels zwischen den Proteinen eine essentielle Voraussetzung für das Verständnis der Funktion der Ribbonsynapsen dar.

3 DAS PALMITOYLIERTE MEMBRANPROTEIN 4

3.1 Lokalisierung von MPP4 in der Retina

In den synaptischen Enden der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren lokalisiert das MPP4-Protein, das durch seine ausschließliche Expression in der Retina und der Zirbeldrüse eine einzigartige Stellung innerhalb der MAGUK-Familie einnimmt (Stöhr and Weber, 2001; Li *et al.*, 2003). Immunhistochemische Analysen mit Antikörpern gegen verschiedene antigene Regionen von MPP4 demonstrierten übereinstimmend eine deutliche Präsenz des Proteins in den Photorezeptorsynapsen (Li *et al.*, 2003; Stöhr *et al.*, 2003; Kantardzhieva *et al.*, 2005; Stöhr *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007) (Abb. 4). In der Immunelektronen-Mikroskopie von Maus-Photorezeptoren konnte das MPP4-Protein innerhalb der Ribbonsynapse entlang der präsynaptischen Plasmamembran, assoziiert mit Vesikeln, markiert werden (Kantardzhieva *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). Berichte über das Vorkommen von MPP4 an extrasynaptischen Bereichen der Photorezeptoren, wie dem Verbindungszilium (engl. *connecting cilium*, CC) (Stöhr *et al.*, 2003) (Abb. 4) und der OLM (Kantardzhieva *et al.*, 2005) werden jedoch kontrovers diskutiert. Denn sowohl die Herkunft des Gewebes, als auch der verwendete Antikörper haben

vermutlich einen Einfluss darauf, in welchen Strukturen MPP4 markiert wird. So konnten beispielsweise die inneren retinalen Schichten IPL und FL in Mausgewebe im Gegensatz zur Schweineretina nicht gefärbt werden (Abb. 4) (Stöhr *et al.*, 2005).

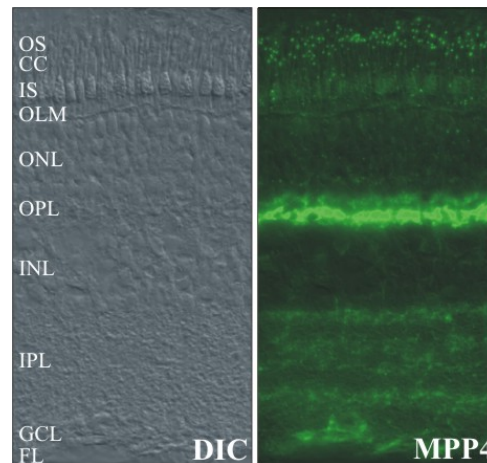


Abbildung 4: Lokalisierung von MPP4 in der Retina. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eines retinalen Kryoschnittes des Schweins zeigt eine starke Markierung des MPP4-Proteins in den synaptischen Strukturen der OPL, IPL und FL. Die Verbindungen zwischen den äußeren und inneren Segmenten der Photorezeptoren weisen eine punktierte Färbung an den Verbindungszilien (engl. *connecting cilium*, CC) auf. Die Aufnahme des differentiellen Interferenzkontrastes (engl. *differential interference contrast*, DIC) auf der linken Seite zeigt die verschiedenen retinalen Schichten. Abkürzungen siehe Abbildung 3. Verändert nach Stöhr *et al.* (2003)

Studien an MPP4-defizienten Mäusen zeigten den Verlust von einigen präsynaptischen Proteinen von der Ribbonsynapse. Darunter befanden sich PSD95, die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPasen (PMCAs) und Veli3 (engl. *Vertebrate lin-7 homolog 3*) (Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Das Veli3-Protein ist eines von drei Homologen des *C. elegans*-lin-7 (Butz *et al.*, 1998) und besitzt eine N-terminale L27- und eine C-terminale PDZ-Domäne. Als Adapterprotein wurde es in Proteinkomplexen der Epithelzellen (Perego *et al.*, 1999) und zusammen mit PSD95 in Neuronen (Jo *et al.*, 1999) gefunden, wo sie zur Zellpolarität, zur Bildung von Zellverbindungen und zur Signaltransduktion beitragen.

PMCAs sind für die Freisetzung des intrazellulären Calciums aus den Ribbonsynapsen zuständig, um den kontinuierlichen Einstrom von Calcium durch cGMP-abhängige Kationkanäle in die Photorezeptoren zu balancieren. Die bei den MPP4-defizienten Mäusen beobachtete Störung

der Ca^{2+} -Homöostase in den synaptischen Enden ist daher vermutlich auf die Fehllokalisierung der PMCA zurückzuführen. Der daraus resultierende, erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Level führte wiederum zu einer Veränderung der Expression anderer Ca^{2+} -Kanäle (SERCA2, IP_3RII) und dem Ca^{2+} -bindenden Protein Recoverin (Yang *et al.*, 2007). Die auf diesen Beobachtungen basierende Annahme, dass in MPP4-defizienten Photorezeptoren Ca^{2+} ungenügend entfernt wird, wird durch die vergrößerten synaptischen Ribbons und die abnormale synaptische Reizweiterleitung zusätzlich unterstützt (Yang *et al.*, 2007).

3.2 Teilprojekt 1: Identifizierung von MPP4-Interaktionspartnern

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass das MPP4-Protein in der Retina direkt mit Veli3 über L27-Heterodimerisierung interagiert (Stöhr *et al.*, 2005). Zusätzlich wurde PSD95 mit anti-MPP4-Antikörpern aus Mausretinalysat koimmunpräzipitiert (Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), was eine Assoziation zwischen diesen beiden Proteinen *in vivo* vermuten lässt. PSD95 wiederum bindet über seine PDZ-Domänen an die PMCA-Typ B-Isoform (DeMarco and Strehler, 2001). Zusammengefasst weist dies darauf hin, dass MPP4 Teil eines großen Multiproteinkomplexes ist, der aus Adaptern, Kanälen, Rezeptoren und anderen Proteinen der präsynaptischen Plasmamembran besteht, und essentiell für die normale Synapsenphysiologie ist. Darüber hinaus scheint das retinaspezifische MPP4 eine Schlüsselfunktion bei der Rekrutierung und dem Aufbau dieses Komplexes zu besitzen.

Frühere Bemühungen zur Identifizierung des MPP4-organisierten Proteinkomplexes basierten auf der direkten Analyse von Kandidateninteraktionspartnern. In dieser Arbeit wurde ein proteomischer Ansatz mittels Immunaffinitätschromatographie, zweidimensionaler Gelelektrophorese und Massenspektrometrie entwickelt, um neue Komponenten des Multiproteinkomplexes zu isolieren, die direkt oder indirekt mit dem MPP4-Protein in der Retina assoziiert sind.

4 DAS PALMITOYLIERTE MEMBRANPROTEIN 5

4.1 Die Polarität von Zellen und die Rolle von Gerüstproteinen

Der Aufbau und die Aufrechterhaltung der Zellpolarität in verschiedenen Organen sind für die Entwicklung von Invertebraten und Vertebraten ausschlaggebend. Klassische Zelltypen, für deren Funktion eine Polarisierung essentiell ist, sind beispielsweise Neurone und Epithelzellen. Die Asymmetrie der Neuronen manifestiert sich durch die Bildung präsynaptischer Axonendigungen und postsynaptischer Dendriten an gegenüberliegenden Bereichen der Zelle (Sheng, 2001). Epithelzellen sind entlang ihrer apikobasalen Achse polarisiert, wobei die apikale Oberfläche im Lumen oder im extrazellulären Raum liegt und die basolaterale Membran das Substrat und interne Kompartimente kontaktiert (Yeaman *et al.*, 1999). Die Polarisierung der Zellen hängt zum größten Teil von der asymmetrischen Verteilung von Multiproteinkomplexen ab, die verschiedene membranassoziierte Kompartimente innerhalb der Zelle räumlich und funktionell definieren (Yeaman *et al.*, 1999). Die apikalen und basolateralen Oberflächen polarisierter Zellen sind beispielsweise mit deutlich verschiedenen Populationen von Kanälen, Transportern und Pumpen ausgestattet. Diese Anisotropie ist Voraussetzung für den vektoriellen Stoff- und Flüssigkeitstransport. Die physiologische Beschaffenheit eines individuellen Epithelzelltyps wird dabei nicht nur durch die Anzahl der Transportproteine bestimmt, sondern auch wie diese Proteine zwischen den apikalen und basolateralen Bereichen des Plasmalemmas verteilt sind (Dimitratos *et al.*, 1999). Die Bildung von Proteinkomplexen bringt gezielt Proteine zusammen, die in dieselben Prozesse involviert sind, und unterstützt so ihre Interaktion, sichert die Effizienz und Spezifität ihrer Funktion, wie z.B. Adhäsion, Zellkommunikation oder Signaltransduktion. So werden beispielsweise die Kreuzreaktionen zwischen individuellen Transduktionswegen minimiert (Dimitratos *et al.*, 1999). Für die multimeren Komplexbildung besitzt die Zelle multivalente Gerüstproteine, wie die MAGUK-Proteine, die mit Hilfe ihrer konservierten Protein-bindenden Module eine Vielzahl von Molekülen selektiv organisieren können. Diese regulieren nicht nur die zelluläre Polarität, sondern nehmen auch am Aufbau der Zellverbindungen teil, indem sie Transmembranproteine mit dem Zytoskelett verknüpfen. Daher sind sie besonders an Bereichen der Zell-Zell-Kontakte konzentriert. Proteinnetzwerke höherer Ordnung können daneben auch durch homo- und heteromere Interaktionen zwischen den Gerüstproteinen entstehen (Dimitratos *et al.*, 1999).

4.2 Wichtige Proteinkomplexe in polarisierten Epithelzellen und Zellen der Retina

4.2.1 Übersicht über die Proteinkomplexe

Um die oben beschriebene Zellpolarität aufrechtzuerhalten, muss die laterale Diffusion der Membranproteine limitiert werden. Diese Barriere wird durch zelluläre Verbindungen gebildet. Zu diesen gehören z.B. die subapikale Region (SAR) und die Septumverbindungen (*Septate Junctions*) von *Drosophila melanogaster*, bei denen drei evolutionär konservierte Proteinkomplexe identifiziert wurden. Der erste besteht aus Crumbs (Crb) - Stardust (Sdt) - Discs-lost (Dlt), der zweite aus Par-3 (engl. *partitioning defective 3*) /Bazooka - aPKC (engl. *atypical protein kinase C*) - Par-6 und den dritten bilden die Proteine Scribble (Scr) - Disc-large (Dlg) - Lethal-giant-larvae (Lgl) (Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001). Die entsprechenden homologen Komplexe der Vertebraten CRB - MPP5 (bzw. PALS1, engl. *Protein associated with Lin-7*) - PATJ (engl. *Pals1-associated tight junction*) und PAR3 - aPCK - PAR-6 interagieren und lokalisieren gemeinsam an der *Zonula occludens* (bzw. engl. *Tight Junctions*, TJ) der Epithelzellen (Lemmers *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2002; Makarova *et al.*, 2003) (Abb. 5). Dabei bindet PAR-6 mit seiner PDZ-Domäne den N-Terminus von MPP5 und den C-Terminus von CRB (Hurd *et al.*, 2003; Lemmers *et al.*, 2004). Der dritte Komplex hScribble - hDlg - hLgl liegt an der *Zonula adhaerens* (ZA) (Abb. 5). Die *Zonula adhaerens* ist ein adhäsiver Gürtel der Epithelzellen, der die Zellen unterhalb der apikalen Oberfläche umringt und auf der Ca²⁺-abhängigen Bindung von Cadherin-Molekülen an angrenzende Zellen basiert (Knust and Bossinger, 2002). Die Zusammensetzungen dieser Verbindungen sind in *Drosophila* und Vertebraten bemerkenswert ähnlich.

4.2.2 Das CRB-Protein im Komplex mit MPP5 und PATJ

Das ursprünglich in *Drosophila* identifizierte *Crumbs*-Gen (Tepass *et al.*, 1990) wurde auch in vielen Spezies von Invertebraten bis hin zu den Säugern gefunden (Richard *et al.*, 2006b). In Mensch und Maus sind insgesamt drei Orthologe des *Crumbs*-Gens bekannt, die als *CRB1/Crb1*, *CRB2/Crb2* und *CRB3/Crb3* (entsprechend Mensch/Maus) bezeichnet werden. Von diesen wird *CRB1/Crb1* ausschließlich in Gehirn und Retina exprimiert (den Hollander *et al.*, 1999; den Hollander *et al.*, 2002), während *CRB2/Crb2* daneben auch in Niere, RPE/Choroid und in

geringen Mengen in Herz, Lunge und Plazenta vorkommt (van den Hurk *et al.*, 2005). *CRB3/Crb3* kommt dagegen ubiquitär in verschiedenen epithelialen Geweben, einschließlich der Retina vor (Makarova *et al.*, 2003). Bei allen CRB-Proteinen handelt es sich um Transmembranproteine, wobei CRB1 und CRB2 konservierte Domänenarchitekturen in der großen extra- und der kurzen intrazellulären Domäne aufweisen, während dem CRB3-Protein diese extrazelluläre Domäne fehlt (den Hollander *et al.*, 1999; Lemmers *et al.*, 2002; van den Hurk *et al.*, 2005). Im Zebrafisch wurden bisher fünf *Crumbs*-Orthologe identifiziert: *crb1*, *crb2a/ome*, *crb2b*, *crb3a* und *crb3b* (Omori and Malicki, 2006).

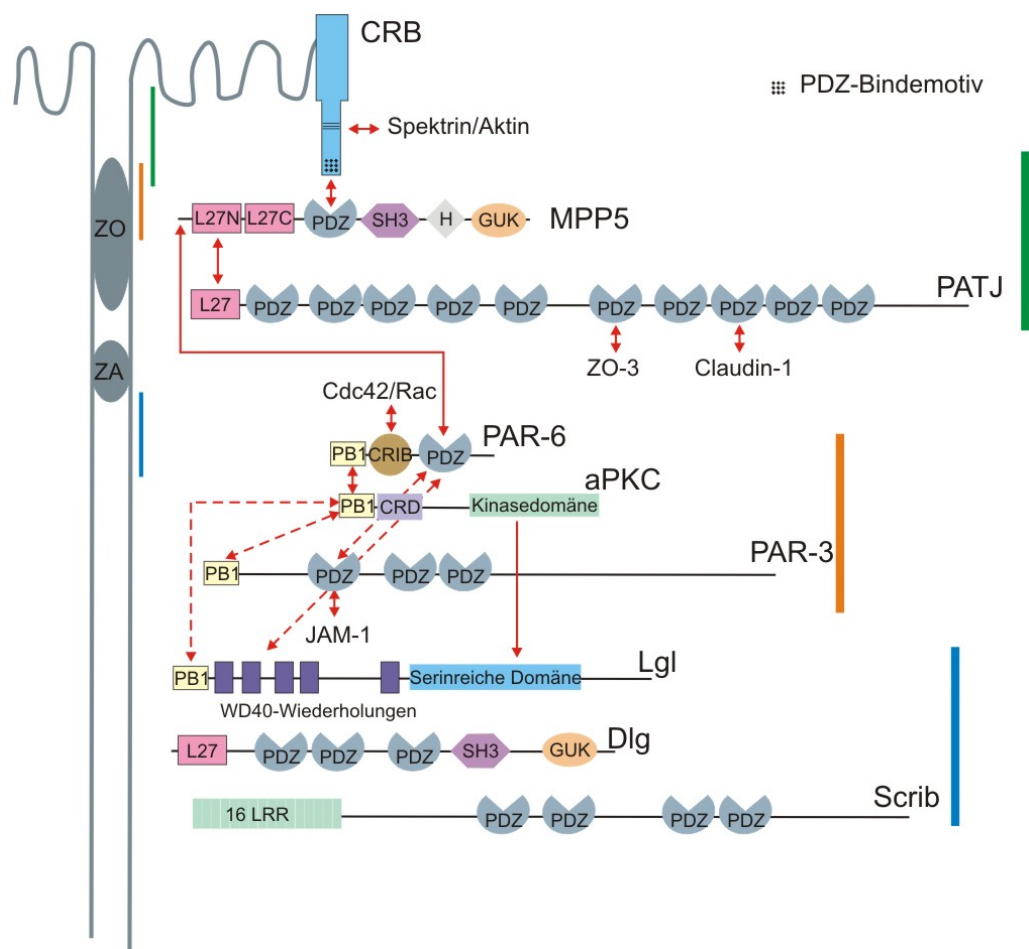


Abbildung 5: Schematische Darstellung der drei evolutionär konservierten Proteinkomplexe in Epithelzellen. Im apikalen Bereich der Zell-Zell-Kontakte von Epithelzellen, der *Zonula occludens*, liegt der Proteinkomplex CRB-MPP5-PATJ. Dabei bindet CRB über seine C-terminalen Aminosäuren ERLI an die PDZ-Domäne von MPP5, welches wiederum mit dem multi-PDZ-Protein PATJ über die N-terminalen L27-Motive heterodimerisiert. Durchgehende Pfeile kennzeichnen adhäsive Bindungen, gestrichelte Pfeile stehen für transiente Interaktionen. Die farbigen vertikalen Linien indizieren die Lokalisierung der Proteinkomplexe relativ zur *Zonula occludens*. JAM, engl. *junction adhesion molecule*; PB1, Phox und Bem1 Domäne; CRD, Cysteinreiche Domäne; CRIB, Cdc42/Rac interaktive Bindedomäne; LRR, Leucinreiche Wiederholung (engl. *leucin rich repeat*). Nach Schneeberger and Lynch (2004).

In Epithelzellen von Säugern wird die indirekte Interaktion zwischen CRB3 und PATJ über MPP5 als Adapter vermittelt (Roh *et al.*, 2002) (Abb. 5). Dabei stellt der C-Terminus von CRB3 mit den letzten vier konservierten Aminosäuren ERLI-COOH einen Liganden für die PDZ-Domäne von MPP5 dar. Diese Art der Bindung wird auch von CRB1 und CRB2 verwendet (Bhat *et al.*, 1999; Klebes and Knust, 2000; Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2003). PATJ ist ein Protein mit 10 PDZ-Domänen und besitzt ebenfalls ein L27-Motiv, über das es mit dem N-terminalen L27-Motiv von MPP5 heterodimerisieren kann (Lemmers *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2002; Roh and Margolis, 2003) (Abb. 5).

4.2.3 Die Lokalisierung des CRB-Komplexes in der Retina

In der Vertebratenretina lokalisiert der CRB-Komplex an der OLM (van de Pavert *et al.*, 2004). Die Zellverbindungen der OLM ähneln den ZA-Kontakten der Epithelzellen, die durch Adhäsionsmoleküle vermittelt werden und als Ansatzstelle für zytoskelettale Filamente dienen. Jedoch handelt es sich im Vergleich zu den Epithelzellen bei den OLM- Zellverbindungen nicht um eine *Zonula occludens* (Williams *et al.*, 1990). Auf zellulärer Ebene ist CRB1 hauptsächlich an der subapikalen Region in den Mikrovilli der Müller-Gliazellen und weniger in den Photorezeptoren lokalisiert (van Rossum *et al.*, 2006). Dagegen ist der Bindungspartner MPP5 in der OLM in beiden Zelltypen zu finden (Stöhr *et al.*, 2005; van Rossum *et al.*, 2006) (Abb. 6). Die Position des Crb-Komplexes im *Drosophila*-Komplexauge ist vergleichbar mit dem inneren Segment der Photorezeptoren. Hier liegt Crb an der Sebstabmembran, apikal zur ZA (Pellikka *et al.*, 2002).

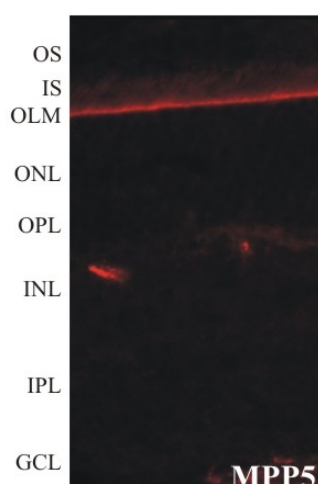


Abbildung 6: Lokalisierung von MPP5 in der Retina. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie eines murinen retinalen Kryoschnittes zeigt eine exklusive MPP5-Markierung in der OLM, Blutgefäße mit endogenen Maus-IgG-Antikörpern werden durch sekundäre anti-Maus-IgGs angefärbt. Aus Stöhr *et al.* (2005). Abkürzungen siehe Abbildung 3.

4.3 Defekte im CRB-Komplex

4.3.1 Mutationen im MPP5 des Zebrafisches führen zu retinalen Schäden

Mutationen oder der Verlust einer der Komponenten des CRB-Komplexes führen zu Defekten in der epithelialen Polarität oder der retinalen Morphogenese. Wei und Malicki (2002) identifizierten zwei unterschiedliche Mutationen im *Mpp5*-homologen Gen *nagie oko* (*nok*) des Zebrafisches, die beide schwere Fehler in der retinalen Architektur verursachten. Alle retinalen Zellklassen waren zwar in der mutanten Netzhaut vorhanden, aber an abnormalen Positionen lokalisiert, weshalb Nok ein Einfluss auf die Polarität des retinalen Neuroepithels zugeschrieben wurde (Wei and Malicki, 2002). Bei der *nok^{m520}*-Mutation führte ein Basenaustausch zu einem vorzeitigen Translationsstopp (R546X) innerhalb der Sequenz für die GUK-Domäne und somit zu einem verkürzten Protein, dem der größte Teil dieser Domäne fehlte. Bei der *nok^{m227}*-Mutante handelte es sich um eine Punktmutation in der PDZ-Domänensequenz, die in einem nicht konservativen Austausch der hydrophoben Aminosäure Isoleucin gegen die hydrophile Aminosäure Asparagin resultierte (I329N). Sequenzvergleiche mit anderen PDZ-Domänen verschiedenster Spezies zeigten, dass diese Position immer mit einer hydrophoben Aminosäure wie Isoleucin, Leucin oder Valin, jedoch niemals mit einer hydrophilen Aminosäure besetzt ist. Die konservierte Hydrophobizität dieser Position lässt einen Einfluss des Austausches auf die Funktion der PDZ-Domäne vermuten (Wei and Malicki, 2002). Bei beiden Mutationen wurde von einem kompletten oder fast-kompletten Funktionsverlust des Proteins ausgegangen, da sowohl die vollständige Unterdrückung der Nok-Expression durch anti-*nok*-Morpholino-Oligonukleotide, als auch heterozygote *nok^{m227}*-Tiere mit einer Deletion *trans* zum mutierten Allel, einen fast identischen Phänotyp verursachten (Wei and Malicki, 2002).

4.3.2 Weitere Tiermodelle für Crumbs und seine Komplexmitglieder

Zum besseren Verständnis für die Pathologie von Crumbs-Defekten wurden bereits verschiedene Mausmodelle untersucht. Eine gentechnisch hergestellte *Crb1 knock-out*-Maus (van de Pavert *et al.*, 2004) zeigte durch den kompletten Verlust von CRB1 einen relativ milden Defekt. Erst nach 3–9 Monaten entwickelten sich in der Retina lokale Läsionen, hervorgerufen durch den Kontaktverlust zwischen Photorezeptoren und Müller-Gliazellen. Außerdem kam es zum neuronalen Zelltod in der INL und ONL, sowie zum Verlust der OLM-Integrität in lokalen

Läsionen (van de Pavert *et al.*, 2004). Eine *knock-in*-Maus mit einer Aminosäuresubstitution (C249W) in der extrazellulären CRB1-Domäne repräsentiert eine *missense*-Mutation eines Retinitis Pigmentosa-Patienten (van de Pavert *et al.*, 2007). Der Verlust der Photorezeptoren fand vergleichsweise spät nach 8–12 Monaten statt. Sowohl der Aminosäureaustausch, als auch der *knock-out* waren mit der Herunterregulierung des *Pttg1*-Gens (engl. *pituitary tumor transforming gene 1*) assoziiert, das für ein mitotisches Kontrollprotein codiert. Daher wird vermutet, dass die extrazelluläre Domäne von CRB1 die *Pttg1*-Transkription beeinflusst, wobei die Regulation wohl indirekt vonstatten geht (van de Pavert *et al.*, 2007).

In dem spontan entstandenen Mausmodell *rd8* (engl. *retinal degeneration 8*) führte eine Basendeletion in *Crb1* zu einer Leserahmenverschiebung und damit zu einem verfrühten Stoppcodon (Mehalow *et al.*, 2003). Falls überhaupt vorhanden, fehlt diesem verkürzten CRB1-Protein die Transmembran- und zytoplasmatische Region, weshalb es vermutlich sezerniert wird. Da bereits nach zwei Wochen verkürzte innere und äußere Photorezeptorsegmente, eine diskontinuierliche und fragmentierte OLM und Pseudorosetten auftraten, handelt es sich hier eher um einen Entwicklungs- als um einen degenerativen Defekt (Mehalow *et al.*, 2003).

Damit ähnelt das *rd8*-Mausmodell den Befunden in *Drosophila*, wo der Verlust von *Crb* zu einer fragmentierten ZA und zu verkürzten Rhabdomeren und Sehstabmembranen, den funktionellen Äquivalenten der äußeren und inneren Segmente der Vertebratenphotorezeptoren, führte (Izaddoost *et al.*, 2002; Pellikka *et al.*, 2002). Durch die Untersuchungen verschiedener *crb*-Mutanten der Fliege konnten den unterschiedlichen Regionen des *Crb*-Proteins unabhängige Funktionen zugeordnet werden. Demzufolge ist der große, ins extrazelluläre Lumen ragende Teil des Proteins an der Modulation der Länge des Sehstabs beteiligt. Hingegen ist der kurze, intrazelluläre Abschnitt für die Integrität der ZAs, für die Spezifizierung der apikalen Membran, sowie für den Aufbau der Rhabdomermembranen zuständig (Izaddoost *et al.*, 2002; Pellikka *et al.*, 2002).

Der Verlust von *Sdt* hat in *Drosophila* vergleichbare Auswirkungen wie das Fehlen von *Crb* (Hong *et al.*, 2003). Ferner veranschaulichen die phänotypischen Folgen von Aminosäureveränderungen in *Dlt* dessen Bedeutung bei der Stabilisierung des *Crb*-Komplexes,

bei der Sehstab-Membran-Entwicklung als auch bei der Rhabdomeraufrechterhaltung während der späten Puppenstadien (Nam and Choi, 2003; Richard *et al.*, 2006a). Zusammenfassend kann geschlussfolgert werden, dass der gesamte Komplex unabdingbar für die *Drosophila* Augenintegrität ist (Bachmann *et al.*, 2001; Izaddoost *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002; Pellikka *et al.*, 2002).

4.3.3 Mutationen im humanen *CRB1*

Mutationen im humanen *CRB1*-Gen verursachen ein breites Spektrum an phänotypisch unterschiedlichen Netzhautdystrophien. Hierzu gehören autosomal-rezessive Formen wie Retinitis Pigmentosa (RP) mit gut erhaltenem (engl. *preserved*) para-arteriolarem RPE (PPRPE) (RP12), RP mit Coats-ähnlicher exsudativer Vaskulopathie und früh entstehende RP ohne PPRPE. Auch die Lebersche kongenitale Amaurose (engl. *Leber's congenital amaurosis*, LCA), die im Vergleich zu den oben genannten Erkrankungen einen schwerwiegenderen Verlauf zeigt und oft in den ersten Lebensjahren zur Blindheit führt, kann in 10–13 % der Fälle auf *CRB1*-Mutationen zurückgeführt werden (den Hollander *et al.*, 2001; den Hollander *et al.*, 2004). Zudem wurde eine dominant vererbte *CRB1*-Mutation als Ursache einer pigmentierten paravenösen chorioretinalen Atrophie (PPCRA) identifiziert (McKay *et al.*, 2005). Bisher sind 75 Mutationen im *CRB1*-Gen des Menschen bekannt (RP12: 16 x, RP: 18 x, LCA: 40 x, PPCRA: 1 x; *The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff*: <http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>). Dabei liegen die meisten Mutationen in der großen extrazellulären Domäne. Alle *nonsense*-Mutationen und Leserahmenverschiebungen resultieren voraussichtlich in Verkürzungen verschiedener extrazellulärer Bereiche und der Entfernung der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne (den Hollander *et al.*, 2004). Alternativ dazu könnten diese Mutationen, die verfrühte Stoppcodons nach sich ziehen, zu einem niedrigen Proteinexpressionlevel oder zu einem Abbau der mutanten mRNA durch *nonsense-mediated mRNA decay* führen (Frischmeyer and Dietz, 1999). Eine Leserasterverschiebung in Exon 12 hat dagegen sehr wahrscheinlich den Verlust des konservierten C-terminalen Bindungsmotivs für PDZ-Domänen (Gerber *et al.*, 2002; den Hollander *et al.*, 2004) und damit auch für MPP5 zur Folge.

4.3.4 Defekte im CRB-Komplex der Epithelzellen

In Säugerepithelzellen wurden ebenfalls viele Untersuchungen durchgeführt, die ergründen sollten, welche Rolle der an der *Zonula occludens* gelegene CRB-Komplex beim Aufbau und bei der Aufrechterhaltung der Polarität spielt. So führte z.B. die Überexpression von CRB3 in MDCK-Zellen, einer Epithelzelllinie der Niere, durch Mechanismen, die bisher wenig verstanden sind, zu Polaritäts-Defekten, sowie zu Verzögerungen der *Zonula occludens*-Bildung und der apikalen Morphogenese (Roh *et al.*, 2003; Lemmers *et al.*, 2004). Auch konnte durch die Überexpression von PATJ eine negative Regulation der *Zonula occludens*-Bildung gezeigt werden, die zur Fehllokalisierung von MPP5 und dem PAR-Komplex führt (Hurd *et al.*, 2003). Entsprechend führte auch der *knock-down* von PATJ bzw. MPP5 mittels siRNA zu Defekten der *Zonula occludens* und zu einer Störung der Polarität (Roh *et al.*, 2003; Shin *et al.*, 2005). Jedoch sind die exakten Funktionen der Proteine MPP5 und PATJ beim Aufbau der *Zonula occludens* und der epithelialen Homöostase noch relativ unbekannt.

4.4 Teilprojekt 2: Funktionelle Analyse einer Punktmutation in der MPP5-PDZ-Domäne

Als eines der stoffwechselaktivsten Gewebe hängt die Retina entscheidend von der zellulären Integrität und von der Aufrechterhaltung der Homöostase ab. Daher können sich kleinste Veränderungen des Gleichgewichts als schwerwiegende Störungen der Zellpolarität und Zellverbindungen manifestieren, was letztendlich zum Verlust der beteiligten Zellen, u.a. der Photorezeptoren, führen kann. Zur Aufklärung von Pathomechanismen wie den CRB1-abhängigen humanen Netzhautdystrophien ist es deshalb notwendig, die interagierenden Komponenten der makromolekularen Komplexe, ihre Wechselwirkungen und Signalwege zu identifizieren. In dieser Arbeit sollte daher gezielt die homologe *nok*²²⁷-Punktmutation aus der Arbeit von Wei und Malicki (2002) (siehe 4.3.1) in der PDZ-Domäne des MPP5 eingeführt (MPP5^{V301N}) und dessen Auswirkungen untersucht werden, um die Funktion dieses Proteins und seine Rolle innerhalb des Komplexes aufzuklären.

IV MATERIAL UND METHODEN

1 ZELLKULTUR

1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Zelllinien werden in einem Feuchtinkubator kultiviert, der für eine konstante Temperatur von 37 °C und einen CO₂-Gehalt von 5 % sorgt. Tabelle 1 stellt eine Auflistung aller Zelllinien mit zugehörigen Wachstumsmedien (PAA, Pasching, Österreich) dar. Alle Medien werden mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration 100 U/ml bzw. 0,1 mg/ml; PAA, Pasching, Österreich) versetzt. Zur dauerhaften Konservierung werden die Zellen mit Trypsin abgelöst, abzentrifugiert (5 min, 1000 g, RT) und in Wachstumsmedium mit 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Nach mind. 4 h bei -80 °C in einer Einfrierapparatur (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), das durch die Füllung mit Isopropanol für eine gleichmäßige Erniedrigung der Temperatur um 1 °C pro Minute sorgt, werden die Zellen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Tabelle 1: Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Wachstumsmedium	Information
293-EBNA	Invitrogen, Carlsbad, California, USA	DMEM, G418-Sulphat (500 µg/ml)	humane embryonale Nierenzellen, modifizierte HEK-293
COS-7	am Lehrstuhl vorhanden	DMEM	Fibroblasten-ähnliche Linie aus Affen-Nierenzellen
LLC-PK ₁	Prof. Dr. Ralph Witzgall, Lehrstuhl für Anatomie I, Universität Regensburg	DMEM	Epithel-ähnliche Linie aus Schweine-Nierenzellen
MDCK-C7	Prof. Dr. Michael Gekle, Physiologisches Institut, Universität Würzburg	MEM	epitheliale Hunde-Nierenzellen (distales Nephron)
MDCKII	Prof. Dr. Ralph Witzgall, Lehrstuhl für Anatomie I, Universität Regensburg	DMEM	epitheliale Hunde-Nierenzellen (proximales Nephron)
Weri-RB-1	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (Braunschweig, Deutschland)	RPMI 1640	humane Retinoblastoma-Zellen

1.2 Herstellung von Zelllysat

Für die Analyse von Proteinen aus eukaryotischen Zellen müssen diese zunächst durch eine Solubilisierung zugänglich gemacht werden. Für einen anschließenden Western-Blot kann dies durch 5-minütiges Aufkochen der Zellen mit Laemmli-Ladepuffer (0,0625 M Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau, pH 8,0) (Laemmli, 1970) bei 95 °C geschehen.

Sollen eine Immunpräzipitation oder ein *pull-down-assay* folgen, werden die Zellen aus der Kulturschale gelöst, abzentrifugiert (3 min, 1000 g, RT) und mit PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet in einem Lysepuffer [50 mM Tris pH 8, 120 mM NaCl, 1 % Triton X-100, „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, Basel, Schweiz)] aufgenommen und ½ h auf Eis gerührt. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung von hypotonischem Puffer [10 mM Tris pH 8, „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, Basel, Schweiz)], der die Zellen zum Anschwellen und Platzen bringt. Dies kann mechanisch durch das Durchpressen des Homogenisats durch eine enge Kanüle unterstützt werden. Durch die anschließende Zentrifugation (15 min, 16000 g, 4 °C) werden unlösliche Membranen pelletiert, woraufhin sich die zytoplasmatischen Proteine im Überstand befinden und für weitere Analysen verwendet werden können.

Bei der Analyse der Proteine der MDCK-C7- und MDCKII-Zellen, die einen Einfluss auf die Dichte der Zellen haben können, wurden die Zellen auf großen Filtereinsätzen aus Polyester mit einer Porendichte von 0,4 μm und einer Membranfläche von 4,67 cm^2 (Transwell® Permeable Support, Corning, NY, USA) ausgesät. Der Zellextrakt wurde mit Lysepuffer hergestellt.

1.3 Transfektion von eukaryotischen Zellen

1.3.1 Transiente Transfektion

Bei der Transfektion wird Fremd-DNA in Form von Plasmiden in eukaryotische Zellen eingebracht. Dies kann mit der Calcium-Phosphat-Präzipitation geschehen, bei der sich die DNA an ausgefallene Calcium-Phosphat-Kristalle bindet, die wiederum durch Endozytose von der Zelle aufgenommen werden. Hierfür werden für eine Zellkulturschale (\emptyset 10 cm) 2–10 μg

Plasmid-DNA in 372 μl ddH₂O mit 123 μl 1 M CaCl₂ gemischt. Dazu werden auf einem Vortexer unter langsamem Rütteln 495 μl 2 x BBS (50 mM N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure (BES), 280 mM NaCl, 1,9 mM Na₂HPO₄, pH 6,95) tropfenweise zugegeben. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird diese Lösung unter Schwenken der Kulturschale langsam zu den Zellen getropft, die etwa 50–80 % konfluent sein sollten.

Eine weitere Möglichkeit der Transfektion ist die Verwendung von kationischen Lipidvesikeln, bei der positiv geladene Liposomen an die negativ geladene Plasmid-DNA binden. Dieses Verfahren wird z.B. bei dem Reagenz „TransFectin™“ von Bio-Rad (Hercules, CA, USA) eingesetzt, das bei schwer transfizierbaren Zelllinien verwendet wird. Für eine Kulturschale (\varnothing 10 cm) werden 12–36 μg Plasmid-DNA, bzw. 40–60 μl TransFectin Reagenz in 1,5 ml Serum- und Antibiotika-freiem Medium verdünnt, kurz gevortext und beiden Lösungen zusammen gemischt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird das Gemisch unter Schwenken zugetropft.

1.3.2 Stabile Transfektion

Für eine dauerhafte, heterologe Expression von Proteinen bietet sich die Herstellung stabiler Linien an, besonders wenn die gewählte Zelllinie eine schlechte Transfektionseffizienz aufweist. Hierfür wird das gewünschte Gen in einen Expressionsvektor kloniert, der ein Gen für eine Antibiotikaresistenz besitzt, mit der Zellen, die das Plasmid ins Zellgenom eingebaut haben, selektiert werden können. Mit dem entsprechenden Antibiotikum wird zuvor getestet, bei welcher Konzentration alle Zellen nach etwa 5 Tagen abgestorben sind. Diese Menge wird später zur Selektion verwendet. Etwa 24 h nach der Transfektion werden die Zellen ca. 30 % konfluent ausgesät und nach Adhäsion der Zellen das Selektionsmedium zugegeben. Abgestorbene Zellen werden regelmäßig durch Mediumswechsel entfernt. Nach etwa 10 Tagen sind einzelne Zellkolonien sichtbar. Diese werden abgelöst und mittels Einzelzell-Verdünnung kloniert. Auswachsende Klone werden schrittweise auf größere Platten überführt und die Proteinexpression anschließend mit Immunzytochemie oder Western-Blot überprüft. Positive Klone können ohne Selektionsreagenz weiter kultiviert werden.

In dieser Arbeit wurde für die MDCK-C7-Zellen der pCEP4.1-Vektor mit C-terminal Rho-1D4-getagtem MPP5^{Wt} bzw. MPP5^{V301N} und Hygromycin B (100 µg/ml) als Selektionsmarker verwendet. Da die MDCKII-Zellen resistent gegen Hygromycin B waren, wurde für diese Zellen auf den pFLAG-CMV-4-Vektor ausgewichen und mit G418 (Geneticin, 500 µg/ml) selektioniert. MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} werden hier mit einem N-terminalen FLAG-*tag* exprimiert. Die MDCK-C7-Linien wurden zusätzlich noch mit pFLAG-CMV3-hCRB3 transfiziert und mit G418 (500 µg/ml) selektioniert. Von jeder Linie wurden anfangs zwischen 5 und 10 Klone hergestellt. Nach mehreren Passagen reduzierte sich diese Anzahl auf jeweils zwei Klone, die auch nach vielen Passagen ein unverändertes Wachstum sowie eine konstante, heterologe MPP5-Proteinexpression aufwiesen. Die beschriebenen Experimente wurden immer mit denselben Klonen durchgeführt.

1.4 Immunzytochemie

Um den Erfolg einer Transfektion zu überprüfen oder um die Lokalisierung von bestimmten Proteinen in Zellen zu bestimmen, kann eine Antikörperfärbung der Proteine durchgeführt werden. Dazu lässt man die Zellen in Kulturschalen, die ein oder mehrere Deckgläschen (ø 10 mm) enthalten, unter den üblichen Bedingungen wachsen (siehe III.1.1). Die Deckgläschen werden mit den darauf adhärenierten Zellen aus der Schale entnommen, z.B. 24 h nach der Transfektion, und in ein PBS-haltiges passendes Gefäß (12-*well*-Platte) überführt, wodurch das Zellkulturmedium abgewaschen wird. Zur Fixierung der Zellen auf dem Deckgläschen wird dieses für 10 min mit 4 % Paraformaldehyd (PFA; pH 7) inkubiert. Um unspezifische Bindungsstellen für Antikörper abzusättigen und die Zellwände für intrazelluläre Färbungen durchlässig zu machen, werden die Deckgläschen für eine halbe Stunde mit 10 % Ziegen Serum und 0,3 % Triton X-100 in PBS geblockt. Anschließend folgt die Zugabe des Primär-Antikörpers (Tabelle 2) in einer Lösung aus 2,5 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS für 1 h. Nach drei Waschschritten mit PBS für jeweils etwa 3 min wird der fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper „Alexa Fluor® 488“ oder „Alexa Fluor® 594“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer 1:1000 Verdünnung in 2,5 % Ziegen Serum und 0,1 % Triton X-100 in PBS zugegeben. Nach ½ h wird dreimal mit PBS gewaschen und optional die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

inkubiert. Diese Färbung kann zur späteren Orientierung der Zellen bei der mikroskopischen Auswertung dienen. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS werden die Deckgläschen mit den Zellen nach unten mit einem Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) auf einem Objektträger fixiert. Nach dem Trocknen der Präparate werden diese mit dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop2, Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

Tabelle 2: Antikörper

Bezeichnung	Anwendung: IZ, IH	Spezies	Verdünnung	Quelle
FLAG-M5	IZ	Maus, monoklonal	1 : 750	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hsc70 (Klon 1B5)	IH	Ratte, monoklonal	1 : 1000	Biomol / Stressgen, Hamburg
MPP4-3H10 (ZKÜ)	IZ, IH	Maus, monoklonal	unverdünnt	Stöhr <i>et al.</i> , 2005
MPP4-EP119	IZ	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000	Stöhr <i>et al.</i> , 2003
MPP5	IZ	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000	Stöhr <i>et al.</i> , 2005
Recoverin P26	IZ, IH	Kaninchen, polyklonal	1 : 5000 IZ 1 : 2000 IH	K.-W. Koch, Forschungszentrum Jülich, D
Rhodopsin-1D4	IZ	Maus, monoklonal	1 : 1000	(MacKenzie <i>et al.</i> , 1984)
Veli3 (ZMAL3)	IZ	Kaninchen, polyklonal	1 : 500	Zymed, San Francisco, CA, USA
ZO-1 (ZO1-1A12)	IZ	Maus, monoklonal	1 : 300	Zymed, San Francisco, CA, USA

(IZ = Immunzytochemie; IH = Immunhistochemie; ZKÜ = Zellkulturüberstand)

1.5 Messung des transepithelialen Widerstandes

Zur Messung des transepithelialen Widerstandes (engl. *transepithelial resistance*, TER) werden MDCK-Zellen in einer 12-*well* Platte auf Filtereinsätzen aus Polyester mit einer Porendichte von 0,4 μm und einer Membranfläche von 1,12 cm^2 (Transwell® Permeable Support, Corning, NY, USA) ausgesät (pro *well* 2×10^4 Zellen). Dadurch liegen in der Kulturschale zwei getrennte Kompartimente vor, die den Zellen die Ausbildung einer Polarität ermöglichen: ein apikales Kompartiment, in dem die Zellen in 0,5 ml Medium wachsen und ein basales Kompartiment mit 1,5 ml Medium (Abb. 7). Die Messung wird mit einem epithelialen Voltohmmeter EVOM™ und einer STX2-Elektrode (WPI, Stevenage, UK) durchgeführt. Vor jeder Messung lässt man die Platten etwa 20 min unter der Sterilbank von 37 °C auf Raumtemperatur abkühlen um eine Temperaturänderung während der Messung zu vermeiden, die die Messergebnisse verfälschen

würde. Die Messungen werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wird die in einer 150 mM NaCl-Lösung aufbewahrte STX2-Elektrode zu Beginn mit Ethanol gereinigt und mit steriler NaCl-Lösung abgespült. Ebenso wird die Elektrode nach jeder Messung abgewaschen, um Kontaminationen zwischen verschiedenen Zelllinien zu vermeiden. Die STX2-Elektrode besteht aus einem fest verbundenen Paar zweier Messfühler, die jeweils eine äußere und eine innere Elektrode besitzen (Abb. 7).

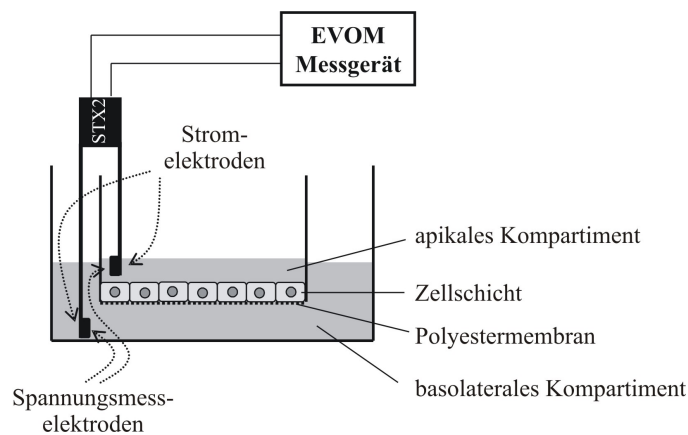


Abbildung 7: Schematische Darstellung zur Handhabung des Voltmeters. Die STX2-Elektrode wird so in das zu messende Gefäß gehalten, dass der längere Arm den Boden des Gefäßes berührt und der kürzere knapp über den Zellen positioniert ist.

Die äußeren Elektroden sind kleine Silberplättchen, die den Strom durch die Polyestermembran leiten. Die inneren Elektroden bestehen aus kleinen Silber/Silberchlorid (Ag/AgCl) Spannungssensoren. Die STX2-Elektrode wird über ein Kabel mit dem Ohmmeter verbunden, und so in das zu messende Gefäß gehalten, dass der längere Arm außerhalb des Filtereinsatzes den Plattenboden berührt und der kürzere innerhalb des Einsatzes über den Zellen (ohne Kontakt) positioniert ist (Abb. 7). Änderungen der Spannung über der epithelialen Zellschicht, induziert durch Stromimpulse von 20 μA , können direkt als Widerstand $R_{(\text{Zellen})}$ am Ohmmeter abgelesen werden. Als Leerwert wird ein Filtereinsatz ohne Zellen gemessen, dieser wird als Hintergrundwiderstand $R_{(\text{Leerwert})}$ abgezogen. Jedes *well* wird dreimal gemessen. Der transepitheliale Widerstand der Zellen, welcher unabhängig von der Fläche der Membran ist, wird mit folgender Formel berechnet:

$$(R_{(\text{Zellen})} - R_{(\text{Leerwert})})[\Omega] \cdot \text{Fläche} [\text{cm}^2] = \text{TER} [\Omega \cdot \text{cm}^2]$$

1.6 Calcium-*switch-assay*

Calcium ist notwendig zur Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Verbindungen von verschiedenen Zelltypen. In MDCK-Epithelzellen führt eine reduzierte extrazelluläre Calcium-Konzentration zur Auflösung der *Zonula occludens*. Durch Zugabe von Calcium wird die normale Barrierefunktion wieder hergestellt. Die Geschwindigkeit der Neubildung der *Zonula occludens* kann mit einem Calcium-*switch-assay* beobachtet werden. Dafür werden MDCK-Zellen in 3-cm-Schälchen mit fünf Deckgläschen sehr dicht ausgesät. Bei 100 %-iger Konfluenz der Zellen wird das Wachstumsmedium entfernt und die Zellen mehrmals mit PBS / 1 mM EDTA gewaschen. Anschließend werden 2,5 ml Calcium-freies Medium (Minimum Essential Medium Eagle, Spinner Modification, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) mit 10 % FCS pro Schälchen zugegeben. Das FCS wurde zuvor gegen PBS / 1 mM EDTA dialysiert, um ebenfalls Calcium zu entfernen, und anschließend steril filtriert. Nach etwa 16 h haben sich alle Zell-Zellverbindungen aufgelöst und das Calcium-freie Medium kann durch normales Wachstumsmedium ersetzt werden. Das erste Deckgläschen wird entnommen, unverzüglich für 10 min mit 4 % PFA fixiert und diese Zeit als Startzeit ($t = 0$) festgesetzt. Nach verschiedenen Zeitpunkten (z.B. 2, 6, 9, und 24 h) werden die anderen Deckgläschen entnommen und ebenfalls unverzüglich für 10 min mit 4 % PFA fixiert. Die Bildung der *Zonula occludens* wird durch die immunzytochemische Färbung des Markerproteins Zonula occludens-1 (ZO-1) sichtbar gemacht (siehe III.1.4 und Tabelle 2).

2 IMMUNHISTOCHEMIE

Die Herstellung von Kryoschnitten aus Retinagewebe der Maus und des Schweins erfolgte wie bei Janßen (2008) beschrieben. Aufgetaute Kryoschnitte werden für einige Minuten mit PBS rehydriert. Anschließend folgt eine Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Blocklösung (10 % Ziegen Serum, 0,3 % Triton X-100 in PBS) für 30 min bei RT. Danach werden die Schnitte mit der primären Antikörperlösung (2,5 % Ziegen Serum, 0,1 % Triton X-100 in PBS) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Verwendete Antikörper und die entsprechenden Verdünnungen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS folgt die Zugabe des sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörpers Alexa Fluor® 488, bzw. Alexa Fluor® 594 (1:1000) (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 1 h bei RT. Danach wird der Schnitt mit PBS gewaschen und die Zellkerne mit einer DAPI-Lösung (4',6-Diamidino-2-Phenylindol,

Molecular Probes, Leiden, Niederlande) für 10 min angefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS werden die Schnitte in Fluoreszenz-Einbettmedium (DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland) eingebettet und mit dem Axioskop2 Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

3 MOLEKULARGENETISCHE METHODEN

3.1 DNA-Extraktion

3.1.1 DNA-Extraktion aus Mausgewebe

Zur Genotypisierung von genetisch veränderten Mauslinien wird genomische DNA aus etwa 3 mm Schwanzspitze oder einem vergleichbar großem Stück von embryonalem Gewebe isoliert. Die Extraktion kann aus frischem Gewebe erfolgen, oder aus Proben, die in flüssigem Stickstoffschockgefroren und bei -80 °C gelagert wurden. Das Gewebe wird über Nacht in 500 µl Laird's Puffer (0,2 M NaCl, 0,1 M Tris pH 8,3, 5 mM Na₂EDTA pH 8) mit 0,8 % SDS und Proteinase K (Endkonzentration 0,4 mg/ml) bei 56 °C unter Schütteln verdaut. Durch Zentrifugation (10 min, 14000 g, RT) werden Zellreste und unlösliche Bestandteile pelletiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Durch die Zugabe von 1 Vol Isopropanol und anschließender Zentrifugation (10 min, 14000 g, RT) wird die DNA gefällt und pelletiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wird die DNA wenige Minuten getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

3.1.2 Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Um Plasmide aus transformierten *E. coli* Bakterien zu isolieren, werden je nach gewünschter DNA-Menge 3–5 ml Übernachtskultur für „Minipräparationen“ oder 100 ml für „Midipräparationen“ angesetzt. Hierfür wird LB-Medium (1 % Bacto Pepton, 0,5 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt + entsprechende Antibiotika) mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte (LB-Medium + 1,5 % Agar) angeimpft und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Bakterien werden pelletiert und die Plasmid-DNA unter Verwendung kommerzieller *Kit*-Systeme (NucleoSpin® Plasmid für „Minis“ und NucleoBond® Xtra Midi von Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) isoliert.

3.1.3 Isolierung von Hefe-DNA

Für die Isolierung von DNA aus Hefezellen wird eine Kolonie in 50 µl TE + 10 µl Lyticase-Lösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C werden 20 µl einer 10 %-igen SDS-Lösung zugegeben, für 1 min gevortext und über Nacht bei -20 °C eingefroren. Nach dem Auftauen werden 130 µl 1 x TE und 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zugegeben, gevortext und abzentrifugiert (10 min, 14000 g, RT). Die wässrige Phase wird abgenommen und mit 8 µl 10 M NaOAc und 500 µl 100 % Ethanol versetzt und mehrere Stunden bei -80 °C eingefroren. Durch Zentrifugation (10 min, 14000 g, RT) wird die DNA pelletiert und nach kurzer Trocknungszeit in 20 µl ddH₂O gelöst. Diese kann nun für PCR und anschließende Sequenzierung eingesetzt werden, um z.B. die Aufnahme eines Plasmids in die Zellen zu überprüfen.

3.2 Vervielfältigung von DNA-Fragmenten mittels Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) ermöglicht die Vervielfältigung (Amplifikation) von definierten DNA-Fragmenten. Die Spezifität der Amplifikationsreaktion wird durch die Sequenz der 20–30 bp langen Oligonukleotide (Primer) gewährleistet, die komplementär zu den flankierenden Bereichen der zu amplifizierenden Region sind. Es ist jedoch möglich, einzelne Basen innerhalb der Primer zu variieren, z.B. zur Einführung von Schnittstellen für eine Klonierung. Die Auswahl und Konzeption der Primer erfolgt mit dem frei zugänglichen Internet Programm „Primer3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>). Ein Standard PCR-Programm beinhaltet drei Schritte: die Denaturierung der DNA, die Anlagerung der Primer (engl. *annealing*) und die Verlängerung (Elongation). Als Matrize dient genomische DNA, cDNA oder Plasmid-DNA. Bei der Denaturierung wird die doppelsträngige DNA bei 94 °C aufgeschmolzen, dann folgt die Anlagerung der Primer an die komplementären Bereiche der einzelsträngigen DNA. Die *annealing*-Temperatur ergibt sich aus der Schmelztemperatur der Primer, die mit der in „Primer3“ implementierten Methode von Breslauer *et al.* berechnet werden kann (Breslauer *et al.*, 1986). Im letzten Schritt verlängert die thermostabile *Taq*-DNA-Polymerase die angelagerten Primer bei 72 °C, die einzelsträngige DNA dient hierbei als Matrize. Die Elongationstemperatur kann bei anderen Polymerasen variieren.

Die Elongationszeit richtet sich nach der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes, wobei für die selbst hergestellte *Taq*-DNA-Polymerase pro 1000 Basen etwa 1 min angesetzt werden kann. Diese 3 PCR-Schritte werden in etwa 30 Zyklen wiederholt, wobei noch ein initiales Aufkochen bei 94 °C für 3 min und eine abschließende Elongation bei 72 °C für 5 min hinzukommt. Falls unspezifische Nebenprodukte auftreten, empfiehlt sich eine so genannte *touch down*-PCR, bei der die *annealing*-Temperatur zunächst um 6 °C höher als das theoretische Optimum angesetzt wird. In den ersten 6 Zyklen verringert man die *annealing*-Temperatur um jeweils 1 °C, die übrigen werden mit der errechneten, optimalen *annealing*-Temperatur durchgeführt. Bei dieser Variante macht man sich die Tatsache zu nutze, dass Primer bei höheren Temperaturen spezifischer an die DNA binden.

Eine Standard-PCR wird in einem Volumen von 25 µl angesetzt. Bestandteile des Ansatzes sind 10 % 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris, 10 mM oder 15 mM MgCl₂, pH 8,3), 100 µM dNTPs (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), 0,4 µM flankierende Primer, ca. 100 ng DNA und 1 U selbst hergestellte *Taq*-DNA-Polymerase. Verwendete Primer sind im Appendix IX.1 angegeben.

3.3 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Entfernung von Verunreinigungen wie Puffer, Enzym und Primern aus dem PCR-Ansatz, oder zur Elution von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wird der NucleoSpin® Extract II von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet.

3.4 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten durch eine Agarosegelelektrophorese wird zur quantitativen und qualitativen Analyse eines PCR-Produktes, eines Restriktionsverdaus, einer Plasmidpräparation oder zur Aufreinigung eines DNA-Fragmentes verwendet. Abhängig von der Größe der zu erwartenden doppelsträngigen DNA-Fragmente werden Agarosegele mit einer Endkonzentration von 0,6 % – 2 % Agarose in 1x TBE (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2 mM Na₂EDTA) hergestellt. Dazu gibt man einen Tropfen einer 0,07 %-igen Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Gel. Die DNA wird mit 1/5 Vol Agaroseladepuffer (35 % Glycerin, 0,1 %

Bromphenol-, oder Xylencyanolblau) versetzt und bei 130–180 V für ca. 30 min aufgetrennt. Durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Die „1kb Plus DNA Ladder“ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wird zur Größenabschätzung verwendet.

Die Bandenintensität kann mittels Densitometrie von digitalen TIFF-Bildern mit dem TotalLab TL100 Programm (Version 2006, Nonlinear Dynamics Ltd., Newcastle upon Tyne, UK) gemessen werden.

3.5 Sequenzierung

Die Sequenzierung basiert auf der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.* (Sanger *et al.*, 1977).

3.5.1 Sequenzierung von PCR-Produkten

Je nach PCR-Produktmenge (Abschätzen auf Agarosegel) werden 0,5–3 µl des PCR-Ansatzes mit 0,1 µl Exonuklease I (20 U/µl, USB, Cleveland, OH, USA) und 0,25 µl Phosphatase (Antarctic Phosphatase, 5 U/µl, New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) in einem Gesamtvolumen von 5 µl für 15 min bei 37 °C inkubiert. Die Exonuklease verdaut hierbei einzelsträngige DNA, wie z.B. restliche Primer, wohingegen die Phosphatase freie 5'-Phosphatgruppen von übrig gebliebenen dNTPs abspaltet und somit für die Sequenzierreaktion unbrauchbar macht. Nach der Deaktivierung der Enzyme durch einen 15-minütigen Hitzeschritt bei 80 °C, gibt man 2 µl 5 x Sequenzierpuffer, 0,5 µl BigDye-Mix [enthält Desoxy-Nucleotidtriphosphate (dNTPs) und fluoreszenzmarkierte Didesoxy-Nucleotidtriphosphate (ddNTPs), DNA-Polymerase mit Aktivitätsmaximum bei 60 °C, (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)] und 0,4 µM Primer in einem Endvolumen von 10 µl dazu. Die Sequenzierreaktion läuft nach einem 5-minütigen Aufkochen bei 94 °C in 25 Zyklen ab, die sich wie folgt gliedern: 94 °C für 30 sec, 52 °C für 30 sec und 60 °C für 3 min. Abschließend folgen 5 min bei 60 °C. Der Ansatz wird mit 1/10 Vol 3 M NaOAc und 2,5 Vol Ethanol gefällt, mit 70 % Ethanol gewaschen und nach kurzer Trocknungszeit in 10 µl Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) aufgenommen. Die Analyse erfolgt in einem automatischen Kapillarsequenzierer (3130xl Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA). Die resultierenden Sequenzen werden mit dem Programm Chromas2.23 ausgewertet.

3.5.2 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Aufgereinigte Plasmid-DNA kann direkt zur Sequenzierung eingesetzt werden. Hierbei verwendet man 100–300 ng. Der Reaktionsansatz entspricht dem der Sequenzierung von PCR-Produkten (siehe III.3.5.1), die Sequenzierreaktion läuft nach einem 3-minütigen Aufkochen bei 96 °C in 25 Zyklen ab: nach 30 sec Denaturierung bei 96 °C folgen 2 min Elongation bei 60 °C. Zum Abschluss folgen 60 °C für 5 min. Das Fälen und die Analyse erfolgt analog zur Sequenzierung von PCR-Produkten.

3.6 Klonierung von Genen zur Expression in Bakterien und Säugerzellen

3.6.1 Klonierung von PCR Produkten

Zur Klonierung bestimmter DNA-Fragmente wird zunächst der gewünschte Bereich mittels PCR amplifiziert, die dabei verwendeten Primer enthalten Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (Appendix IX.1 Tab. 11). Wird bei der PCR die *Taq*-DNA-Polymerase verwendet, wird an die 3'-Enden der replizierten DNA-Moleküle ein überzähliges Adenin angehängt. Dieses kann verwendet werden, um das Fragment direkt in einen offenen Vektor mit Thymidin-Überhang zu ligieren (pGEM[®]-T, Promega, Mannheim, Deutschland). Dafür werden 3 µl PCR-Produkt, 1 µl pGEM-T-Vektor, 5 µl 2 x „Rapid Ligation Buffer“ und 1 µl T4-Ligase gemischt und für einige Stunden bzw. über Nacht bei 14 °C inkubiert. Bei der Verwendung von Polymerasen mit Korrektur (engl. *proofreading*)-Aktivität muss für diese Art der Klonierung nach der PCR ein Adenin angehängt werden. Hierzu inkubiert man 7 µl des PCR-Produkts mit 1 µl 2 mM dATP, 1 µl 10 x PCR-Puffer und 1 µl *Taq*-DNA-Polymerase für 30 min bei 72 °C. Anschließend folgt die Ligation in den Vektor. Dieser Ansatz wird in chemisch kompetente *E. coli* DH5 α transformiert (siehe III.3.7.1) und mittels PCR werden positive Klone ermittelt, d.h. Klone, die den Vektor samt eingeführtem DNA-Fragment (*insert*) enthalten. Dafür werden die Primer M13F und M13R (Appendix IX.1 Tab. 12) verwendet, die im Plasmid binden und das *insert* flankieren. Die Plasmide einiger positiver Klone werden in kleinem Maßstab isoliert (siehe III.3.1.2) und per Sequenzierung jeweils die komplette *insert*-Sequenz auf Fehler überprüft.

3.6.2 Umklonierung in Vektoren zur Expression in Bakterien und Säugerzellen

Unter Verwendung von Restriktionsenzymen (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) wird ein DNA Fragment aus dem pGEM-T-Vektor ausgeschnitten. In einem Reaktionsvolumen von 50 μl werden etwa 5–20 μg der überprüften Plasmid-DNA sowie der Expressionsvektor (Appendix IX.1 Tab. 12) mit 5 μl des entsprechenden 10 x Reaktionspuffers und 1–2 μl des Restriktionsenzym (20 U) für einige Stunden bei 37 °C verdaut. Eine gerichtete Klonierung erfolgt über die Verwendung zweier unterschiedlicher Enzyme. Wird nur ein Enzym verwendet, muss der Zielvektor mit 1 μl Phosphatase (Antarctic Phosphatase, New England Biolabs, 5 U/ μl) an der Schnittstelle dephosphoryliert werden, um eine Religation des Leervektors zu verhindern. Über ein Agarosegel werden verdaute DNA-Fragmente von Enzymen und Puffer gereinigt. Nach erneuter Ligation (siehe III.3.6.3) und Transformation (siehe III.3.7.1) erfolgt wiederum die Ermittlung positiver Klone, hier muss allerdings nur noch der Übergang von Vektor zu *insert* mittels Sequenzierung überprüft werden (Primer Appendix IX.1 Tab. 12).

3.6.3 Ligation

Die *T4*-DNA-Ligase verknüpft unter ATP-Verbrauch freie 3'-Hydroxylenden mit 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA. Ein Ligationsansatz hat ein Gesamtvolumen von 10 μl und setzt sich zusammen aus dem Klonierungsvektor und dem zu klonierenden DNA-Fragment, je nach Konzentration im Verhältnis 1:2 bis 1:5, der *T4*-DNA-Ligase (1 μl = 400 Units) und 1 x Ligationspuffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Dieser Ansatz wird für einige Stunden bzw. über Nacht bei 14 °C inkubiert.

3.6.4 Herstellung chemisch kompetenter DH5 α -Zellen von *E. coli*

600 ml LB-Medium werden mit 6 ml einer DH5 α -Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von $\text{OD}_{600} = 0,6$ bei 37 °C wachsen gelassen. Die Zellen werden kurz auf Eis abgekühlt und anschließend abzentrifugiert (10 min, 3000 g, 4 °C). Das Pellet wird in 180 ml eiskaltem Puffer 1 (30 mM KAc, 50 mM MnCl_2 , 100 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin) resuspendiert, 5–10 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (10 min, 2000 g, 4 °C) wiederum pelletiert. Nach dem Aufnehmen in 24 ml eiskaltem Puffer 2 (10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCl, 15 % Glycerin), werden die Zellen zu je 100 μl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.7 Transformation

3.7.1 Transformation in Bakterien

Transformation ist die Aufnahme freier, gelöster DNA durch eine kompetente Empfängerzelle. Ein 100- μ l-Aliquot der kompetenten DH5 α -Zellen wird auf Eis aufgetaut und der gesamte 10 μ l-Ligationsansatz dazu pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wird das Gemisch für 45 sec bei 42 °C inkubiert, 1 min auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 200 μ l SOC-Medium (20 g Bacto-Pepton, 5 g Hefe-Extrakt, 0,5 g NaCl, 10 ml 250 mM KCl, 20 ml 1 M Glucose) etwa 30–60 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Diese Suspension wird vollständig oder in unterschiedlichen Verdünnungen auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Plasmid-enhaltende Transformanten werden identifiziert, indem einzelne Klone in 20 μ l LB-Medium resuspendiert werden, wovon 2 μ l direkt als Matrize in einer PCR eingesetzt werden. Mit Primern, die flankierend zum eingeführten *insert* im Plasmid liegen, kann sowohl der Erfolg der Ligation als auch der Transformation überprüft werden (siehe Appendix IX.1 Tab. 12). Die Sequenz der Klone wird durch Plasmidsequenzierung überprüft (siehe III.3.5.2). Positive Klone können wie alle *E. coli* Bakterienstämme als Glycerinstock bei -80 °C aufbewahrt werden. Hierfür mischt man 830 μ l einer Übernachtskultur mit 170 μ l einer sterilen 85 %-igen Glycerinlösung und friert diese Mischung unverzüglich bei -80 °C ein.

3.7.2 Transformation in Hefezellen

Für eine 10 ml Übernachtskultur des Hefestammes AH109 wird eine Kolonie von einer YPDA-Glucose-Platte (2 % Difco Pepton, 1 % Hefe-Extrakt, 0,003 % Adenin-Hemisulfat, 2 % Glucose, 2 % Difco-Agar) in YPDA-Glucose-Medium angeimpft. Diese wird am nächsten Tag in 100 ml auf eine optischen Dichte von $OD_{600} = 0,08$ verdünnt und bei 30 °C inkubiert. Bei einer $OD_{600} = 0,7$ werden die Zellen abzentrifugiert (10 min, 2500 rpm, RT) und das Pellet mit 50 ml ddH₂O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wird das Pellet mit 20 ml LiOAc/TE/ddH₂O [1 : 1 : 8 aus 10 x LiOAc pH7,5, 10 x TE pH 7,5 (0,1 M Tris, 10 mM EDTA, pH 7,5)] gewaschen, zentrifugiert und in 1 ml LiOAc/TE/ddH₂O aufgenommen. Pro Ansatz werden 100 μ l dieser Hefesuspension mit 50 μ l Hering *carrier*-DNA (2 mg/ml), je 2 μ g Plasmid-DNA (pGBKT7 und pGADT7), 600 μ l LiOAc/TE/PEG (1 : 1 : 8 aus 50 % PEG) und 60 μ l DMSO vorsichtig mit der Pipette vermischt, dabei sind Luftblasen zu vermeiden. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 min bei 30 °C wird der Ansatz genau für 15 min auf 42 °C erwärmt.

Die Zellen werden zentrifugiert (2 min, 1600 rpm, RT), der Überstand abgesaugt und das Pellet in 200 µl 1 x TE aufgenommen. Diese Suspension wird auf SD/-LT-Platten (0,67 % Hefe-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren, 10 % -Leu/-Trp-*dropout*-Lösung, 2 % Glucose, 0,003 % Adenin-Hemisulfat, 2 % Agar, pH 5,8) ausplattiert, auf denen nur die Hefezellen wachsen können, die beide Plasmide aufgenommen haben.

3.8 Quantifizierung von DNA und RNA

Mit Hilfe eines Spektrophotometers (NanoDrop ND-1000 Technologies, Wilmington, USA) können die Konzentration, sowie die Reinheit von DNA- und RNA-Molekülen bestimmt werden. Vermessen werden jeweils 2 µl DNA-Lösung gegen Wasser als Referenz. Aus dem ermittelten Spektrum (220–750nm) wird neben dem Absorptionswert bei 260 nm (E_{260}) auch die Absorptionswerte bei 230 nm (E_{230}) und 280 nm (E_{280}) entnommen, um daraus die Quotienten E_{260}/E_{230} (Verunreinigung mit Kohlenhydraten) bzw. E_{260}/E_{280} (Verunreinigung mit Proteinen) zu errechnen. Beide Quotienten repräsentieren Maße für die Reinheit der DNA und sollten im Idealfall über 2,2 bzw. über 1,8 liegen (Marmur, 1961; Sambrook *et al.*, 1989).

3.9 Oligonukleotid-gesteuerte, zielgerichtete Mutagenese

Mit der zielgerichteten (engl. *site-directed*) Mutagenese ist es möglich, Punktmutationen in doppelsträngige Plasmid-DNA einzuführen. Die Oligonukleotidprimer enthalten die gewünschte Sequenzänderung, sind zueinander komplementär und etwa 30 Basen lang. Ungefähr in der Mitte der Primer liegt die Mutationsstelle, der Rest der Sequenz ist identisch zur Ausgangs-DNA. Die verwendete DNA-Polymerase „PfuUltra Hot Start Polymerase“ (Stratagene, La Jolla, CA, USA) besitzt *proofreading*-Aktivität. Ein Ansatz von 25 µl setzt sich aus 20 ng Plasmid-DNA, 1 x PfuUltra Puffer (Stratagene), 0,24 µM flankierende Primer, 100 µM dNTPs (Fermentas, Ontario, Kanada) und 2,5 U PfuUltra Hot Start Polymerase (Stratagene, La Jolla, CA, USA) zusammen. Nach einer 30-sekündigen Erhitzung auf 95 °C läuft die PCR in 18 Zyklen für jeweils 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 55 °C und pro kb des Plasmids 2 min bei 68 °C. Anschließend macht man sich die Tatsache zunutze, dass DNA von *E. coli*-Stämmen meist *dam*-methyliert vorliegt und damit von dem Restriktionsenzym *DpnI* abgebaut werden kann. Nach Beendigung

der PCR werden dazu 1 µl *DpnI* (20 U) und 3 µl zugehöriger Puffer zupipettiert, wodurch die methylierte, nicht mutierte Ausgangs-DNA abgebaut wird. Nach einer Inkubation für 2 h bei 37 °C wird der Ansatz in chemisch kompetente *DH5α-E.coli* transformiert (siehe III.3.7.1) und am nächsten Tag die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten isoliert und sequenziert.

3.10 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wird der „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Zellen, aus denen RNA für die quantitative *real-time*-PCR gewonnen wurde, wurden auf großen Filtereinsätzen aus Polycarbonat mit einer Porendichte von 0,4 µm und einer Membranfläche von 44 cm² (Transwell® Permeable Support, Corning, NY, USA) kultiviert. Die Zellen wurden geerntet, nachdem der transepitheliale Widerstand (siehe III.1.5) ein Plateau erreicht hatte.

3.11 cDNA-Synthese

Da isolierte RNA nicht direkt als Matrize in einer PCR eingesetzt werden kann, muss diese zunächst in einen komplementären DNA-Strang (engl. *complementary* DNA, cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wird der „SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit“ (Invitrogen Corporation, Carlsbad, California) verwendet. Dabei können 1 ng – 5 µg an totaler RNA eingesetzt werden. Ein Syntheseansatz mit 20 µl Endvolumen in RNase-freiem ddH₂O enthält die entsprechende Menge RNA, 1 µl Oligo-dT₁₂₋₁₈-Primer (500 µg/ml), 1 µl dNTPs (jeweils 10 mM), 4 µl 5x „First Strand Buffer“, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl „SuperScript™ II Reverse Transkriptase“ (200 U). Die Komponenten werden folgendermaßen zusammengegeben: die RNA wird mit dem Oligo-dT₁₂₋₁₈-Primer und den dNTPs mit RNase-freiem ddH₂O auf 12 µl aufgefüllt und für 15 min bei 65 °C erhitzt. Anschließend wird der Ansatz auf Eis gestellt und Puffer sowie DTT zugegeben. Nach 1 min bei 42 °C wird die Reverse Transkriptase dazu pipettiert. Die Reaktion läuft nun für 50 min bei 42 °C ab und wird mit einer Erhöhung der Temperatur für 10 min auf 70 °C abgestoppt. Die fertige cDNA kann bei -20 °C gelagert werden.

3.12 Quantitative *real-time*-PCR (qRT-PCR)

3.12.1 Prinzip

Bei der quantitativen *real-time*-PCR (qRT-PCR) mit dem TaqMan™-System (Applied Biosystem, Carlsbad, CA, USA) werden zusätzlich zu den intronüberspannenden Primern markierte Gensonden verwendet, so dass nur spezifische Amplifizierungsprodukte detektiert werden. Diese 8–9 Basen langen Oligonukleotide besitzen an ihrem 5'-Ende einen Fluoreszenz-Reporter-Farbstoff (FAM™) und am 3'-Ende einen nicht-fluoreszenten, so genannten dunklen *quencher*-Farbstoff. Dieser inhibiert die Fluoreszenz des Reporterfluorophors durch seine Nähe zu ihm, solange die Sonde intakt ist. Dies geschieht durch den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), bei dem ein Farbstoff nach Anregung durch einen Laser die Energie auf einen anderen überträgt und somit kein Licht emittiert. Während der PCR bindet die Sonde spezifisch zwischen den beiden Primern an die cDNA-Zielsequenz. Die Primer sollten aus kinetischen Gründen nicht weiter als 150 bp auseinander liegen.

Die bei der qRT-PCR eingesetzte, hitzestabile „AmpliTaq Gold“-DNA-Polymerase besitzt neben der Fähigkeit komplementäre DNA-Stränge zu synthetisieren, auch eine DNA-abbauende Aktivität (5'-3'-Exonuklease-Aktivität). Dadurch wird der Reporter-Farbstoff während der qRT-PCR von der Gensonde abgeschnitten, aus der Nähe des Quenchers entfernt, und kann nun seine Fluoreszenz emittieren. Die Fluoreszenz-Signale werden detektiert und quantifiziert. Je mehr Denaturierungen und Anlagerungen stattfinden, desto mehr Sonden können binden und desto mehr Licht kann detektiert werden.

3.12.2 Durchführung

Primer und Sonden werden mit dem „Universal ProbeLibrary Assay Design Center“ von Roche (<https://www.roche-applied-science.com>) ausgewählt (Tab. 3).

Zunächst werden alle Primer-Sonden-Kombinationen mit der cDNA der Kontrolle (MDCK-C7) in einer Verdünnungsreihe auf ihre Effizienz getestet. Hierfür wird die cDNA in den Konzentrationen 50 ng (20 ng/µl), 10 ng (4 ng/µl), 2 ng (0,8 ng/µl), 0,4 ng (0,16 ng/µl) und 0,08 ng (0,032 ng/µl) eingesetzt. Das Protokoll für einen typischen qRT-PCR Ansatz ist in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer und Sonden für die qRT-PCR

Gen	Sondennummer (Roche)	Primer (F/R)
ATPase (<i>ATP5B</i> , XM_531639)	#21	Cf_ATPase-qRT-F / Cf_ATPase-qRT-R
α-ENaC (<i>SCNN1A</i> , XM_534912)	#11	alpha-ENaC-qRT-F / alpha-ENaC-qRT-R
β-ENaC (<i>SCNN1B</i> , XM_547092)	#19	betaENaC-qRT-F2 / betaENaC-qRT-R2
γ-ENaC (<i>SCNN1G</i> , XM_547093)	#77	gamma-ENaC-qRT-F / gamma-ENaC-qRT-R
Na⁺/K⁺-ATPase α1 (<i>ATP1A1</i> , NM_001003306)	#5	Cf_Na-K-a1_qRT-F / Cf_Na-K-a1_qRT-R
Na⁺/K⁺-ATPase α3 (<i>ATP1A3</i> , XM_850193)	#97	Cf_Na-K-a3_qRT-F / Cf_Na-K-a3_qRT-R
Na⁺/K⁺-ATPase β1 (<i>ATP1B1</i> , NM_001003283)	#91	Cf_Na-K-b1_qRT-F / Cf_Na-K-b1_qRT-R

In Klammern sind die offiziellen Gen-Bezeichnungen, sowie die Zugriffsnummern der NCBI-Datenbank angegeben. Primersequenzen sind im Appendix IX.1 Tab. 14 angegeben.

Tabelle 4: Protokoll für einen qRT-PCR-Ansatz.

Komponenten	Mix für 1 Ansatz
TaqMan® Gene Expression Mastermix (2x) (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)	5 μ l
Primer F (10 μ M)	1 μ l
Primer R (10 μ M)	1 μ l
Sonde	0,125 μ l
nukleasefreies ddH ₂ O	0,375 μ l
cDNA	2,5 μ l
Gesamtvolumen	= 10 μl

Verwendet wurde der „2 x TaqMan Master Mix“ [AmpliTaq Gold® DNA Polymerase UP (Ultra Pure), Uracil-DNA Glycosylase, dTNPs mit dUTP, Passive Referenz 1 und optimierte Mix Komponenten].

Für jedes Primer-Sonden-Set und jede cDNA-Verdünnungsstufe werden Triplikate pipettiert. Als Negativkontrolle dient ddH₂O. Die 384 *well*-Platte wird mit selbstklebender Folie verschlossen, zentrifugiert (3 min, 400 g, RT) und anschließend in das „TaqMan 7900HT Fast Realtime PCR System“ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) gestellt. Dieses wird mit der SDS2.3-Software (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) programmiert und angesteuert. Nach einem 10-minütigen Hitzeschritt bei 95 °C, bei dem die DNA-Polymerase aktiviert wird, folgen in 40 Zyklen eine Denaturierung bei 95 °C für 15 sec und die Anlagerung und Verlängerung der Primer und Sonden bei 60 °C für 1 min.

Anhand der Ct-Werte (engl. *cycle threshold*; siehe III.3.12.3), die gegen den logarithmischen Wert der eingesetzten cDNA-Menge aufgetragen werden, wird eine Ausgleichsgerade ermittelt. Die Effizienz des Primer-Sonden-Sets errechnet sich mit der Formel $E = 10^{-1/\text{Steigung}-1}$, wobei die Steigung aus der Ableitung der Geradengleichung ermittelt wird. Idealerweise liegt der Wert bei 1 und bedeutet eine Effizienz von 100 %. Das Bestimmtheitsmaß R^2 gibt an, wie nah die einzelnen Messwerte an der Geraden liegen. Bei exakter Verdünnung und Pipettiergenauigkeit liegt der Wert bei 1. In Abbildung 8 ist der Effizienztest für das Adenosintriphosphatase Gen (*ATPB5*) als Beispiel angegeben, dass in den Experimenten als Referenz verwendet wird.

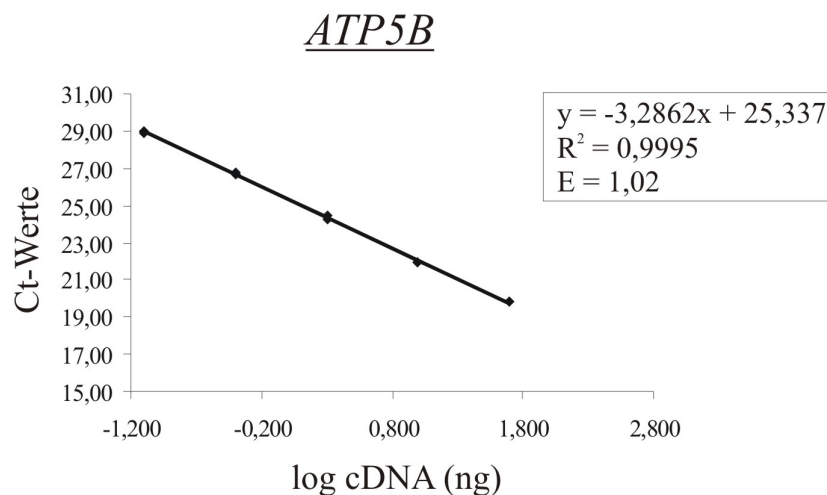


Abbildung 8: Ermittlung der Effizienz des Primer-Sonden-Sets für die qRT-PCR am Beispiel des Referenzgens der ATPase. Angegeben sind die Geradengleichung und das Bestimmtheitsmaß R^2 und die Effizienz E. Die cDNA-Menge ist logarithmisch auf der x-Achse angegeben, auf der y-Achse sind die Ct-Werte aufgetragen.

Wenn die Effizienztests für alle Primer-Sonden-Sets positiv ausfallen, kann der eigentliche qRT-PCR-Lauf durchgeführt werden. Ist die Effizienz zu gering, müssen weitere Primer und Sonden getestet werden. Als Referenzgen für die spätere Auswertung wird ein Haushaltsgen verwendet, das in allen zu testenden Proben einen niedrigen und möglichst den gleichen Ct-Wert erreicht. Für die qRT-PCR werden 50 ng (20 ng/ μ l) cDNA eingesetzt. Die Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes und die Bedingungen für den Lauf sind in Tabelle 4 angegeben. Für jede cDNA und jedes zu untersuchende Gen werden Triplikate, sowie ddH₂O als Negativkontrolle analysiert.

3.12.3 Auswertung

Die Ergebnisse werden mit der „ABI Sequence Detector“-Software (Version 2.2, Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) analysiert. Die Auswertung erfolgt nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit dem „RQ-Manager 1.2“. Das detektierte Licht-Emissionssignal des Farbstoffes wird von der Computer-Software analysiert und dabei als Amplifizierungsdiagramm dargestellt, wobei die Anzahl der qRT-PCR-Zyklen auf der X-Achse gegen die logarithmierten Fluoreszenzwerte auf der Y-Achse aufgetragen werden. Die Fluoreszenzwerte entsprechen der Intensität der abgestrahlten Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes bezogen auf eine passive Referenz. Aus jedem Diagramm wird ein Zyklus-Schwellenwert (engl. *cycle threshold*-Wert, Ct-Wert) errechnet. Der Ct-Wert ist der Wert, bei dem die Amplifikationszyklen erstmals einen statistisch signifikanten Anstieg aufweisen. Die Ct-Werte der einzelnen Proben werden mit entsprechenden Werten der endogenen Kontrolle, dem Haushaltsgen der ATPase, normalisiert. Dadurch kann für jedes Gen ein Diagramm erstellt werden, in dem die normalisierten Ct-Werte der einzelnen Proben nebeneinander angeordnet sind.

Die mRNA-Expression der Gene wird letztendlich relativ quantifiziert. Das bedeutet, dass der Wert der mRNA-Expression des Kalibrators (MDCK-C7) gleich 1 gesetzt wird und die Werte aller anderen Proben darauf bezogen werden. Die Berechnung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode wird folgendermaßen durchgeführt:

Berechnung $\Delta\Delta\text{Ct}$

Schritt 1: Mittelwertbildung der Ct-Werte identischer Replikate

Schritt 2: Normalisierung auf das Referenzgen ATPase

$$\text{Ct}_{\text{Zielgen-Probe}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen-Probe}} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}}$$

$$\text{Ct}_{\text{Zielgen-Kalibrator}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen-Kalibrator}} = \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

z.B. Zielgen = α -ENaC, Probe = MDCK-C7-MPP5^{Wt}, Kalibrator = MDCK-C7:

$$\text{Ct}_{\text{MDCK-C7-MPP5Wt: } \alpha\text{-ENaC}} - \text{Ct}_{\text{MDCK-C7-MPP5Wt: ATPase}} = \Delta\text{Ct}_{\text{Probe}}$$

$$\text{Ct}_{\text{MDCK-C7: } \alpha\text{-ENaC}} - \text{Ct}_{\text{MDCK-C7: ATPase}} = \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

Schritt 3: Normalisierung auf Kalibrator

$$\Delta\text{Ct}_{\text{Probe}} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}} = \Delta\Delta\text{Ct}$$

Schritt 4: Einsetzen der Werte in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Schritt 5: Plotten der relativen Quantifizierungsdaten in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel

4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

4.1 Proteinexpression in *E. coli*

Die pGEX-4T Vektoren (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) ermöglichen die Überproduktion von Proteinen durch die Induktion mit dem Laktoseanalogon IPTG (Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid). Die Proteinexpression basiert auf einem *T7*-Promotor-gesteuerten System, wobei der Promotor von einem *lac*-Operon kontrolliert wird. Das gewünschte DNA-Fragment wird 3' zur Glutathion-S-Transferase (GST) in deren Leserahmen kloniert, so dass das daraus resultierende Fusionsprotein N-terminal das GST-Protein trägt (*GST-tag*), über den es später über Affinitätschromatographie aufgereinigt werden kann. Der bevorzugte *E. coli* Stamm zur Überexpression ist der Protease-defiziente Stamm BL21, der zusätzlich für eine *T7*-RNA-Polymerase unter *lac*-Operon-Kontrolle kodiert, was die Expression und somit die Menge an rekombinantem Protein erhöht. Eine Testinduktion wird in 6 ml LB_{Amp}-Medium durchgeführt, das mit 0,3 ml Übernachtskultur angeimpft wird. Bei einer OD₆₀₀ = 0,5 werden 500 μ l Kultur zur späteren Gel-Analyse abgenommen und der Rest mit 0,3 mM IPTG induziert. Beide Ansätze (mit und ohne IPTG) werden für 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von dem induzierten Ansatz werden ebenfalls 500 μ l abgenommen und mit der nicht-induzierten Probe abzentrifugiert (3 min, 8000 g, RT). Die Pellets werden mit PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 x Laemmli-Ladepuffer aufgekocht. Ein Aliquot davon wird zur Analyse auf ein Polyacrylamid (PAA)-Gel aufgetragen.

4.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

Mit Hilfe der Affinitätschromatographie kann ein GST-Fusionsprotein über Sepharosekügelchen aufgereinigt werden, die mit dem Substrat der Glutathion-S-Transferase, dem Glutathion, beladen sind. Dafür wird die Expression des GST-Fusionsproteins in einer 100 ml Kultur induziert. Die Bakterien werden anschließend abzentrifugiert (15 min, 4000 g, 4 °C), mit PBS gewaschen und in 30 ml kaltem PBS mit 1 % Triton X-100 und Protease-Inhibitoren (PMSF 100 μ g/ml 1:100, Leupeptin 2 μ g/ml 1:1000) aufgenommen. Nach einer etwa 15-minütigen Inkubation auf Eis werden die Bakterien mit Hilfe der „FRENCH® Press“ (Thermo Spectronic, Needham Heights, MA, USA) aufgeschlossen. Die resultierende Suspension wird anschließend

zentrifugiert (30 min, 4000 g, 4 °C), um Zelltrümmer und unlösliche Proteine zu sedimentieren. Von dem Überstand mit den löslichen Fusionsproteinen wird ein Aliquot zur späteren Gelanalyse abgenommen und der Rest wird mit 250 µl Glutathion-Sepharosekügelchen über Nacht bei 4 °C rotierend inkubiert. Dabei bindet der GST-*tag* des Fusionsproteins an die Glutathion-Sepharose, ungebundene Proteine können nach der Zentrifugation mit dem Überstand entfernt werden. Nach mehrmaligem Waschen mit kaltem PBS + 0,1 % Triton X-100 können die an die Kügelchen gebundenen Fusionsproteine in TBS und 0,1 % NaN₃ bei 4 °C aufbewahrt werden. Zur Elution des Fusionsproteins, werden die Sepharosekügelchen mit einem Glutathionhaltigen Puffer (35 mM reduziertes L-Glutathion, 50 mM Tris, pH 8,5) gewaschen. Dabei kompetitiert das Glutathion mit den Sepharosekügelchen um die Bindung an das GST und verdrängt sie schließlich vollständig. Durch Dialyse kann das Fusionsprotein anschließend umgepuffert werden.

4.3 Herstellung einer Immunaффinitätsmatrix

4.3.1 Dialyse der Antikörper

Für eine Immunaффinitätschromatographie im großen Maßstab werden Antikörper benötigt, die an Sepharose immobilisiert werden. Hierfür werden zunächst 16 mg eines hoch aufgereinigten Antikörpers gegen 0,02 M Natriumtetraborat mit dreimaligem Pufferwechsel dialysiert (Standard RC Dialysemembran Spectra/Por 7, Porengröße: 50 kDa, Spectrum Laboratories, Rancho Dominguez, CA, USA), wobei der letzte Dialyseschritt über Nacht erfolgt.

4.3.2 Aktivierung der Sepharose mit Cyanogenbromid

Von der Sepharose 2B (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) werden 9,6 ml in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben, was etwa 8 ml reinen Sepharosekügelchen entspricht. Diese werden dreimal mit ddH₂O gewaschen und dazwischen abzentrifugiert (5 min, 500 g, RT). Zusammen mit 8 ml ddH₂O wird die Sepharose in ein 50 ml-Becherglas umgefüllt und der pH-Wert mit 0,2 M NaOH auf 10–11 eingestellt. Das bei 4 °C gelagerte Cyanogenbromid (CNBr, Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) wird vor dem Abwiegen auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Aktivierung der Sepharose werden 0,15 g benötigt. Da CNBr jedoch hygrophile Eigenschaften besitzt und während des Wiegens Feuchtigkeit aufnimmt, wird etwas mehr (ca.

0,18 g) unter dem Abzug abgewogen. Während sich das CNBr in der Sepharosesuspension auflöst, muss der pH-Wert konstant zwischen 10 und 11 gehalten werden, was etwa 30–40 min dauert. Nach der Zugabe von 20 ml kaltem 0,02 M Natriumtetraborat wird die Suspension abzentrifugiert (5 min, 500 g, RT), dreimal mit 0,02 M Natriumtetraborat gewaschen, in 15 ml 0,02 M Natriumtetraborat aufgenommen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach zwei weiteren Waschschritten, 5-minütiger Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation kann die aktivierte Sepharose zur Antikörperkopplung verwendet werden.

4.3.3 Antikörperkopplung

Die dialysierten Antikörper werden mit 0,02 M Natriumtetraborat auf 8 ml aufgefüllt und zu 8 ml aktivierter Sepharose gegeben. Während der vierstündigen Rotation bei 4 °C binden die Antikörper kovalent an die Sepharosekügelchen, was über eine Abnahme der OD_{280} verfolgt werden kann, wobei eine OD_{280} von 1 etwa 0,8 mg/ml Immunglobulinen (IgG) entspricht. Die Sepharose wird anschließend abzentrifugiert. Durch die Zugabe von 0,05 M Glycin in TBS (20 mM Tris-HCl pH 8, 0,15 M NaCl) und erneuter Zentrifugation werden alle ungebundenen Antikörper und der Kopplungspuffer entfernt. Dieser Schritt wird zweimal durchgeführt wobei nach der letzten Durchführung eine 30-minütige Inkubation auf dem Rotierer folgt. Zur Konservierung der Antikörpersepharose wird mit 0,01 % NaN_3 in TBS gewaschen, zweimal mit jeweils 15-minütiger Inkubation und einmal bei 4 °C über Nacht. Die Antikörpersepharose kann nun bei 4 °C aufbewahrt werden.

4.4 Solubilisierung von Proteinen aus Geweben

In dieser Arbeit wurde bovines Gewebe verwendet (gespendet von der Metzgerei Hollerbach GmbH Fleischwarenbetrieb, Rimpar). Retina, die aus frischen Rinderaugen präpariert wird, und Lungenstücke werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Das Gewebe wird in einer 10 mM Tris-Lösung pH 7,4 mit „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ (Roche, Basel, Schweiz) auf Eis aufgetaut und mit einem Dispergiergerät (ULTRA-TURRAX T-25, IKA® Werke, Staufen, Deutschland) etwa 1 min auf Eis homogenisiert. Durch Zentrifugation werden die groben Bestandteile und Zelltrümmer pelletiert (5 min, 1000 g, 4 °C) und der Überstand abgenommen. Das Pellet (P1) wieder in Tris-Puffer resuspendiert, erneut homogenisiert und abzentrifugiert. Der entstandene Überstand wird mit dem bereits

gewonnenen vereinigt (S1) und in der Ultrazentrifuge (Beckman, Rotor TLA-100) abzentrifugiert (10 min, 100 000 g, 4 °C). Dabei werden die Zellmembranen und unlöslichen Bestandteile pelletiert, wohingegen sich die zytoplasmatischen Proteine im Überstand befinden. Das Pellet (P2) wird nochmals mit Tris-Puffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und die Überstände vereinigt (S2). Um membrangebundene Proteine zu erhalten, wird das Pellet P2 mit Detergenzien, z.B. 1 % Triton X-100, 1 % SDS oder 1 % Desoxycholat (DOC) 30 min auf Eis oder bei RT gerührt und anschließend in der Ultrazentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand (S3) von SDS oder DOC solubilisierten Proteinen wird durch die Zugabe des fünffachen Volumens einer Triton X-100-Lösung (1 %) verdünnt.

4.5 Koimmunpräzipitation

4.5.1 Koimmunpräzipitation für die zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese

Bei der Koimmunpräzipitation für eine anschließende 2D-Gelelektrophorese werden mit Hilfe von CNBr-gekoppelten Antikörpern (siehe III.4.3) Proteine und daran gebundene Interaktionspartner aus einem Gewebelysat (siehe III.4.4) gewonnen. Dafür werden 300 µl der CNBr-gekoppelten Antikörper-Sepharose (= 600 µg Antikörper), die zuvor mit dem Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,4) äquilibriert wird, für mindestens 4 h oder über Nacht bei 4 °C mit dem Lysat aus 2 g Gewebe inkubiert. Danach werden die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen abzentrifugiert (5 min, 500 g, RT). Durch mehrmaliges Waschen mit dem Lysepuffer werden ungebundene Proteine entfernt, dabei kann die Waschstringenz durch die Anzahl der Wiederholungen verändert werden. Zur Elution der gebundenen Proteine verwendet man 0,1 M Glycin pH 2,5 (Elution durch pH-Wechsel). Sechs aufeinander folgende Eluat-Fractionen werden vereinigt und mit 20 % Trichloressigsäure (Endkonzentration) bei -20 °C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation (30 min, 16000 g, 4 °C) wird das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, erneut zentrifugiert und luftgetrocknet.

4.5.2 Koimmunpräzipitation im kleinen Maßstab

Für die Koimmunpräzipitation im kleinen Maßstab werden Antikörper an Protein A- oder Protein G-Sepharose immobilisiert. Welche Sepharose benutzt wird, richtet sich nach der Art des verwendeten Antikörpers. Das entsprechende Lysat aus Zellen oder Gewebe (siehe III.1.2 und

III.4.4) wird mit 2 µg des Antikörpers für mindestens 4 h bei 4 °C auf einem Rotierer inkubiert. Anschließend gibt man 5 µl der Sepharosekügelchen zu. Die Inkubation der Sepharose mit dem Antikörper-Lysat-Gemisch erfolgt wiederum bei 4 °C für mindestens 4 h oder über Nacht unter Rotation. Danach werden die Sepharosekügelchen mit den gebundenen Proteinen abzentrifugiert (5 min, 500 g, RT). Durch mehrmaliges Waschen mit Waschpuffer werden ungebundene Proteine entfernt, hierbei verwendet man für Zellysate den Lysepuffer (siehe III.1.2) mit 0,1 % Triton X-100 und für Gewebelysat 10 mM Tris (pH 7,4). Zur Elution der gebundenen Proteine wird die Suspension nach Zugabe von Laemmli-Ladepuffer für 5 min bei 95 °C aufgeköcht (Elution durch Denaturierung). Die Proben können anschließend mittels Western-Blot analysiert werden.

4.6 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wässriger Lösungen erfolgte mit dem „Roti-Quant“-Reagenz (Roth) nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dieser Methode liegt zugrunde, dass der in der Bradford-Lösung (Roti-Quant, Roth, Karlsruhe, Deutschland) enthaltene Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G250 mit Proteinen bei niedrigen pH-Werten Komplexe bildet, deren Absorptionsmaximum bei 595 nm liegt. Zur Erstellung einer Eichgerade werden verschiedene Konzentrationen von bovinem Serumalbumin (BSA) (1, 2, 4, 8, 16 µg) in 800 µl ddH₂O gelöst und mit 5 µl des Probenpuffers, in dem die zu messenden Proteine vorliegen versetzt. Analog werden 5 µl der Proteinprobe und 5 µl des Probenpuffers (Referenzwert) verdünnt. Nach Zugabe von 200 µl Bradford-Lösung wird der Ansatz gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption der Proben wird in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

4.7 GST-pulldown-assay

Der GST-pulldown-assay ist eine Methode um die physikalische Interaktion zwischen zwei oder mehreren Proteinen *in vitro* nachzuweisen. Benötigt wird hierfür GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose gekoppelt (siehe III.4.2). Dieses wird bei 4 °C für mindestens 4 h oder über Nacht mit einer Lösung inkubiert, die das zu testende Protein enthält. Die Durchführung

ist vergleichbar mit der Immunpräzipitation (vgl. III.4.5.2). Nach Entfernung der ungebundenen Proteine durch mehrmaliges Waschen der Sepharose-Suspension werden die gebundenen durch Aufkochen (5 min, 95 °C) mit Laemmli-Puffer eluiert. Das Eluat wird über Western Blot analysiert.

4.8 Auftrennung und Analyse von Proteinen

4.8.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen wird unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) mit SDS-Polyacrylamidgelen (SDS-PAA-Gele) durchgeführt. Die Gele bestehen aus einem Sammelgel, aufgeschichtet auf ein Trenngel, das die Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel in einer Lauffront sammelt. Die Trenngele werden je nach Größe der zu untersuchenden Proteine mit verschiedenen Acrylamidkonzentrationen (37,5 : 1 Acrylamid : Bisacrylamid, Roth, Karlsruhe, Deutschland) von 6–15 % hergestellt (0,1 % SDS, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,16 % TEMED, 0,064 % APS), das Sammelgel enthält immer 4 % Acrylamidmix (0,1 % SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,16 % TEMED, 0,064 % APS).

Die Proteinproben werden in Laemmli-Probenpuffer aufgenommen [0,0625 M Tris, 2 % SDS, 10 % Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,05 % Bromphenolblau, pH 8,0; (Laemmli, 1970)] und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Als Größenstandard werden 3 μ l eines Proteinmarkers aufgetragen (peqGOLD Prestained Protein-Marker IV, peqlab, Erlangen, Deutschland). Die Auftrennung erfolgt bei einem kleinen Gel (Mini-PROTEAN® 3 Cell, Bio-Rad) bei 25 mA, bei einem großen (SE600, Hoefer, San Francisco, USA) bei 60 mA in SDS-Laufpuffer (25 mM Tris pH 8,6, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS).

Für eine Coomassie-Färbung der Proteine wird das Gel in Färbelösung (0,3 % Coomassie Brilliant Blue R250, 45 % Ethanol, 45 % dH₂O, 10 % Eisessig) für 10–30 min schüttelnd inkubiert und anschließend in Entfärbelösung (45 % Ethanol, 45 % dH₂O, 10 % Eisessig) entfärbt. Die Färbelösung Roti-Blue von Roth (Karlsruhe, Deutschland) wird nach Anleitung des Herstellers für die sensitivere colloidale Coomassie-Färbung verwendet.

4.8.2 Western-Blot

Der Proteintransfer aus einem Polyacrylamid-Gel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn, Deutschland) erfolgt bei 2,5 mA pro cm² Membran in „Towbin“-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 10 % Methanol, pH 8,6) für 1 h in einer Trans-Blot® SD „semi-dry transfer cell“ Apparatur (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Anschließend werden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 3 % Magermilch in TBS-T-Puffer (8 g NaCl, 0,2 g KCl, 3 g Tris, 0,1 % Tween 20, pH 7,4) für 1 h unter leichtem Schütteln abgesättigt. Danach inkubiert man die Membran in der entsprechenden Antikörperlösung (0,3 % Magermilchpulver in TBS-T). In dieser Arbeit verwendete Antikörper und Verdünnungen sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Antikörper für Western-Blots.

Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Quelle
Claudin1 (JAY.8)	Kaninchen, polyklonal	1 : 500	Zymed, San Francisco, CA, USA
Claudin-2	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000	Labvision (Thermo Scientific), Fremont, CA, USA
Erk1/2 (M5670)	Kaninchen, polyklonal	1 : 40 000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Hsc70 (1B5)	Ratte, monoklonal	1 : 1000	Biomol / Stressgen, Hamburg, D
MPP4-3H10 (ZKÜ)	Maus, monoklonal	unverdünnt	Stöhr <i>et al.</i> , 2005
MPP4-EP119	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000	Stöhr <i>et al.</i> , 2003
MPP5	Kaninchen, polyklonal	1 : 2000	Stöhr <i>et al.</i> , 2005
myc 9E10 (ZKÜ)	Maus, monoklonal	unverdünnt	ECACC (<i>european collection of animal cell cultures</i>)
Na-K-ATPase α 1	Maus, monoklonal	1 : 1000	Developmental studies, University of Iowa, USA
Na-K-ATPase α 3 ATP1A3 (XVIF9-G10)	Maus, monoklonal	1 : 1000	Biozol, Eching, D
Na-K-ATPase β 2 (Klon 35)	Maus, monoklonal	1 : 2000	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
phospho-Erk1/2 (E7028)	Kaninchen, polyklonal	1 : 1000	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Psd95	Kaninchen, polyklonal	1 : 5000	Synaptic Systems, Göttingen, Deutschland
Psd95, 7E3-1B8	Maus, monoklonal	1 : 2000	Affinity Bioreagents, Golden, CO
Recoverin P26	Kaninchen, polyklonal	1 : 5000	K.-W. Koch, Forschungszentrum Jülich, D
Rho-1D4	Maus, monoklonal	1 : 10 000	(MacKenzie <i>et al.</i> , 1984)
Veli3 (ZMAL3)	Kaninchen, polyklonal	1 : 750	Zymed, San Francisco, CA, USA

ZKÜ = Zellkulturüberstand

Nach dem Waschen mit TBS-T wird der entsprechende sekundäre Antikörper gegen IgGs der Maus, Kaninchen oder Ratte (Calbiochem, VWR Deutschland GmbH, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:10000 zugegeben. Die sekundären Antikörper sind mit der Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Nach mehreren Waschschritten erfolgt der Proteinnachweis mit dem ECL-Detektionssystem (Pierce, Rockford, IL, USA). Hierbei führt die von der Peroxidase katalysierte Reaktion zur Oxidation von Luminol und zur Entstehung von blauem Licht, das durch die Exposition von Blaulicht-sensitiven Filmen sichtbar gemacht wird.

4.9 2D-Gelelektrophorese

Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist eine Methode, um komplexe Proteingemische aus Zellen oder Gewebe zu analysieren. Hierbei werden Proteine unter zwei unterschiedlichen Bedingungen aufgetrennt. Die erste Dimension, die isoelektrische Fokussierung, trennt Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) auf, die zweite Dimension, die SDS-PAGE, nach ihrem Molekulargewicht. Sollen Proben von 2D-Gelen per Massenspektrometrie analysiert werden, ist darauf zu achten, dass alle Puffer, Geräte und Proben frei von Verunreinigungen sind, dazu zählt im besonderen die Keratin-Kontamination durch Hautschuppen.

Die 2D-Gele für eine anschließende Massenspektrometrie wurden von PD Dr. Günter Lochnit und seinen Kollegen am Biochemischen Institut der Universität Gießen aus Trichloressigsäure-präzipitierten und getrockneten Proben hergestellt. Im Folgenden wird die Anfertigung der 2D-Gele beschrieben, die selbständig hergestellt wurden.

4.9.1 Probenvorbereitung

Die Löslichkeit der Proteine wird erreicht durch die Verwendung von chaotropen Substanzen, Detergenzien, reduzierende Agenzien, Puffer und Ampholyten. In dieser Arbeit wurde der RSS-Puffer verwendet, bestehend aus den chaotropen Agenzien Harnstoff (8 M) und Thioharnstoff (2 M), die die Wasserstoffbrückenbindungen zerstören und dadurch Proteine solubilisieren. Das Detergens Chaps (2 %) zerstört hydrophobe Interaktionen und erhöht die Löslichkeit der Proteine an ihrem pI. DTT (100 mM), ein reduzierendes Agens, zerstört Disulfidbrücken. Dies ist wichtig, um Proteine als einzelne Untereinheiten analysieren zu können. Ampholyte (0,8 %) können helfen, Proteine auch bei geringer Salzkonzentration in Lösung zu halten, die 40 mM nicht übersteigen sollte. Da die Salzkonzentration während der Hoch-Volt-Phase der

Fokussierung zwangsläufig vermindert wird, würden ohne Ampholyte einige Proteine Gefahr laufen, zu präzipitieren.

4.9.2 Erste Dimension

Die Konzentration der Proteinprobe wird mittels Bradford-Test bestimmt. Für Coomassie-Färbungen werden 200–400 µg benötigt, für Silberfärbungen reichen 50–80 µg Protein aus. Die entsprechende Menge wird mit RSS-Puffer auf 300 µl aufgefüllt und mit 3 µl Bromphenolblau-Ladepuffer in die Rille der „Protean® IEF Cell“ Kammer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) für die erste Dimension verteilt. Darauf wird luftblasenfrei ein Plastikstreifen gelegt, auf dem ein linearer pH-Gradient in einem Gel immobilisiert ist (hier 17 cm, ReadyStrip™ IPG Strip, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), dabei liegt die mit „+“ markierte Seite auf der entsprechenden Seite der Kammer, beide Elektroden müssen mit dem Gel in Kontakt sein. Die IPG-Streifen sind mit verschiedenen pH-Bereichen erhältlich, die meisten Proteine werden mit dem „broad-range“-Streifen (pH 3–10) abgedeckt.

Im elektrischen Feld wandern die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punktes in den pH-Bereich des Gels, in dem ihre Nettoladung gleich Null ist. Der pI wird durch die Anzahl und Art der geladenen Gruppen eines Proteins bestimmt. Etwa 60 min nach Programmstart wird der Streifen mit Öl überschichtet, um Verdunstung zu verhindern, die zur Präzipitierung des Harnstoffs führen kann. Bei konstanten 20 °C wird das Gel auf dem IPG-Streifen bei 50 V für 16 h aktiv rehydriert. In der darauf folgenden Pause werden zwischen Streifen und Elektrodendrähte mit ddH₂O angefeuchtete Filterpapierstückchen gelegt. Diese ziehen Salze und andere Kontaminationen aus der Probe, die sich ansonsten an den Elektroden sammeln würden und durch die erhöhte Leitfähigkeit für einen veränderten Gradienten und Unterbrechungen im Gel sorgen könnten. Die Filter sollten mehrmals während des Laufes gewechselt werden. Anschließend folgt ein schneller Anstieg für 1 h auf 200 V, für 1 h auf 500 V und dann für 1 h ein linearer Anstieg auf maximal 8000 V. Diese Spannung wird anschließend so lange gehalten, bis bei diesem Schritt 50000 Vh erreicht sind. Dabei sind 50 µA pro Streifen eingestellt, um Carbamylierungsreaktionen im Harnstoffprobenpuffer zu minimieren. Die tatsächlich erreichbare Spannung variiert allerdings je nach pH-Bereich und Länge des IPG-Streifens, sowie nach Proben- und Puffer-Zusammensetzung. Bis das Programm manuell beendet wird, bleibt die Spannung bei 50 V um die Diffusion der Proteine zu verhindern. Die IPG-Streifen können

direkt für die zweite Dimension verwendet oder in Plastiktüten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für mehrere Monate eingefroren werden. Dabei sollte das Öl von der Plastikseite des Streifens entfernt werden, ohne die Gelseite zu berühren.

4.9.3 Zweite Dimension

Um die fokussierten Proteine für die zweite Dimension zu solubilisieren, wird der Streifen zunächst mit 1 % DTT und anschließend mit 4 % Iodacetamid in SDS-haltigem Äquilibriumspuffer [6 M Harnstoff ultrapur, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 3,3 % Trenngelpuffer (1,5 M Tris ultrapur, 0,4 % SDS, pH 8,8)] behandelt, jeweils für 10–15 min unter leichtem Schütteln. Das DTT erhält den reduzierten Status der denaturierten, nicht-alkylierten Proteine. Iodacetamid alkylt Sulfhydrylgruppen und verhindert so ihre Reoxidierung während der Elektrophorese. Anschließend wird ein SDS-Polyacrylamid-Gel (z.B. 10 %-ig: 10 % Acrylamidmix, 10 % Trenngelpuffer, 0,0005 % TEMED, 0,1 % APS) mit lauwarmer 0,5 %-iger *low-melting* Agarose (gelöst in Elektrophoresepuffer mit etwas Bromphenolblau) überschichtet. Der IPG-Streifen wird zuerst kurz mit ddH₂O, dann mit Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1 % SDS) abgespült, und durch die *low-melting* Agarose hindurch luftblasenfrei mit der Gelseite nach vorne auf das Gel aufgelegt. Der Marker (peqGOLD Protein Marker IV, peqlab, Erlangen, Deutschland) wird auf ein Stückchen Whatmanpapier aufgebracht (10 μl für Coomassie-Färbung, 1–2 μl für Silberfärbung) und neben den IPG-Streifen gesteckt. Die Gelkammer (Protean II xi Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) wird an einen Wasserkühlkreislauf angeschlossen und mit kaltem Elektrophoresepuffer gefüllt. Das Gel lässt man zunächst für 1 h bei 50 mA, danach etwa 3 h bei 100 mA laufen, bis die blaue Lauffront das untere Gelende erreicht hat.

4.10 Proteinidentifizierung durch Massenspektrometrie

Massenspektrometrische Analysen wurden am Institut für Biochemie der Universität Giessen, durchgeführt. Zur Proteinidentifizierung werden Coomassie-gefärbte Protein-*spots* aus dem PAA-Gel ausgeschnitten und anschließend im Gel mit 5 ng/ μl Trypsin (Trypsin Gold von Schweinepankreas, Massenspektrometrie-Qualität, Promega, Madison, WI) verdaut. Die Peptide werden dann aus dem Gel mit 1 % wässriger Trifluoressigsäure extrahiert und mit einem Ultraflex I MALDI-TOF Massenspektrometer (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland) ein

Peptidmassen-Fingerabdruck erstellt. Für die externe Kalibrierung wird eine Standard Peptid-Kalibrierungsmischung verwendet (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland). Die Matrix besteht aus Dihydroxybenzoesäure (10 mg in 50 % wässrigem Acetonitril mit 1 % Phosphorsäure). Bis zu 500 Treffer werden zusammengefasst. Für die Datenverarbeitung werden die „Compass 1.2“ und „BioTools 3.0“ Programme verwendet (Bruker Daltonic, Bremen, Deutschland). Die Proteine werden durch die MASCOT Suche (Version 2.2.04, Matrix Science, London, England) unter Verwendung der NCBI Inr Datenbank identifiziert. Die Parametersuche beinhaltet Carbamidomethylierung der Cysteinreste, partielle Methionin-Oxidierung, Massenabweichung von 50 ppm und die Speziesbeschränkung auf Säuger. Eine Abdeckung der volle-Länge Proteine über 15 % wird als ausreichend angesehen (Garin *et al.*, 2001). Proteine mit einem „Mowse Score“ über 64 werden als signifikant betrachtet ($p < 0,05$).

4.11 Das Hefe-Zwei-Hybrid-System

4.11.1 Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems

Eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen *in vivo* ist das Hefe-Zwei-Hybrid-System. Hierbei macht man sich den Transkriptionsfaktor GAL4 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu Nutze, der aus zwei verschiedenen Domänen besteht: einer DNA-Bindedomäne (GAL4-BD) und einer Domäne, die die Transkription aktiviert (GAL4-AD). Werden diese Domänen von zwei verschiedenen Proteinen über eine Interaktion zusammengebracht, wird der Transkriptionsfaktor aktiv. Daher verwendet man zwei Expressionsvektoren, die jeweils für ein Fusionsprotein kodieren. Zum einen für ein Hybridprotein, das aus GAL4-BD und dem zu untersuchenden Protein besteht (Köderprotein, engl. *bait*). Das zweite Fusionsprotein besteht aus GAL4-AD und einem möglichen Bindepartner (Beuteprotein, engl. *prey*). Beide Plasmide replizieren sich sowohl in Hefe als auch in *E. coli*. In dieser Arbeit werden die Vektoren pGBKT7 und pGADT7 (Clontech, Mountain View, CA, USA) verwendet, die für die Selektion in Hefe die Marker *TRP1* und *LEU2* tragen. Der Hefestamm AH109 (Clontech, Mountain View, CA, USA), der kein funktionierendes *gal4*-Gen hat und ein Reporter gen trägt, dem eine Bindestelle für den GAL4-Transkriptionsfaktor vorgeschaltet ist, wird mit beiden Plasmiden transformiert. Als Reporter einer Interaktion fungieren Gene, die bestimmte Aminosäuren herstellen können oder durch das *lacZ*-Gen einen Farbumschlag katalysieren. Kommt es zwischen Köder und Beute zu einer Interaktion, kann diese durch das Wachstum auf entsprechenden Selektionsmedien oder

den erwähnten Farbumschlag nachgewiesen werden. AH109 enthält verschiedene Reporterkonstrukte (*ADE2*, *HIS3*, *lacZ*), die nur in Anwesenheit der GAL4-basierten Proteininteraktion exprimiert werden.

4.11.2 Interaktionstest auf Minimalplatten

Um die Interaktion zwischen zwei Proteinen zu untersuchen wird jeweils ein Klon von einer SD/-Leu/-Trp-Platte in 5 µl 1 x TE aufgenommen und im Verhältnis von 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50 in TE-Puffer verdünnt. Davon werden je 5 µl auf SD/-HALT-Platten (0,67 % Hefe-Nitrogen-Base ohne Aminosäuren, 10 % -His/-Ade/-Leu/-Trp-Dropout-Lösung, 2 % Glucose, 2 % Agar, pH 5,8) aufgetropft. Dabei macht man sich zu nutze, dass nur die Klone wachsen können, die miteinander interagierende Proteine exprimieren, da diese die fehlenden Aminosäuren produzieren. Bei einer starken Interaktion findet ein Wachstum auch bei hoher Verdünnung statt.

4.11.3 β -Galaktosidase-*assay*

Durch den β -Galaktosidase-*assay* kann die Interaktion zweier Proteine quantifiziert werden. Die vom *lacZ*-Gen kodierte β -Galaktosidase hydrolysiert das Laktosederivat ONPG (o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranosid) zu Galaktose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol. Die Intensität der Gelbfärbung variiert mit der Konzentration der β -Galaktosidase und der Reaktionsdauer. Durch die Zugabe des basischen NaCO_3 wird die Reaktion gestoppt, da das Enzym bei hohen pH-Werten inaktiv ist.

Für eine Übernachtskultur wird eine Kolonie der Transformanten in 5 ml SD/-LT-Medium angeimpft. Von dieser werden am nächsten Tag 2 ml mit 8 ml YPDA-Glucose gemischt und bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,5\text{--}0,8$ wachsen gelassen. Währenddessen löst man pro 1 ml Z-Puffer (60 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 40 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 10 mM KCl, 1 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$) 4 mg ONPG und lässt diesen 1–2 h schütteln. Die genaue OD_{600} wird notiert und 1,5 ml abzentrifugiert (14000 rpm, 30 sec, RT), der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird in 1,5 ml Z-Puffer aufgenommen und wiederum abzentrifugiert. Mit 300 µl Z-Puffer wird das Pellet gelöst, was eine Aufkonzentrierung um den Faktor 5 ergibt. 100 µl davon werden in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C wieder aufgetaut. Diese Prozedur wird insgesamt dreimal durchgeführt, um die Zellwände aufzubrechen. Zu den Proben und einer Referenz werden 700 µl Z-Puffer + 0,27 % β -Mercaptoethanol

gegeben. Mit der Zugabe von 160 μl der ONPG-Lösung wird eine Stoppuhr gestartet und die Proben bei 30 °C geschüttelt. Sobald die Proben eine deutliche Gelbfärbung entwickeln, wird die Reaktion mit 400 μl 1 M NaCO_3 gestoppt und die Zeit notiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (10 min, 14000 rpm, RT) wird der Überstand in Küvetten überführt und bei OD_{420} gemessen. Der Wert sollte zwischen 0,02 und 1,0 liegen. Die β -Galactosidase-Units werden mit folgender Formel berechnet, wobei 1 Unit der Menge Enzym entspricht, die 1 μmol ONPG zu O-Nitrophenol und D-Galactose pro Minute und pro Zelle hydrolysiert:

$$U = 1000 \cdot \text{OD}_{420} / (t \cdot V \cdot \text{OD}_{600})$$

wobei t = vergangene Zeit in min

$$V = 0,5 \text{ (0,1 ml} \cdot \text{Konzentrationsfaktor 5)}$$

V ERGEBNISSE

1 BESTIMMUNG DES EPITOPS DES MONOKLONALEN MPP4-ANTIKÖRPERS 3H10

Für die vorliegenden Studien zum MPP4-Protein standen zwei spezifische Antikörper gegen MPP4 zur Verfügung. Der polyklonale Antikörper MPP4-EP119 erkennt den N-Terminus von MPP4 (antigene Sequenz: Aminosäure 2–16) (Stöhr *et al.*, 2003). Der monoklonale Antikörper MPP4-3H10 war gegen eine Sequenz, die die L27C- und die PDZ-Domäne des bovinen MPP4 (Aminosäure 92–218) enthält, hergestellt worden (Stöhr *et al.*, 2005) (Abb. 9). Das Epitop des MPP4-3H10-Antikörpers war bereits mit Hilfe verschiedener Fusionsproteine auf die PDZ-Domäne eingegrenzt worden (Stöhr *et al.*, 2005). Um das Epitop des MPP4-3H10-Antikörpers noch weiter einzugrenzen, wurden in dieser Arbeit vier GST-Fusionsproteine synthetisiert. Eines umfasste die gesamte PDZ-Domäne (#4), wohingegen die drei kürzeren aus überlappenden Sequenzen bestanden (#1-3) (Abb. 9).

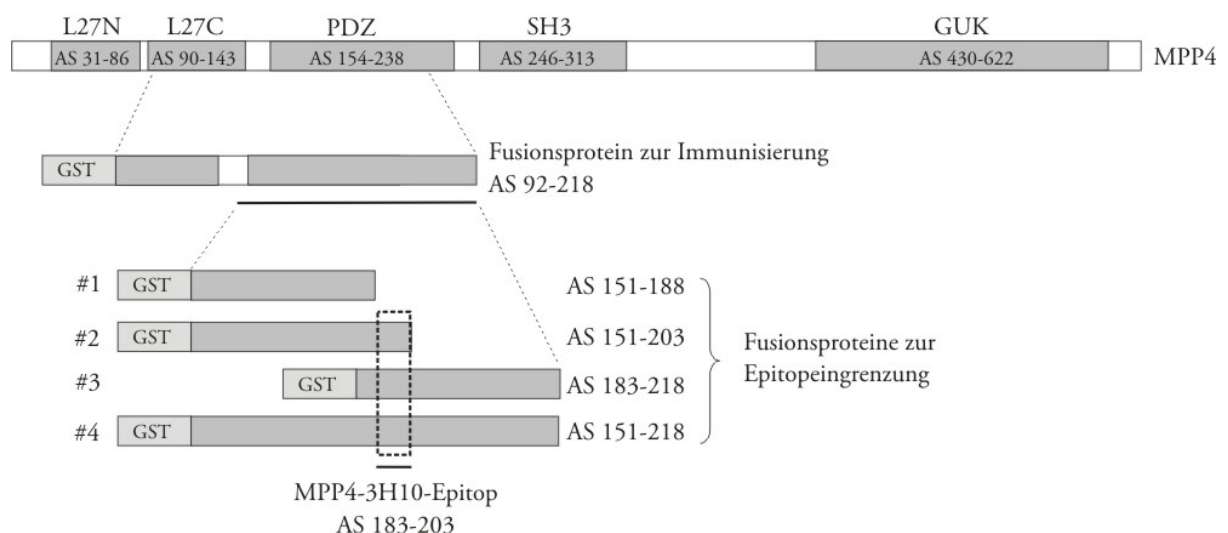


Abbildung 9: Schema zur Bestimmung des Epitops des MPP4-3H10-Antikörpers. Dargestellt sind die Domänenstruktur des MPP4-Proteins, sowie die GST-Fusionsproteine zur Immunisierung der Mäuse bzw. zur Eingrenzung des MPP4-3H10 Epitops (#1–4). Der Bereich, der von dem MPP4-3H10-Antikörper erkannt wurde, ist mit einem Kästchen markiert. AS, Aminosäure. (Verwendete Primer Appendix IX.1 Tab. 7)

Im Western-Blot zeigte der MPP4-3H10-Antikörper eine Reaktion mit der PDZ-Domäne (#4), sowie den Fusionsproteinen #2 und #3, jedoch weder mit #1 noch mit GST (Abb. 10). Somit erkennt der MPP4-3H10-Antikörper die Sequenz zwischen den Aminosäuren 183–203 (N-ARVIHGGLAERSGLLYAGDKL-C).

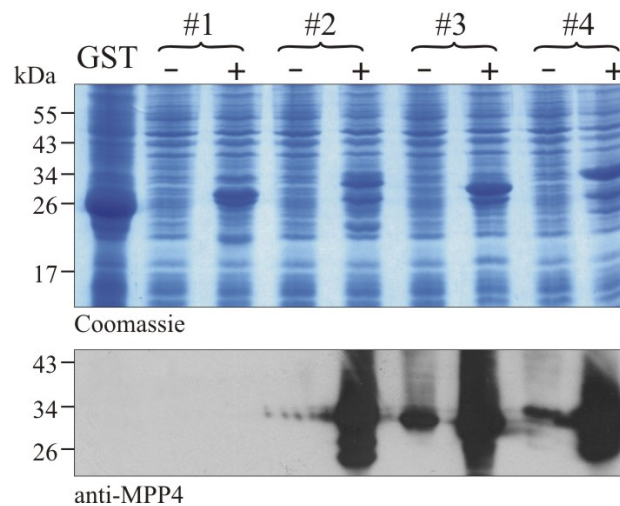


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse zur Eingrenzung des Epitops des MPP4-3H10-Antikörpers. *E. coli*-Bakterien wurden mit den Plasmiden zur Expression verschiedener Fusionsproteine transformiert und induziert. Vor und nach der Induktion wurde für die SDS-PAGE eine Probe genommen. Das Coomassie-gefärbte Gel oben zeigt die IPTG-induzierte Überexpression der Fusionsproteine (#1: 30,8 kDa, #2: 32,4 kDa, #3: 30,4 kDa, #4: 34 kDa). Der MPP4-3H10-Antikörper erkannte im Immunblot die Fusionsproteine #2, #3 und #4. Fusionsprotein #1 und GST (26,6 kDa) ergaben kein Signal. Nicht induziert: „-“, induziert: „+“

2 PROTEOMISCHE ANALYSE DES MPP4-ASSOZIIERTEN PROTEINKOMPLEXES

Für die Identifizierung von Komponenten des MPP4-organisierten Proteinkomplexes wurde Rindernetzhaut als Ausgangsmaterial gewählt. Die subzelluläre Fraktionierung der Rindernetzhaut zeigte, dass sich das MPP4-Protein in der zytoplasmatischen (S2) sowie der Triton X-100-gelösten Membranfraktion (S3) nachweisen lässt (Abb. 11A). Eine ähnliche subzelluläre Verteilung wurde auch für Veli3 (Abb. 11B), einem bereits bekannten Bindungspartner von MPP4, gefunden (Stöhr *et al.*, 2005).

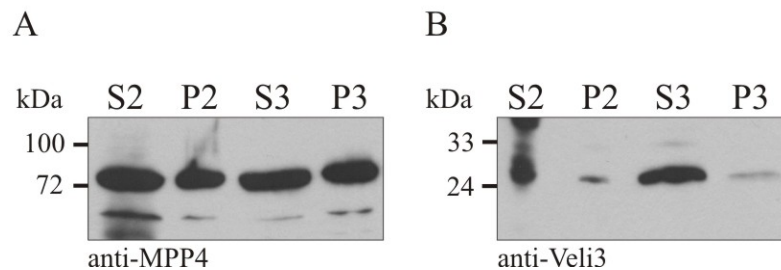


Abbildung 11: Detektion von MPP4 und Veli3 in subzellulären Fraktionen der Rindernetzhaut. (A) Der Immunblot mit anti-MPP4-Antikörpern zeigte neben einem löslichen Anteil (S2) die Anreicherung von MPP4 in der groben Membranfraktion P2, sowie dessen inkomplette Löslichkeit mit Triton X-100 in S3 bzw. P3. (B) Veli3 wurde dagegen mit anti-Veli3-Antikörpern fast ausschließlich in den löslichen Fraktionen S2 und S3 detektiert

2.1 Isolierung des MPP4-organisierten Proteinkomplexes aus der zyotsolischen Fraktion der Rinderretina

Eine Immunaффinitätssäule aus MPP4-3H10-Antikörpern, welche kovalent an CNBr-aktivierte Sepharosekügelchen gekoppelt waren, wurde zunächst mit der zytosolischen Fraktion eines Extrakts aus boviner Retina inkubiert und ausgiebig gewaschen. Western-Blot-Analysen zeigten eine deutliche Anreicherung von MPP4 und Veli3 in den Eluatzen (Abb. 12), was die Funktionalität und die Effizienz der Immunaффinitätschromatographie demonstrierte.

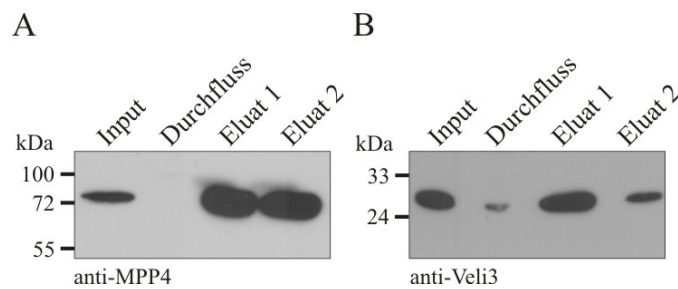


Abbildung 12: Western-Blot-Analyse zur Funktionalität der Immunaффinitätschromatographie. Boviner retinaler Proteinextrakt (Input), der Durchfluss (ungebundene Proteine) und zwei Eluate von der MPP4-3H10-Immunaффinitätsmatrix wurden durch Immunblots mit anti-MPP4- (A) bzw. anti-Veli3- (B) Antikörpern analysiert. Beide Proteine wurden in den Eluaten deutlich angereichert. Der Input betrug jeweils 1 % des Gesamtlysats.

Dieser Versuchsansatz wurde daher auch für die Identifizierung MPP4-assoziiierter Proteine über 2D-Gelelektrophorese und anschließender massenspektrometrischer Analyse gewählt. Die Coomassie-gefärbten 2D-PAGE-Gele zeigten wiederholt zahlreiche *spots* verschiedener Intensitäten von 10 bis 140 kDa, deren Anzahl je nach Waschstringenz variierte. Abbildung 13A zeigt beispielsweise ein Gel, bei dem zur Entfernung ungebundener Proteine die Matrix sehr vorsichtig gewaschen wurde. Unter den *spots* befanden sich zwei Gruppen von Proteinen mit einer molekularen Masse von etwa 23 bzw. 50 kDa. Über einen Immunblot eines vergleichbaren Gels mit Antikörpern gegen Maus-Immunglobuline konnten diese beiden Gruppen als die Polypeptide der schweren und leichten Kette der MPP4-3H10-Antikörper identifiziert werden, die trotz ihrer kovalenten Kopplung an die Sepharosekügelchen abgelöst worden waren (Abb. 13B).

2.2 Massenspektrometrische Identifizierung der MPP4-assoziierten Proteine

Für die massenspektrometrische Untersuchung wurden große, deutlich sichtbare und intensiv gefärbte *spots* ausgewählt. Die Peptidmassen-Fingerabdruck-Analyse aus dem dargestellten Retinaextrakt-2D-Gel (Abb. 13A) identifizierte aus 14 ausgeschnittenen *spots* oder Gruppen insgesamt 18 Proteine. Die in Abbildung 13A eingekreisten *spots* wurden zusammen ausgeschnitten und repräsentierten im Fall der Gruppe Nr. 12 identische Proteine, die durch Modifikationen verschiedene isoelektrische Punkte besaßen. Die MALDI-TOF Peptidmassen-Fingerabdrücke des tryptischen Verdaus der *spots* Nr. 1, 2, 5 und 13a sind exemplarisch im Appendix IX.2 in Abb. 51 dargestellt. Alle analysierten Proteine sind in Tabelle 6 aufgelistet.

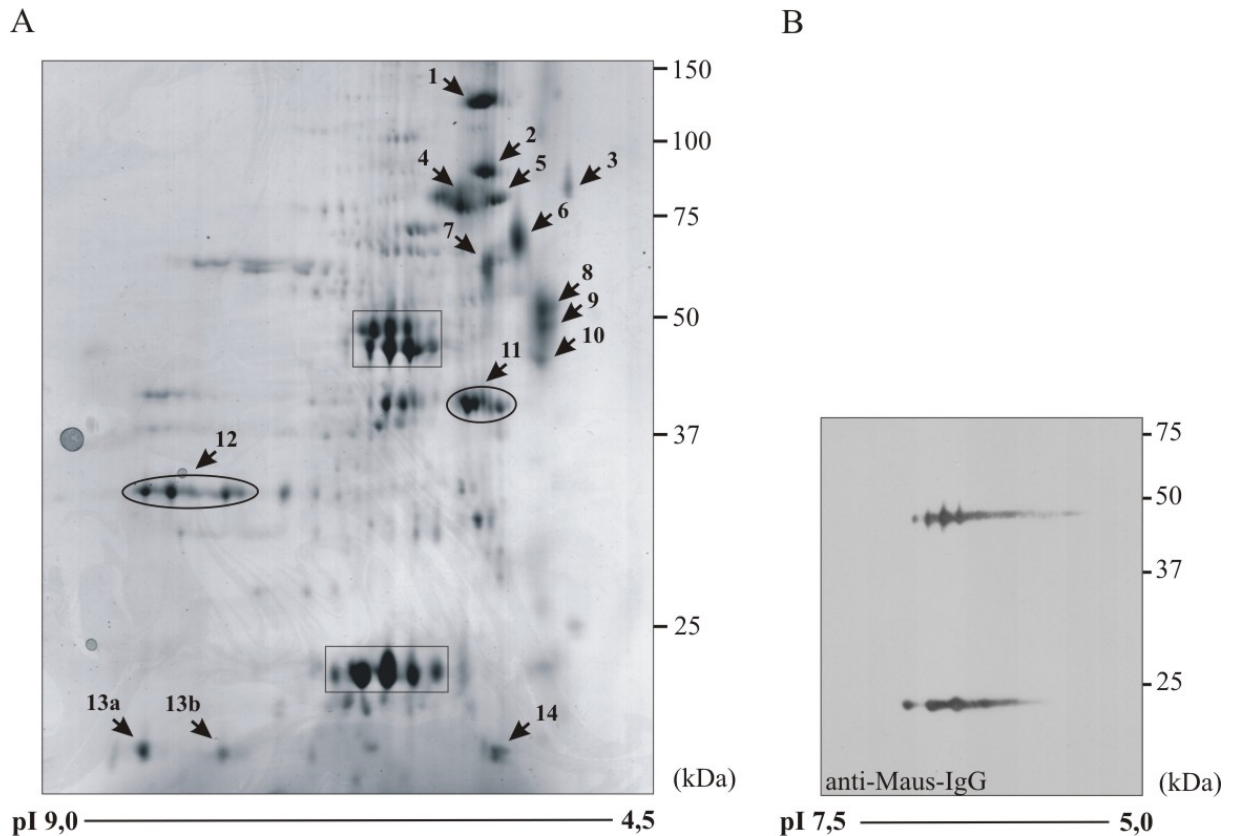


Abbildung 13: Analyse boviner retinaler Proteine, die mit der MPP4-3H10-Immunaффinitätsmatrix aufgereinigt wurden. (A) Coomassie-gefärbtes 2D-PAGE-Gel mit retinalen Proteinen, die mit der MPP4-3H10-Immunaффinitätsmatrix präzipitiert wurden. Dargestellt ist der Ausschnitt von pH 4,5 bis pH 9. Molekulare Gewichtsmarker sind auf der rechten Seite angezeigt. Pfeile kennzeichnen die Proteine, die für die Analyse mittels Massenspektrometrie ausgewählt wurden (Tabelle 6). Einkreiserte spots wurden zusammen ausgeschnitten. Kästchen markieren die spot-Gruppen der leichten und schweren Ketten des MPP4-3H10-Antikörpers. (B) Durch einen Immunblot eines vergleichbaren Gels wurden mit anti-Maus-IgG-Antikörpern die Ketten des MPP4-3H10-Antikörpers identifiziert. Dargestellt ist in diesem Fall ein Ausschnitt des Blots von pH 5 bis pH 7,5 bzw. von etwa 20 kDa bis 75 kDa. Es wurden IPG-Strips von pH 3 bis pH 10 mit der Länge 11 cm (A), bzw. 17 cm (B) verwendet.

Unter den identifizierten Proteinen befanden sich MPP4 (Nr. 2) und der bekannte Bindungspartner Veli3 (Nr. 13) (Stöhr *et al.*, 2005). Weiterhin wurden PSD95 (Nr. 1), das Chaperon Hsc70 (Nr. 5) und das Ca²⁺-bindende Recoverin (Nr. 14) identifiziert, die als potentielle Interaktionspartner von MPP4, basierend auf ihren funktionellen Eigenschaften und ihrer Lokalisierung in der Photorezeptorsynapse ausgewählt wurden (siehe Kapitel 2.3, 2.5 und 2.6).

Tabelle 6: Auflistung der Proteine, die über die MPP4-3H10-Immunaффinitätschromatographie isoliert und mit Massenspektrometrie identifiziert wurden.

Spot ^a	NCBI gi	Protein ID	Theoretischer MW (kDa)	Theoretischer pI	Anzahl der Peptide	Abdeckung (%)	Mowse Score	Lokalisierung in der Retina
1 ^d	194675624	PSD95	85,4	5,68	40	41,3	417	Photorezeptorsynapse, Amakrine und Ganglienzellen (Koulen <i>et al.</i> , 1998)
2 ^d	194664460	MPP4	77,8	5,76	11	44,1	121	Photorezeptorsynapse, Verbindungszilium, OLM (Stöhr <i>et al.</i> , 2003; Kantardzhieva <i>et al.</i> , 2005)
3 ^d	27806523	NEFL	62,7	4,51	14	27,0	152	Ganglienzellen (Ruiz-Ederra <i>et al.</i> , 2004)
4 ^b	30794280	BSA	69,3	5,99	15	31,3	108	retinale und choroidale Blutgefäße (Duncan <i>et al.</i> , 2006)
5 ^d	78101017	Hsc70	71,2	5,31	11	25,3	86	innere Segmente der Photorezeptoren, Zapfensynapse, ONL, Ganglienzellen (Abb.19)
6 ^{b,d}	110347570	Vimentin	53,7	4,97	20	50,2	217	Müller-Gliazellen (Kivela <i>et al.</i> , 1986)
7 ^c	13205970	GFAP	49,5	5,34	37	73,1	312	Müller-Gliazellen (Kivela <i>et al.</i> , 1986)
	15494964	α -Internexin	55,4	5,34	29	63,1	256	Ganglienzellkörper (Yuan <i>et al.</i> , 2006)
8 ^{b,d}	51494829	β -Tubulin	50,0	4,69	20	44,9	152	Zytoskelett aller Zelltypen (Woodford and Blanks, 1989)
9	114051854	α -Tubulin	49,9	4,90	18	51,5	163	Zytoskelett aller Zelltypen (Woodford and Blanks, 1989)
10 ^c	155371977	γ -Enolase	47,3	4,85	14	36,9	89,5	retinale Neuronen (Famiglietti <i>et al.</i> , 2003)
	147744568	Zytokeratin-10	59,5	5,09	22	35,0	142	nicht exprimiert, humane Kontamination
11 ^{b,c,d}	62751863	Kreatinkinase Typ B	42,7	5,56	31	76,6	300	innere und äußere Segmente der Photorezeptoren (Hemmer <i>et al.</i> , 1993)
	148744172	β -Aktin	41,7	5,28	16	46,9	160	Zytoskelett aller Zelltypen (Woodford and Blanks, 1989)
12 ^d	77404273	GAPDH	35,9	8,35	26	55,3	244	Zytoplasma aller Zelltypen (Tezel <i>et al.</i> , 2005)
13a ^d	61840159	Veli3	21,8	8,42	12	45,8	123	retinale Synapse, OLM, Zapfen und bipolare Zellkörper (Stöhr <i>et al.</i> , 2005)
13b ^d					11	38,8	115	
14 ^c	39654374	Recoverin	23,3	5,28	15	69,7	169	Photorezeptoren (Strissel <i>et al.</i> , 2005)
	27807469	Peroxiredoxin-2	21,9	5,38	8	37,7	84	unbekannt

^aSpot-Nummern entsprechen denen in Abbildung 13 und 14

^bSpots, die auch aus Extrakten der Lunge über eine Kontroll-Immunaффinitätschromatographie mit MPP4-3H10 gereinigt wurden (Abb. 14B)

^cSpots, in denen durch Massenspektrometrie zwei Proteine detektiert wurden

^dSpots, die auch bei stringenten Waschbedingungen (Abb. 14A) zu finden sind

Molekulargewichte (MW) und isoelektrische Punkte (pI) wurden mit dem „ProtParam“-Programm berechnet (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>)

Etwa ein Drittel der identifizierten Proteine waren Strukturproteine, die als Bestandteile des Zytoskeletts fungieren, darunter β -Aktin (Gruppe 11), α - und β -Tubulin (Nr. 9 und 8), die leichte Kette des Neurofilament Polypeptids (engl. *neurofilament light-chain polypeptide*, NEFL) (Nr. 3), das neuronale Intermediär-Filamentprotein α -Internexin (Nr. 7), Vimentin (Nr. 6) und das saure Gliafaserprotein (engl. *glial fibrillary acidic protein*, GFAP) (Nr. 7). Außerdem wurden die Enzyme Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH, Nr. 12), γ -Enolase (Nr. 10), Kreatinkinase Typ B (Gruppe 11) und Peroxiredoxin-2 (Nr. 14) detektiert. Da häufig vorkommende Proteine, wie Zytoskelettproteine und Haushaltsproteine bekannte Kontaminanten verschiedener Proteinaufreinigungsmethoden sind (Gavin *et al.*, 2002), wurden diese Proteine nicht weiter auf eine Interaktion mit MPP4 hin untersucht. Das humane Zytokeratin-10 (Nr. 10) stellt dagegen eine Verunreinigung vermutlich bei der Herstellung der Proben dar.

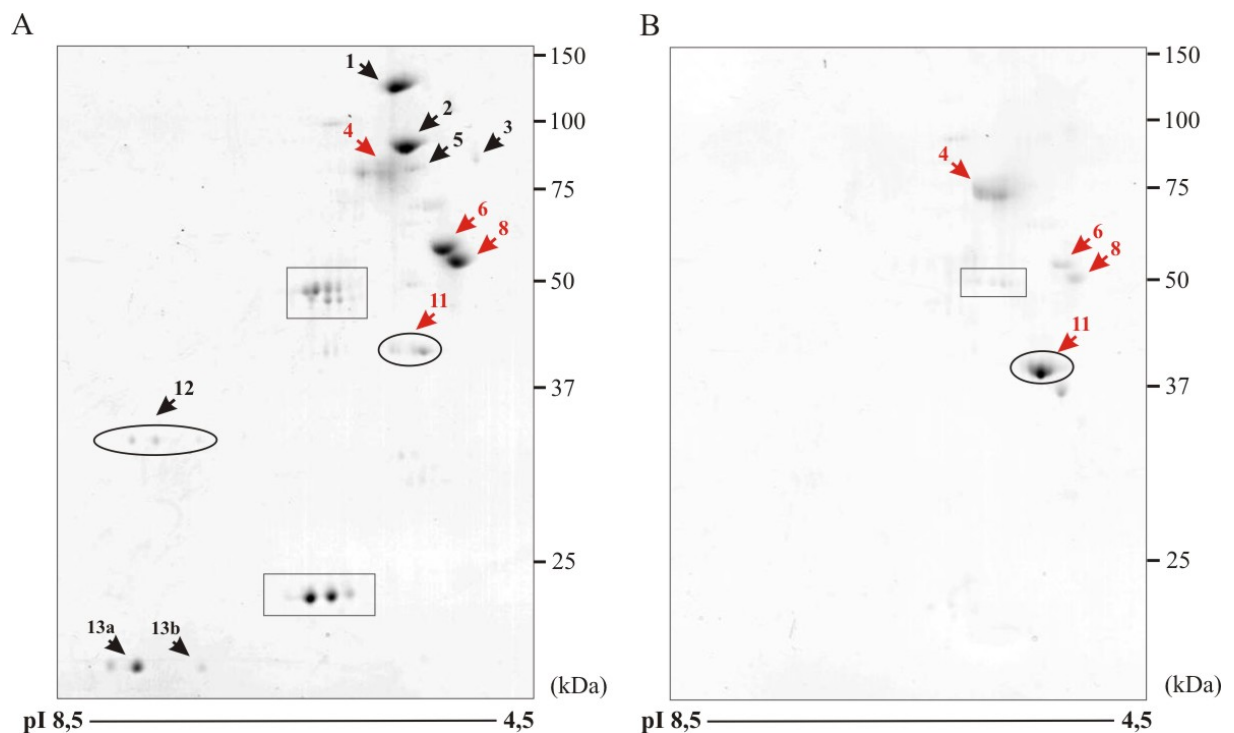


Abbildung 14: Kontrollgele der MPP4-3H10-Immunaффinitätsmatrix. (A) Coomassie-gefärbtes 2D-PAGE-Gel, das im Vergleich zum Gel in Abbildung 13A auf einer Säule basiert, die stringenter gewaschen wurde, wodurch weniger Proteine an der Säule gebunden blieben. Dargestellt ist der Ausschnitt von pH 4,5 bis pH 8,5. Rot markierte spots fanden sich auch in der (B) Negativkontrolle, die mit bovinem Lungenextrakt hergestellt wurde. Der dargestellte Ausschnitt entspricht dem in (A). Kästchen markieren die spot-Gruppen der leichten und schweren Ketten des MPP4-3H10-Antikörpers. Es wurden IPG-Strips von pH 3 – 10 mit der Länge 11 cm verwendet. Die Nummerierung der spots entspricht der in Tabelle 6.

In Abbildung 14A ist ein 2D-Gel als Beispiel für eine hohe Waschstringenz dargestellt. Die *spots* Nr. 6 und Nr. 8 wurden massenspektrometrisch analysiert. Die übrigen *spots* wurden aufgrund ihrer vergleichbaren Position mit den *spots* des Gels in Abbildung 13A markiert. Trotz des ausgiebigeren Waschens der Matrix fanden sich hier Proteine, die aufgrund ihrer Position auch in der Negativkontrolle identifiziert werden konnten (rot gekennzeichnete *spots* Nr. 4, 6, 8 und 11). Die Negativkontrolle wurde mit einer Immunaффinitätschromatographie aus bovinem Lungenextrakt hergestellt (Abb. 14B). Da die Lunge kein MPP4 exprimiert, handelt es sich bei den gebundenen Proteinen vermutlich um eine unspezifische Interaktion dieser Moleküle mit der MPP4-3H10-Immumatrix. BSA, Vimentin, β -Tubulin, Kreatinkinase Typ B und β -Aktin kommen somit als potentielle *in vivo*-Bindungspartner von MPP4 weniger in Frage.

2.3 MPP4 interagiert mittels L27-Heterodimerisierung direkt mit PSD95

Die übereinstimmende Lokalisierung von MPP4 und PSD95 in den synaptischen Enden der bovinen (Stöhr *et al.*, 2003) und murinen Photorezeptoren (Aartsen *et al.*, 2006), wies darauf hin, dass beide Adapterproteine Teil eines Netzwerks an der präsynaptischen Membran der Photorezeptoren sein könnten. Mit der MPP4-3H10-Immunaффinitätschromatographie und der Koimmunpräzipitation von PSD95 mit polyklonalen MPP4-Antikörpern wurde eine Assoziation zwischen MPP4 und PSD95 in der bovinen Retina bestätigt (Abb. 15).

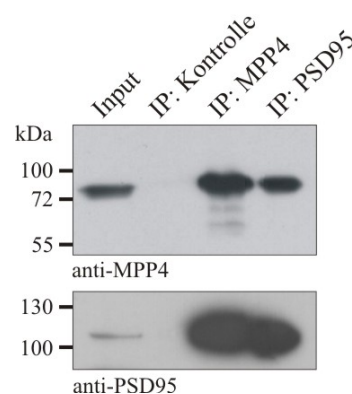


Abbildung 15: MPP4 interagiert mit PSD95. Immunpräzipitation (IP) aus bovinem zytosolischem Retinalysat mit polyklonalen anti-MPP4- oder anti-PSD95-Antikörpern und Kontrollserum. Der anschließende Western-Blot wurde mit monoklonalen anti-MPP4- oder anti-PSD95-Antikörpern inkubiert. Der Input betrug 2 % des gesamten Retinalysats.

Dieses Ergebnis stimmt mit früheren Arbeiten überein, in denen PSD95 zusammen mit MPP4 über anti-MPP4-Antikörper aus Mausretina-Extrakten kopräzipitiert wurde (Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Umgekehrt wurde MPP4 ebenfalls mit anti-PSD95-Antikörpern mittels Immunpräzipitation aus bovinem Retinaextrakt aufgereinigt (Abb. 15).

Es ist bereits bekannt, dass alternatives Spleißen zu zwei verschiedenen PSD95-Isoformen mit unterschiedlichen N-Termini führt (Chetkovich *et al.*, 2002a). Gehirnextrakte enthalten hauptsächlich die kurze PSD95-Isoform (PSD95- α), die einen palmitoylierten N-Terminus besitzt. Dieser wird durch ein einzelnes α 1-Exon codiert. Die lange Version von PSD95 (PSD95- β) repräsentiert etwa 10 % der gesamten PSD95-Proteinmenge im Gehirn und ist nicht palmitoyliert. Sie enthält stattdessen ein N-terminales L27-Heterodimerisierungs-Motiv, das durch drei β 1-Exons codiert wird. Die alternativen Exons werden zu einem gemeinsamen Exon 2 gespleißt. Bei der Betrachtung der zu PSD95 gehörenden 30 tryptischen Peptide, die in der massenspektrometrischen Analyse gefunden wurden, fiel die Sequenz eines 12 Aminosäure langen Fragments auf (AS 6-17: SALWLLAPLLR), das spezifisch zur L27-Domäne von PSD95- β passte. Um zu untersuchen, ob die L27-Domäne von PSD95- β an der Bindung zum MPP4 beteiligt ist, wurden die 82 N-terminalen Aminosäuren von PSD95- β mit GST fusioniert (GST-PSD95-L27) und in einem GST-*pull-down-assay* eingesetzt. Aus Zellextrakten von 293-EBNA-Zellen, die MPP4 überexprimierten, konnte MPP4 effizient mit der GST-PSD95-L27-Matrix präzipitiert werden (Abb. 16).

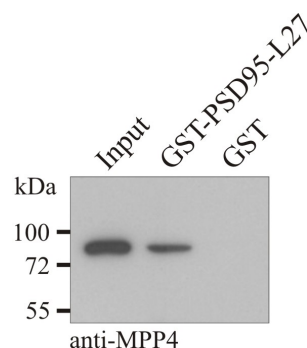


Abbildung 16: PSD95- β bindet MPP4 über die L27-Domäne. Bakteriell exprimiertes GST- (Kontrolle) oder GST-PSD95-L27-Fusionsprotein wurden mit einem Lysat der 293-EBNA-Zellen inkubiert, die MPP4 überexprimierten. Das an GST-PSD95-L27 gebundene MPP4 wurde durch Immunblot mit anti-MPP4-Antikörpern nachgewiesen. Der Input betrug 0,1 % des gesamten Zelllysats.

Zur Aufklärung welche der beiden L27-Domänen von MPP4 an der Bindung an PSD95- β beteiligt ist, wurden die N- und C-terminalen L27-Domänen von MPP4 einzeln und zusammen als GST-Fusionsproteine exprimiert. Nur bei Anwesenheit der N-terminalen L27-Domäne (GST-L27N und GST-L27NC) von MPP4 konnte heterolog exprimiertes PSD95- β präzipitiert werden (Abb. 17), was darauf hinweist, dass die N-terminale L27-Domäne des MPP4 für die Bindung an PSD95- β ausreichend ist. Eine Bindung zwischen den L27-Domänen von MPP4 und PSD95- α , dem die L27-Domäne fehlt, wurde nicht entdeckt (Abb. 17).

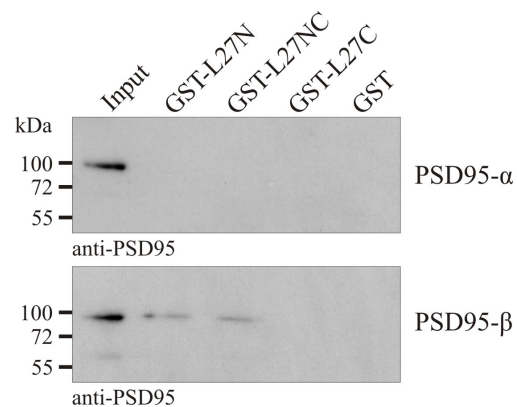


Abbildung 17: MPP4 bindet PSD95- β durch L27-Interaktion. Lysate aus 293-EBNA-Zellen, die PSD95- α oder PSD95- β überexprimierten, wurden mit GST- (Kontrolle) oder GST-Fusionsproteinen mit L27-Domänen von MPP4 inkubiert. Eluierte Proteine wurden durch Immunblot mit monoklonalen anti-PSD95-Antikörpern detektiert. PSD95- β bindet an GST-Fusionsproteine, die die L27N-Domäne von MPP4 enthalten. Der Input betrug 0,05 % des gesamten Zelllysats.

Da die L27-Domänen von PSD95 und MPP4 als GST-Fusionsproteine in *pull-down*-Experimenten nur einen relativ geringen Anteil der eingesetzten MPP4- bzw. PSD95-Proteine banden (Abb. 16 und 17), lässt dies vermuten, dass zusätzliche Sequenzen für die Interaktion der beiden Proteine wichtig sind. So wurde bereits gezeigt, dass die SH3- und GUK-Domänen verschiedener MAGUK-Proteine durch intra- oder intermolekulare Interaktion eine integrierte gefaltete Einheit bilden (McGee *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, ob außer den L27-Domänen noch andere Sequenzen an der MPP4-PSD95-Bindung beteiligt sind, wurden MPP4 und beide PSD95-Isoformen in 293-EBNA-Zellen koexprimiert. Bei der anschließenden Immunpräzipitation zeigte sich, dass nur PSD95- β , nicht aber PSD95- α mit anti-MPP4-Antikörpern aufgereinigt werden konnte (Abb. 18). Dementsprechend wurde MPP4 mit anti-PSD95-Antikörpern nur in der Anwesenheit von PSD95- β koimmunpräzipitiert, nicht aber in

den PSD95- α enthaltenden Zelllysaten (Abb. 18). Zusammengefasst weisen diese Ergebnisse stark auf eine selektive Bindung zwischen MPP4 und der PSD95- β -Isoform hin, die durch die Interaktion der L27-Domänen vermittelt wird.

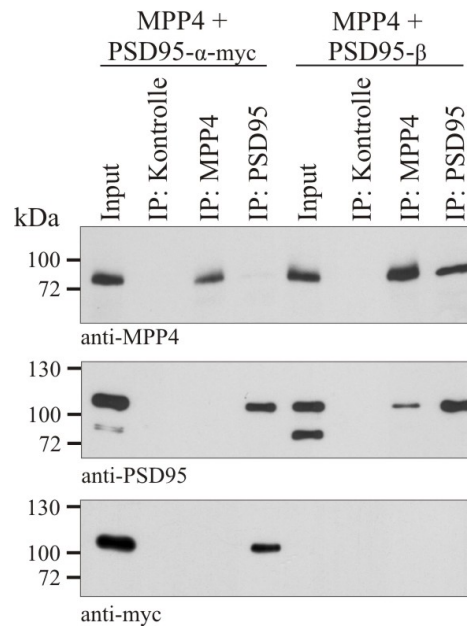


Abbildung 18: MPP4 interagiert selektiv mit der β -Isoform von PSD95. 293-EBNA-Zellen wurden mit MPP4 und myc-markiertem PSD95- α oder PSD95- β kotransfiziert und das Lysat mit polyklonalem anti-MPP4, anti-PSD95 und Kontrollserum immunpräzipitiert. Die Immunblots mit monoklonalen anti-MPP4-, anti-PSD95- und anti-myc-Antikörpern zeigten, dass PSD95- β , nicht aber PSD95- α an MPP4 bindet. Der Input betrug 1 % des gesamten Zelllysats.

2.4 Expression der *Psd95*-Spleißvarianten in der Mausretina

Die verfügbaren anti-PSD95-Antikörper sind gegen Epitope gerichtet, die in beiden Isoformen vorkommen und somit keine Unterscheidung zwischen den Proteinen PSD95- α und PSD95- β erlauben. Daher wurde in der murinen Retina eine Expressionsanalyse zur Abschätzung der relativen Häufigkeit der mRNA der *Psd95- α* - und *Psd95- β* -Isoformen durchgeführt. Mit einer Isoform-spezifischen semi-quantitativen RT-PCR mit RNA aus verschiedenen Mausgeweben (Abb. 19) wurden Unterschiede im Expressionsmuster festgestellt. Dabei zeigte sich, dass *Psd95- α* , entsprechend den Ergebnissen der Immunblots von Hirnextrakten, in Hirngewebe signifikant höher exprimiert wird als *Psd95- β* (Chetkovich *et al.*, 2002a). Im Gegensatz dazu

wurde in der Retina ein hohes Transkriptitonsniveau an *Psd95-β* beobachtet, während *Psd95-α* darin nur schwach exprimiert wurde. Diese Daten deuten an, dass *Psd95-β* die vorrangige *Psd95*-Isoform der adulten Mausretina ist.

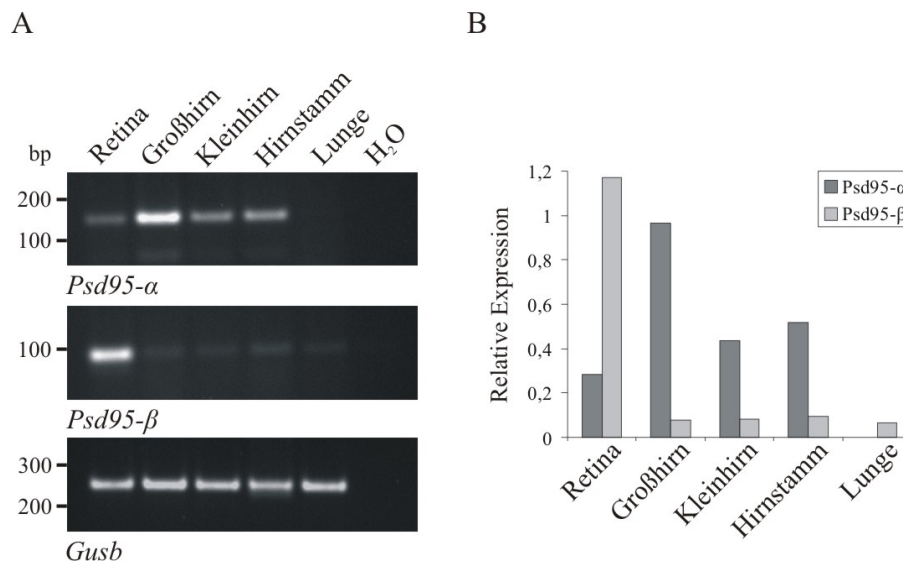


Abbildung 19: Expressionsanalyse der *Psd95*-Spleißvarianten. (A) Die Expressionsprofile von *Psd95-α* und *Psd95-β* in verschiedenen Mausgeweben wurden durch semi-quantitative RT-PCR mittels Isoform-spezifischer Primer bestimmt. Das Haushaltsgen *Gusb* diente als Kontrolle für die RNA-Integrität und zur Normierung der in der PCR eingesetzten cDNA-Menge. (B) Der Graph demonstriert die relative Häufigkeit der *Psd95*-Isoformen in den entsprechenden Geweben. Die dargestellten Werte wurden mittels des *Gusb*-Expressionsniveaus jedes Gewebes (entspricht 1) normiert (Verwendete Primer Appendix IX.1 Tab. 10).

2.5 Analyse der Assoziation zwischen MPP4 und Hsc70

Das Hitzeschock-Erkennungsprotein 70 (engl. *heat shock cognate protein 70*, Hsc70) ist ein konstitutives Mitglied der hochkonservierten Familie der Hitzeschockproteine 70 (HSC70), die eine ATPase-Funktion für multiple zelluläre Prozesse besitzen (Chappell *et al.*, 1986). Es handelt sich bei Hsc70 um ein molekulares Chaperon, das bei der korrekten Faltung und Wegweisung naszierender Polypeptide, beim Zusammenbau von Proteinen aus mehreren Untereinheiten und bei der Antigenpräsentation hilft (Mayer and Bukau, 1998). Immunhistochemische Analysen an Rattenaugen haben Hsc70 in allen retinalen Schichten mit Ausnahme der Photorezeptoraußensegmente detektiert (Dean *et al.*, 1999).

In einem ersten Schritt zur genaueren Untersuchung der identifizierten Assoziation zwischen MPP4 und Hsc70 wurde die Lokalisierung dieser Proteine in der Mausretina durch Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Der anti-Hsc70-Antikörper färbte die Ganglienzellen und eine definierte Region entlang des inneren Rands der OPL stark an (Abb. 20A und B). Zusätzlich konnte eine diffusere Markierung in der OPL, der INL und den inneren Segmenten der Photorezeptoren beobachtet werden.

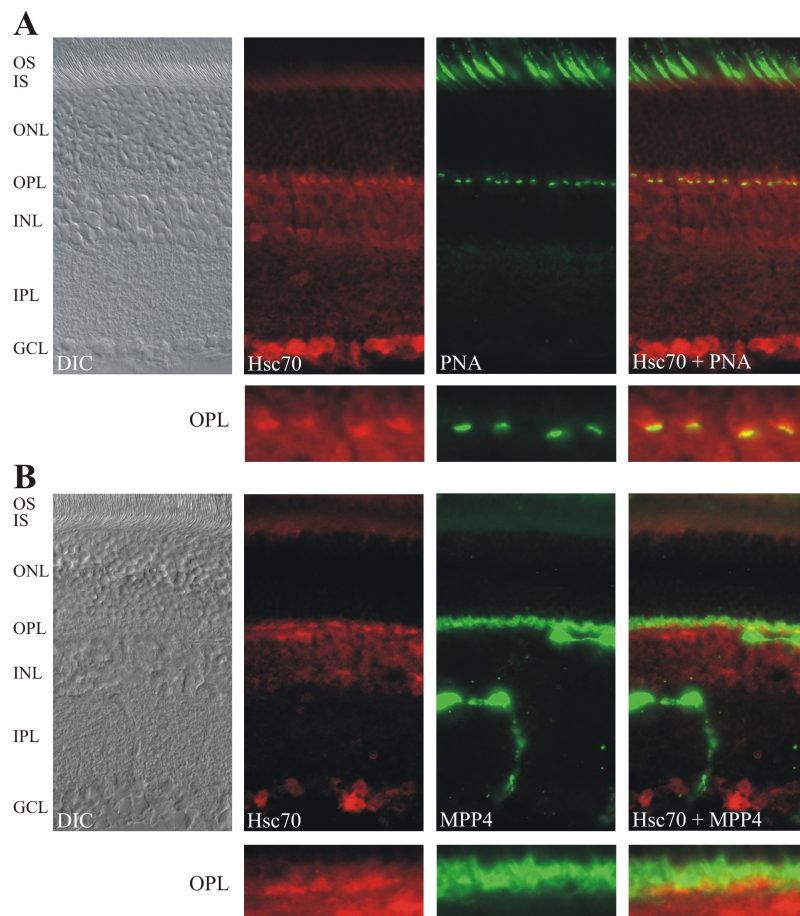


Abbildung 20: Die Lokalisierung von Hsc70 in der Mausretina. (A) Differenzielle Interferenzkontrast (DIC)-Aufnahme und Immunfluoreszenz-Mikrographie eines repräsentativen retinalen Kryoschnittes der Maus, doppelgefärbt mit Alexa 488-konjugiertem PNA (*grün*) und anti-Hsc70-Antikörpern (*rot*). Das überlagerte Immunfluoreszenzbild auf der rechten Seite zeigt, dass die Hsc70-Färbung in der OPL mit der spezifischen Bindung des PNA-Lektins an den Zapfen-Endknöpfchen überlappt (*gelb*). (B) DIC-Aufnahme und Immunfluoreszenz-Mikrographie eines Kryoschnittes der Mausretina, doppelgefärbt mit anti-MPP4 (*grün*) und anti-Hsc70 (*rot*). Das überlagerte Bild weist auf eine Kolo-kalisation der beiden Proteine in der zentralen Sublamina der OPL mit den synaptischen Endigungen der Zapfen hin. Endogenes Maus-IgG in den Blutgefäßen der inneren nukleären und plexiformen Schicht wurde von den Alexa 488-konjugierten sekundären anti-Maus-IgG-Antikörpern gefärbt. Die OPL-Regionen von (A) und (B) sind unter den entsprechenden Übersichten vergrößert dargestellt. OS, äußere Segmente; IS, innere Segmente; ONL, äußere nukleäre Schicht; OPL, äußere plexiforme Schicht; INL, innere nukleäre Schicht; IPL, innere plexiforme Schicht; GCL, Ganglienzellschicht.

Die Überlagerung der Einzelbilder einer Doppelfärbung von Kryoschnitten mit dem anti-Hsc70-Antikörper und *peanut agglutinin* (PNA), der Carbohydrate in den Zapfen-Endknöpfchen färbt, zeigte eine Überlappung der PNA- mit der Hsc70-Immunreaktion (Abb. 20A). Dies wies auf eine maßgebliche Präsenz von Hsc70 in den synaptischen Zapfenendigungen der Maus hin. Die Doppelfärbung mit anti-Hsc70- und anti-MPP4-Antikörpern zeigte, dass die intensive MPP4-Antikörperfärbung der präsynaptischen Membranen in Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren teilweise mit der durch die anti-Hsc70-Antikörper hervorgerufene Immunreaktion in der OPL überlappte (Abb. 20B). Dies deutet wenigstens auf eine partielle Kolokalisierung dieser beiden Proteine in den Synapsen der Photorezeptoren hin.

Um die Interaktion zwischen MPP4 und Hsc70 zu bestätigen, wurden reziproke Immunpräzipitationen mit polyklonalen Antikörpern gegen Hsc70 durchgeführt. Die Western-Blot-Analysen des anti-Hsc70-Immunpräzipitats zeigten, dass MPP4 zusammen mit Hsc70 aus bovinem Retinaextrakt aufgereinigt werden konnte (Abb. 21A). Zudem wurde die physikalische Interaktion zwischen den beiden Proteinen in 293-EBNA-Zellen untersucht, die transient mit MPP4 transfiziert wurden.

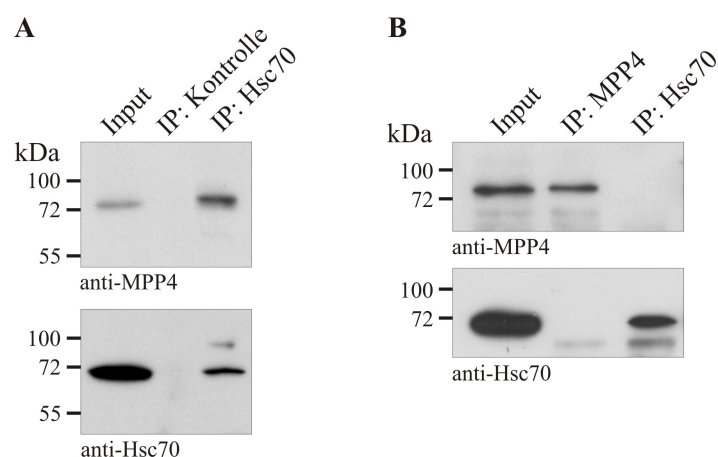


Abbildung 21: Analyse der Assoziation zwischen MPP4 und Hsc70. (A) Immunpräzipitation (IP) mit bovinem Retinalysat und anti-Hsc70-Antikörpern oder Kontrollserum. Die Immunblotanalyse für MPP4 zeigt die Aufreinigung von MPP4 zusammen mit Hsc70 aus boviner Retina. (B) 293-EBNA-Zellen, die endogen Hsc70 exprimierten, wurden transient mit MPP4 transfiziert und für IP-Versuche mit polyklonalen anti-MPP4- oder anti-Hsc70-Antikörpern verwendet. Immunblots wurden, wie angegeben, mit anti-MPP4 oder anti-Hsc70 inkubiert. Der Input betrug (A) 1,5 % und (B) 5 % des gesamten Lysats.

Weder die Immunpräzipitation mit anti-Hsc70-Antikörpern noch die mit anti-MPP4-Antikörpern konnten überexprimiertes MPP4 bzw. endogen exprimiertes Hsc70 mit aufreinen (Abb. 21B). Dies bedeutet, dass in 293-EBNA-Zellen keine direkte Interaktion zwischen Hsc70 und MPP4 besteht.

2.6 Analyse der Assoziation zwischen MPP4 und Recoverin

Recoverin ist ein 23 kDa großes Protein, das durch die Bindung von Ca^{2+} -Ionen mit der Rhodopsinkinase interagiert und deren Fähigkeit, Rhodopsin zu phosphorylieren, inhibiert (Chen *et al.*, 1995). Dadurch kann es die Lebensdauer von photoaktiviertem Rhodopsin kontrollieren. Zusätzlich zu seiner Rolle in der visuellen Kaskade, beeinflusst Recoverin die Signalübertragung zwischen Stäbchen-Photorezeptoren und Bipolarzellen (Sampath *et al.*, 2005). Entsprechend dieser Funktionen ist Recoverin über die gesamte Stäbchenzelle vom Ort der Licht-abhängigen Translokation bis hin zu den synaptischen Endigungen verteilt (Strissel *et al.*, 2005) (Abb. 22). Eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung von Licht-adaptierten retinalen Schnitten der Maus mit anti-MPP4- und anti-Recoverin-Antikörpern zeigte eine große Menge Recoverin in den Photorezeptorsynapsen. Diese Färbung deckte sich teilweise mit der MPP4-Markierung an der Plasmamembran der Photorezeptorendigungen (Abb. 22).

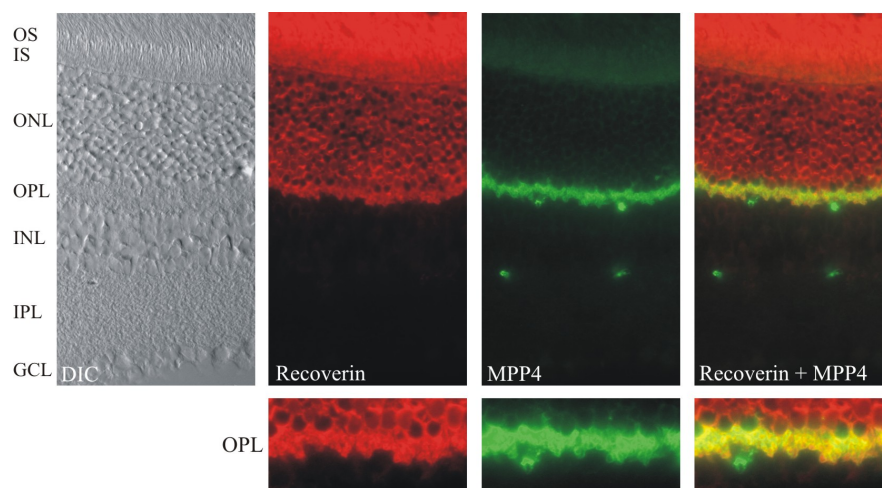


Abbildung 22: Kolokalisierung von Recoverin und MPP4 an den murinen Photorezeptorendigungen. Licht-adaptierte Schnitte der Mausretina wurden simultan mit anti-Recoverin (*rot*) und anti-MPP4 Antikörpern (*grün*) gefärbt. Die Überlagerung ist auf der rechten Seite dargestellt. Die DIC-Abbildung links zeigt die verschiedenen retinalen Schichten. In der äußere plexiforme Schicht (OPL) ist eine deutliche Kolokalisierung (*gelb*) von Recoverin und MPP4 zu erkennen, die in der Darstellung darunter vergrößert gezeigt ist. Abkürzungen siehe Abbildung 20.

Zur Bestätigung der Assoziation zwischen MPP4 und Recoverin in der Retina wurde eine Western-Blot-Analyse von bovinen retinalen anti-Recoverin-Präzipitaten durchgeführt und dabei das kopräzipitierte MPP4 detektiert (Abb. 23A). Immunpräzipitationsexperimente mit anti-MPP4- und anti-Rho-1D4-Antikörpern zeigten allerdings keine direkte Interaktion zwischen MPP4 und Recoverin in 293-EBNA-Zellen, die mit MPP4 und dem Rho-1D4-markiertem Recoverin kotransfiziert worden waren (Abb. 23B).

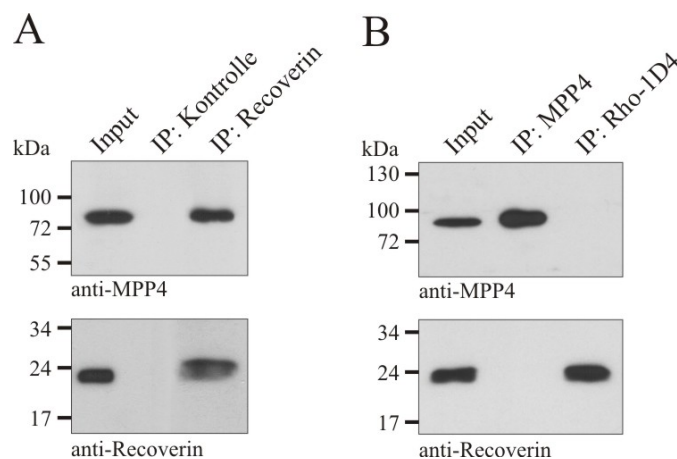


Abbildung 23: Analyse der Interaktion zwischen MPP4 und Recoverin. (A) Immunpräzipitation (IP) mit bovinem Retinalysat und anti-Recoverin-Antikörpern oder Kontrollserum. Die Immunblot-Analyse für MPP4 ergab eine Aufreinigung von MPP4 zusammen mit Recoverin aus der bovinen Retina. (B) Extrakte aus 293-EBNA-Zellen, die mit MPP4 und Rho-1D4-markiertem Recoverin kotransfiziert worden waren, wurden mit polyklonalen anti-MPP4- oder anti-Rho-1D4-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Western-Blot-Analyse wurde, wie angegeben, mit monoklonalen anti-MPP4- oder anti-Recoverin-Antikörpern durchgeführt. Der Input betrug 1,5 % (A) und 2,5 % (B) des gesamten Lysats.

2.7 Isolierung des MPP4-organisierten Proteinkomplexes aus der Membranfraktion der Rinderretina

MPP4 ist in retinalem Gewebe mit der Plasmamembran assoziiert (Stöhr *et al.*, 2003), weshalb auch Membran-assoziierte bzw. -integrierte Komponenten am MPP4-Proteinkomplex beteiligt sein könnten. Um solche Proteinkomponenten zu identifizieren wurde die Immunaффinitätschromatographie mit der MPP4-3H10-Antikörpersäule ebenfalls auf die solubilisierete Membranfraktion boviner Retina angewendet. Zunächst wurde die Funktionalität der Immunaффinitätsäule mit der SDS-solubilisiereten Membranfraktion im Vergleich zu der

zytoplasmatischen Fraktion erfolgreich bestätigt (Abb. 24). Der Immunblot zeigte bei beiden Retinafraktionen eine deutliche Anreicherung von MPP4 in den Eluat.

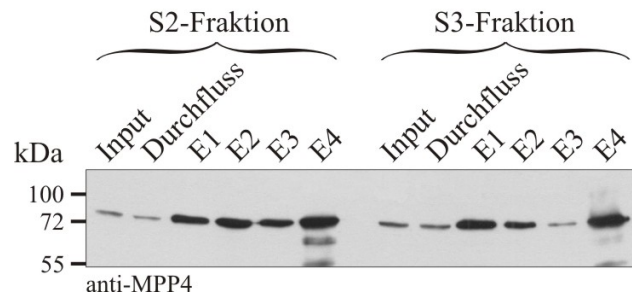


Abbildung 24: Funktionalität der Immunaффinitätschromatographie mit gelösten Membranproteinen. Die zytoplasmatische (S2) und SDS (1 %)-solubilisierte Membranfraktion (S3) von boviner Retina wurden mit der MPP4-3H10-Immunaффinitätsmatrix inkubiert. Die Säule wurde dreimal durch die Zugabe eines sauren Puffers eluiert (E1-3). Die anschließende Elution mit Laemmli-Puffer (E4) zeigte, dass nicht das gesamte MPP4-Protein durch den pH-Wechsel eluiert wurde. Die Inputs betragen beide 0,25 % des eingesetzten Proteinextraktes. Der Immunblot wurde mit monoklonalen anti-MPP4 Antikörpern inkubiert.

Membranproteine sind aufgrund ihrer Beschaffenheit für die Auftrennung über 2D-Gelelektrophorese meistens nicht geeignet. Daher wurden immunpräzipitierte Proteine aus der Membranfraktion über 1D-SDS-PAGE aufgetrennt. Da die Proteine hierbei direkt mit Laemmli-Puffer von der Matrix eluiert werden können, ist die Ausbeute relativ hoch. Abbildung 25 zeigt ein typisches, mit kolloidalem Coomassie gefärbtes Gel, auf dem neun, deutlich sichtbare Banden erkennbar sind.

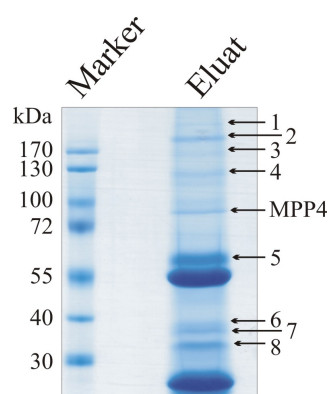


Abbildung 25: Analyse der bovinen retinalen Membranproteine, die zusammen mit MPP4 bei der Immunaффinitätschromatographie aufgereinigt wurden. SDS-Polyacrylamidgel, das mit kolloidalem Coomassie gefärbt wurde. Deutliche Proteinbanden, die mit der MPP4-3H10-Säule aufgereinigt und analysiert wurden, sind durch Pfeile markiert. Die Identität der mit MPP4 bezeichneten Bande wurde aufgrund ihrer Größe geschätzt und massenspektrometrisch bestätigt. Die kräftig gefärbten Banden bei 25 und 55 kDa stammen vermutlich von den leichten und schweren Ketten der MPP4-3H10-Antikörper.

Die massenspektrometrische Analyse identifizierte die Bande zwischen 72 und 100 kDa eindeutig als MPP4. Alle anderen Banden ergaben ebenfalls saubere Spektren, die sich allerdings in keinem Fall bekannten Proteinen zuordnen ließen. Die MALDI-TOF Peptidmassen-Fingerabdrücke des tryptischen Verdauens von Bande Nr. 1 und von MPP4 (siehe Abb. 25) sind exemplarisch im Appendix IX.2 in Abb. 52 dargestellt.

3 FUNKTIONELLE ANALYSE DER V301N-MUTATION IN DER PDZ-DOMÄNE VON MPP5

Im zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurde die V301N-Mutation in der PDZ-Domäne des MAGUK-Proteins MPP5 analysiert, um die Funktion dieses Proteins und seine Rolle innerhalb des Multiproteinkomplexes aufzuklären.

3.1 Untersuchung der Effekte von Mutationen in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Bindung zu Crumbs-Proteinen

Zunächst wurde die Auswirkung von Punktmutationen in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Interaktion mit Crumbs im Hefe-Zwei-Hybrid-System untersucht. Hierzu wurde die beschriebene *nok^{m227}*-Mutation des Zebrafisches in MPP5 generiert, die beim humanen und murinen MPP5 dem nicht konservativen Austausch der hydrophoben Aminosäure Valin gegen das hydrophile Asparagin an Position 301 innerhalb der PDZ-Domäne (V301N) entspricht. Darüber hinaus wurden zwei weitere PDZ-Mutanten hergestellt, bei denen konservierte Aminosäuren der PDZ-Domäne ausgetauscht wurden. Bei der Mutation an Position 314 wurde die konservierte Aminosäure Valin durch Asparagin (V314N) ersetzt. Dadurch sollte die Bindungsfähigkeiten der PDZ-Domäne deutlich reduziert werden, da diese α B1-Position an der Bindungsspezifität der PDZ-Domäne für Liganden entscheidend beteiligt ist (Sheng and Sala, 2001). Der Aminosäureaustausch an Position 332 tauscht ein konserviertes Leucin gegen Lysin aus (L332K). Diese Mutation erwies sich bei dem PDZ-Adapterprotein Mystique als wichtig für die Assoziation mit dem Zytoskelett (Loughran *et al.*, 2005).

Im Hefe-Zwei-Hybrid-Ansatz diente der C-Terminus von CRB1 im Vektor pGADT7 als „Beute“ und die pGBKT7-PDZ-MPP5-Konstrukte als „Köder“. Die Hefezellen wurden jeweils mit „Beute“ und „Köder“ transformiert und in verschiedenen Verdünnungsstufen auf Minimalplatten aufgetropft, auf denen nur Klone mit interagierenden Proteinen wachsen sollten. Als Negativkontrolle wurde pGBKT7-MPP4 als „Beute“ verwendet (Abb. 26).

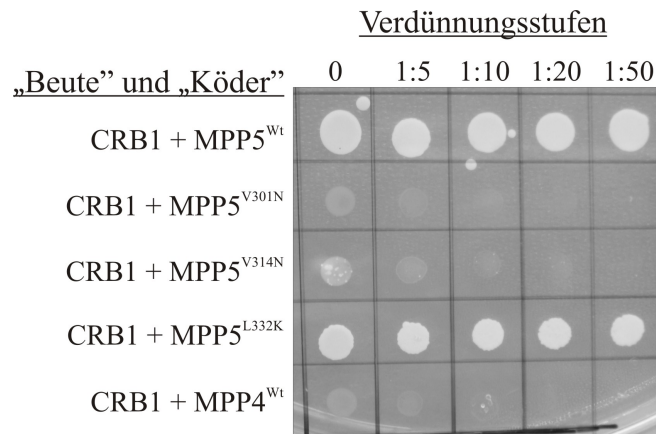


Abbildung 26: Interaktionstest zwischen dem C-Terminus von CRB1 und der PDZ-Domäne des MPP5 im Hefe-Zwei-Hybrid-System. Doppelt-transformierte Hefezellen wurden auf -HALT-Minimalplatten in verschiedenen Verdünnungsstufen (0, 1:5, 1:10, 1:20 und 1:50) aufgetropft. Hefezellen, die CRB1 und MPP5^{Wt} bzw. die PDZ-Mutante MPP5^{L332K} exprimierten zeigten ein starkes Wachstum. CRB1 und die PDZ-Mutanten MPP5^{V301N} und MPP5^{V314N} enthaltenden Hefezellen wuchsen nicht (MPP5^{V301N}) oder kaum (MPP5^{V314N}). Hefezellen, transformiert mit CRB1 und der PDZ-Domäne des MPP4-Proteins wuchsen nicht (Negativkontrolle).

Die Hefe-Zwei-Hybrid-Experimente bestätigen die bekannte Interaktion zwischen dem C-Terminus von CRB1 und der PDZ-Domäne von MPP5 (Bhat *et al.*, 1999; Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2002; Roh *et al.*, 2003). Die PDZ-Mutanten MPP5^{V301N} und MPP5^{V314N} wiesen im Hefe-Zwei-Hybrid-Test keine oder nur eine sehr schwache Bindung zum CRB1 auf, was sich im mangelnden Wachstum der transformierten Hefezellen niederschlägt (Abb. 26). Die PDZ-Mutation MPP5^{L332K} scheint die Bindung mit CRB1 nicht zu beeinflussen, da entsprechende Konstrukte ein zum wildtypischen MPP5 vergleichbares Hefewachstum anzeigten (Abb. 26).

Zur Quantifizierung der Wechselwirkungsstärke zwischen dem C-Terminus von CRB1 und der PDZ-Domäne von MPP5 wurde ein β -Galaktosidase-*assay* durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass bei gleichzeitiger Expression der wildtypischen PDZ-Domäne von MPP5 (MPP5^{Wt}) und dem intrazellulären C-Terminus von CRB1 erwartungsgemäß eine sehr hohe Umsatzrate der β -Galaktosidase zu beobachten war (Abb. 27). Bei der Expression aller MPP5-PDZ-Mutanten konnten im Vergleich dazu signifikant niedrigere Umsatzzaten aufgezeichnet werden. Dies deutete darauf hin, dass alle drei Mutationen die Bindungsfähigkeit der MPP5-PDZ-Domäne zum C-Terminus des CRB1 deutlich verminderten, wobei der Effekt der V301N-Mutation am größten zu sein schien (Abb. 27). Der Interaktionstest (Abb. 26) und der β -

Galaktosidase-*assay* (Abb. 27) führten im Fall der PDZ-Mutante L332K zwar zu unterschiedlichen Ergebnissen, aber da der β -Galaktosidase-*assay* den genaueren Test darstellt, spiegelt dieser am ehesten die tatsächlichen Verhältnisse wieder.

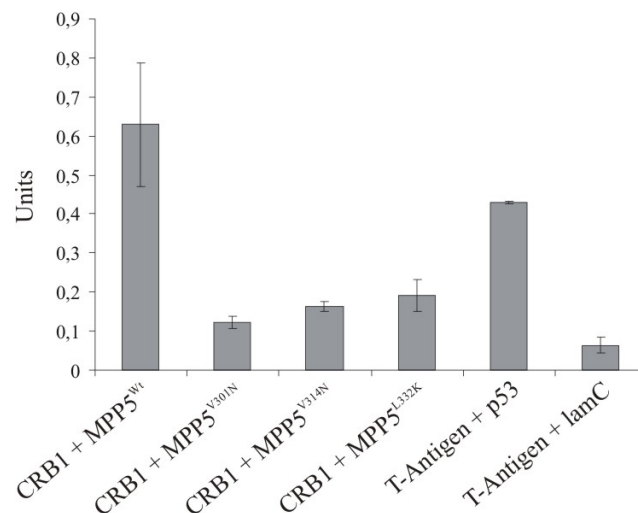


Abbildung 27: β -Galaktosidase-*assay* zur quantitativen Bestimmung der Auswirkung von Mutationen in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Bindungsfähigkeit zu CRB1. Als Positivkontrolle diente das SV40 T-Antigen und das p53, die eine sehr starke Interaktion in Hefezellen zeigen. Als Negativkontrolle wurden das SV40 T-Antigen und Lamin C verwendet, die nicht miteinander interagieren. Die Aktivität der β -Galaktosidase ist in Units angegeben, wobei eine Unit der Menge Enzym entspricht, die 1 μ mol ONPG (O-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid) pro Minute pro Zelle hydrolysiert. Von jedem Ansatz wurden Triplikate gemessen und entsprechende Standardabweichungen eingezeichnet.

Im Hefe-Zwei-Hybrid-System konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die V301N-Mutation auch die Interaktion des MPP5 zu den C-Termini der beiden anderen CRB-Proteine, CRB2 und CRB3, stark beeinträchtigt (Abb. 28).

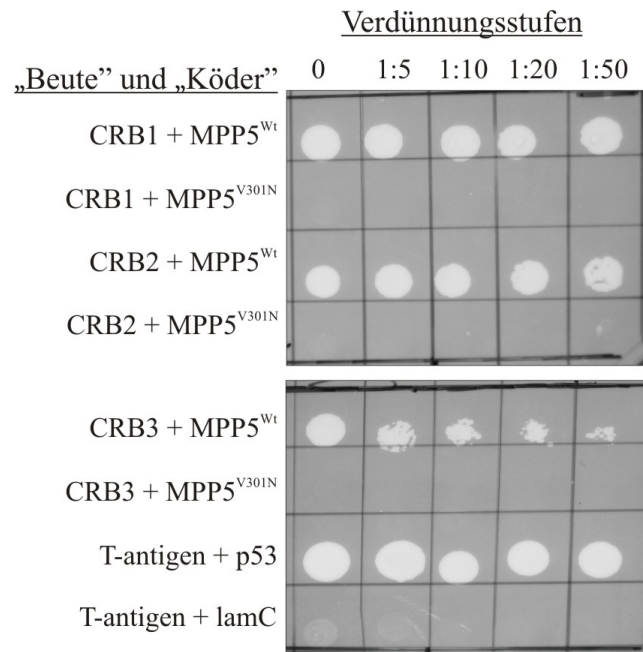


Abbildung 28: Die V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5 beeinträchtigt die Bindung an CRB1, CRB2 und CRB3. Doppelt-transformierte Hefezellen wurden auf -HALT-Minimalplatten in den angegebenen Verdünnungsstufen aufgetropft. Nur die wildtypische PDZ-Domäne von MPP5 interagiert mit CRB1, CRB2, und CRB3, die V301N-Mutante zeigte keine Bindung. Positiv- und Negativkontrolle wie in Abbildung 27.

Um die veränderte Bindungseigenschaft zwischen den Crumbs-Proteinen und MPP5^{V301N} zu bestätigen, wurde zusätzlich ein *GST-pulldown-assay* mit dem C-Terminus des CRB1 und den Proteinen MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} (in voller Länge) durchgeführt. Es zeigte sich hierbei, dass nur das wildtypische MPP5, nicht aber das mutante MPP5^{V301N} an CRB1 band (Abb. 29).

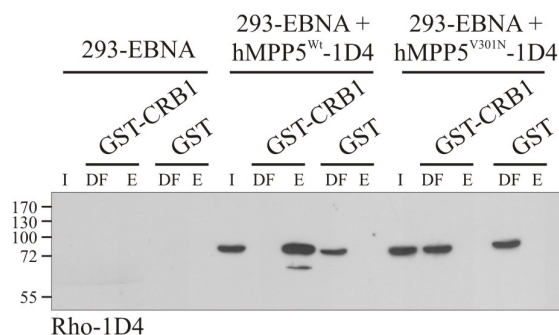


Abbildung 29: GST-pulldown-assay zur Untersuchung der Auswirkung der V301N-Mutation auf die Wechselwirkung mit CRB1. Die MPP5-Proteine wurden mit einem C-terminalen Rhodopsin-tag exprimiert, der im Western-Blot mit dem monoklonalen Rho-1D4-Antikörper nachgewiesen werden konnte. Als Negativkontrollen wurde Zelllysate von nicht transfizierten 293-EBNA-Zellen sowie GST-Sepharosekügelchen verwendet. I, Input (= 4 % des gesamten Zelllysats); DF, Durchfluss mit ungebundenen Proteinen; E, Eluat.

3.2 Einfluss der V301N-Mutation auf die Interaktion mit Veli3 und MUPP1

Um festzustellen, ob die V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5 einen Einfluss auf die Bindung zu den bekannten Interaktionspartnern Veli3 und MUPP1 (engl. *multi-PDZ domain protein 1*) hat (Kamberov *et al.*, 2000; Roh *et al.*, 2002), wurden ebenfalls GST-pulldown-assays durchgeführt. Da die L27-Domänen von MUPP1 und Veli3 mit der N-terminalen, bzw. der C-terminalen L27-Domäne von MPP5 heterodimerisieren (Kamberov *et al.*, 2000; Roh *et al.*, 2002), sollte trotz mutierter PDZ-Domäne eine Bindung stattfinden. Hierzu wurde Veli3 mit einem Histidin-tag an Nickel-Sepharose bzw. der N-terminale Teil von MUPP1 (Aminosäure 1–129) als GST-Fusionsprotein an GST-Sepharose immobilisiert und mit MPP5 inkubiert. Es konnte hierbei gezeigt werden, dass sowohl MPP5^{Wt}, als auch MPP5^{V301N} an Veli3 und MUPP1 binden können (Abb. 30A und B).

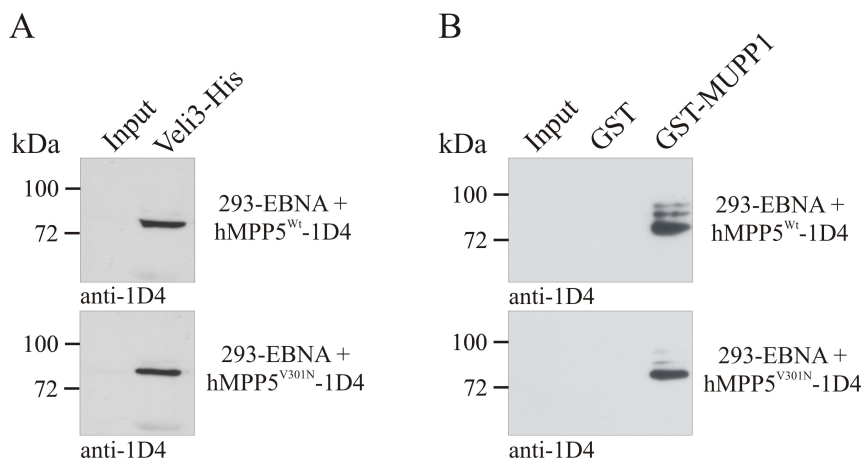


Abbildung 30: Die Interaktion von MPP5 mit Veli3 und MUPP1 wird durch die V301N-Mutation nicht beeinflusst. (A) Histidin-getaggttes Veli3 und (B) GST-MUPP1 reinigten sowohl MPP5^{Wt} als auch MPP5^{V301N} aus dem Zelllysats auf. Als Negativkontrolle wurden in (B) GST-Sepharosekügelchen verwendet. Der geladene Input betrug 1,5 % des gesamten Zelllysats. Die Menge der überexprimierten MPP5-Proteine lag unterhalb der Detektionsgrenze des Western-Blots.

Zusammengefasst demonstrieren diese Bindungsversuche, dass die *nok*^{m227}-homologe V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5 die Interaktion zwischen MPP5 und CRB1 verhindert oder zumindest stark beeinträchtigt, jedoch keinen Einfluss auf die Bindung von Veli3 oder MUPP1 hat.

3.3 Stabile MDCK-Zelllinien zur Untersuchung der Auswirkung der V301N-Mutation

Für die Untersuchung von Proteinen, die am Aufbau der Zellpolarität beteiligt sind, stellen die MDCK-Zelllinien („Madin-Darby canine kidney“) ein etabliertes Zellsystem dar (Roh *et al.*, 2002; Makarova *et al.*, 2003; Roh *et al.*, 2003; Straight *et al.*, 2004). Mit Hilfe dieser Zelllinien sollte der Einfluss der V301N-Mutation auf die Lokalisierung des MPP5-Proteins und dessen Auswirkungen auf das Zellsystem analysiert werden.

3.3.1 Herstellung der stabilen MPP5-MDCK-Linien

Die zwei verschiedenen MDCK-Zelllinien MDCK-C7 (Gekle *et al.*, 1994) und MDCKII (Richardson *et al.*, 1981) wurden mit MPP5^{Wt} bzw. MPP5^{V301N} stabil transfiziert. In den MDCK-C7-Zellen wurde das MPP5-Protein mit C-terminalem Rho-1D4-tag, in den MDCKII-Zellen mit N-terminalem FLAG-tag exprimiert.

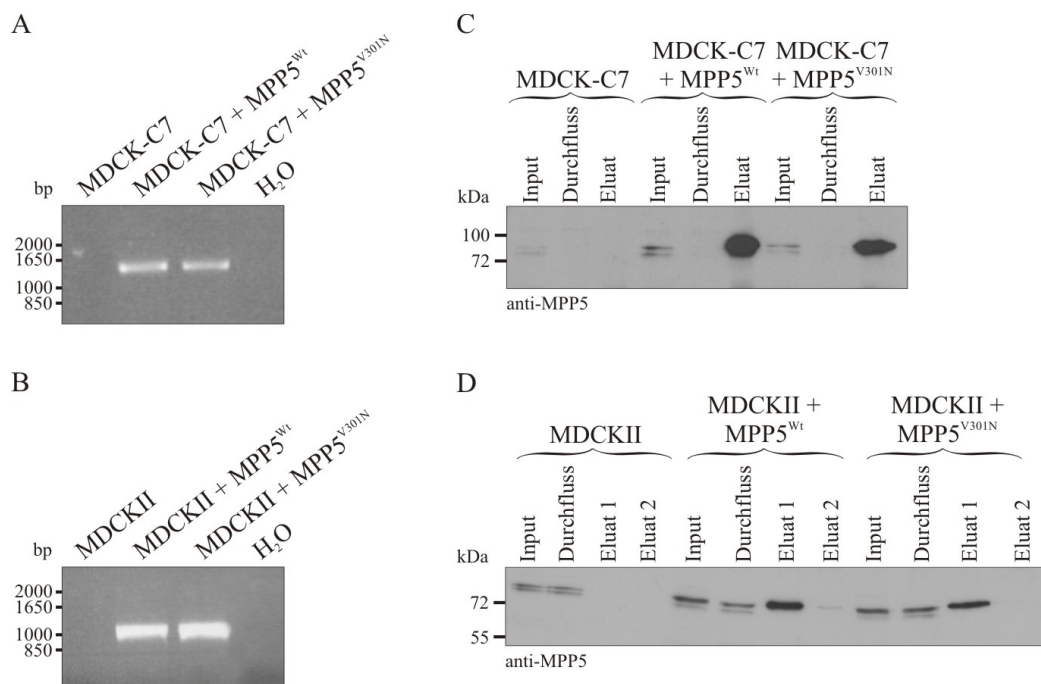


Abbildung 31: Nachweis von MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} in stabil transfizierten MDCK-Zelllinien. RT-PCR mit RNA aus stabil transfizierten (A) MDCK-C7- und (B) MDCKII-Zellen wies die Transkription von MPP5^{Wt}-1D4 und MPP5^{V301N}-1D4, bzw. FLAG-MPP5^{Wt} und FLAG-MPP5^{V301N} nach. (C) Rho-1D4 getaggetes MPP5 in MDCK-C7-Zellen wurde mit anti-Rho-1D4-Antikörper präzipitiert (Eluat) und im Western-Blot mit polyklonalen anti-MPP5-Antikörpern nachgewiesen. (D) FLAG-getaggetes MPP5 in MDCKII-Zellen wurde mit anti-FLAG-Antikörper präzipitiert (Eluat) und im Western-Blot mit polyklonalen anti-MPP5-Antikörpern bestätigt. Die Doppelbanden in den Inputs in (B) und (D) sind auf die Antikörperbindung an in MDCK-Zellen endogen exprimiertes MPP5 zurückzuführen. Die Inputs betragen jeweils 2 % des Gesamtlysats.

Über RT-PCR von verschiedenen stabil transfizierten MDCK-Zelllinien mit Primern, die nur das heterolog exprimierte *MPP5* amplifizierten und anschließender Sequenzierung der PCR-Produkte konnte die Transkription von *MPP5^{Wt}-1D4* und *MPP5^{V301N}-1D4*, bzw. *FLAG-MPP5^{Wt}* und *FLAG-MPP5^{V301N}* nachgewiesen werden (Abb. 31A und B). Außerdem konnten die entsprechenden *MPP5^{Wt}*- und *MPP5^{V301N}*-Proteine im Western-Blot bestätigt werden (Abb. 31C und D). Für jede MDCK-Zelllinie standen schließlich je zwei *MPP5^{Wt}*- und *MPP5^{V301N}*-Linien zur Verfügung, die von verschiedenen Klonen stammten und auch nach vielen Passagen ein unverändertes Wachstum sowie eine konstante, heterologe *MPP5*-Proteinexpression aufwiesen.

3.3.2 Zelluläre Lokalisierung von *MPP5^{V301N}* in MDCK-Zellen

Zur zellulären Lokalisierung von *MPP5^{Wt}* und *MPP5^{V301N}* wurde je nach stabiler Zelllinie eine immunzytochemische Untersuchung mit anti-Rho-1D4- oder anti-FLAG-Antikörpern durchgeführt. Zusätzlich wurden Veli3 und das endogene *MPP5* angefärbt.

Das überexprimierte *MPP5^{Wt}*-Protein wurde in konfluenten MDCK-C7- und MDCKII-Zellen an den Zellkontaktstellen gefunden (Abb. 32A und C) und verhielt sich entsprechend dem endogen exprimierten *MPP5* (Roh *et al.*, 2002 und Abb. 32 B und D). Das *MPP5^{V301N}*-Protein war dagegen in MDCK-C7 nur sehr schwach im Zytoplasma nachweisbar und fehlte an den Zellkontakten (Abb. 32B). In stabil transfizierten MDCKII-Zellen war ein Großteil von *MPP5^{V301N}* im Zytoplasma, wobei sich geringe Mengen auch an den Zell-Zell-Kontakten fanden (Abb. 32D). Endogenes *MPP5* und Veli3 ließen sich in den mutanten Zellen nach wie vor an den Zellverbindungen nachweisen. Diese immunzytochemischen Daten zeigten deutlich, dass die V301N-Mutation zu einer fehlerhaften Lokalisierung des *MPP5*-Proteins in der Epithelzelle führt. Die Expression von *MPP5^{V301N}* beeinträchtigte jedoch nicht die Lokalisierung des Bindungspartners Veli3 und des endogenen *MPP5*-Proteins.

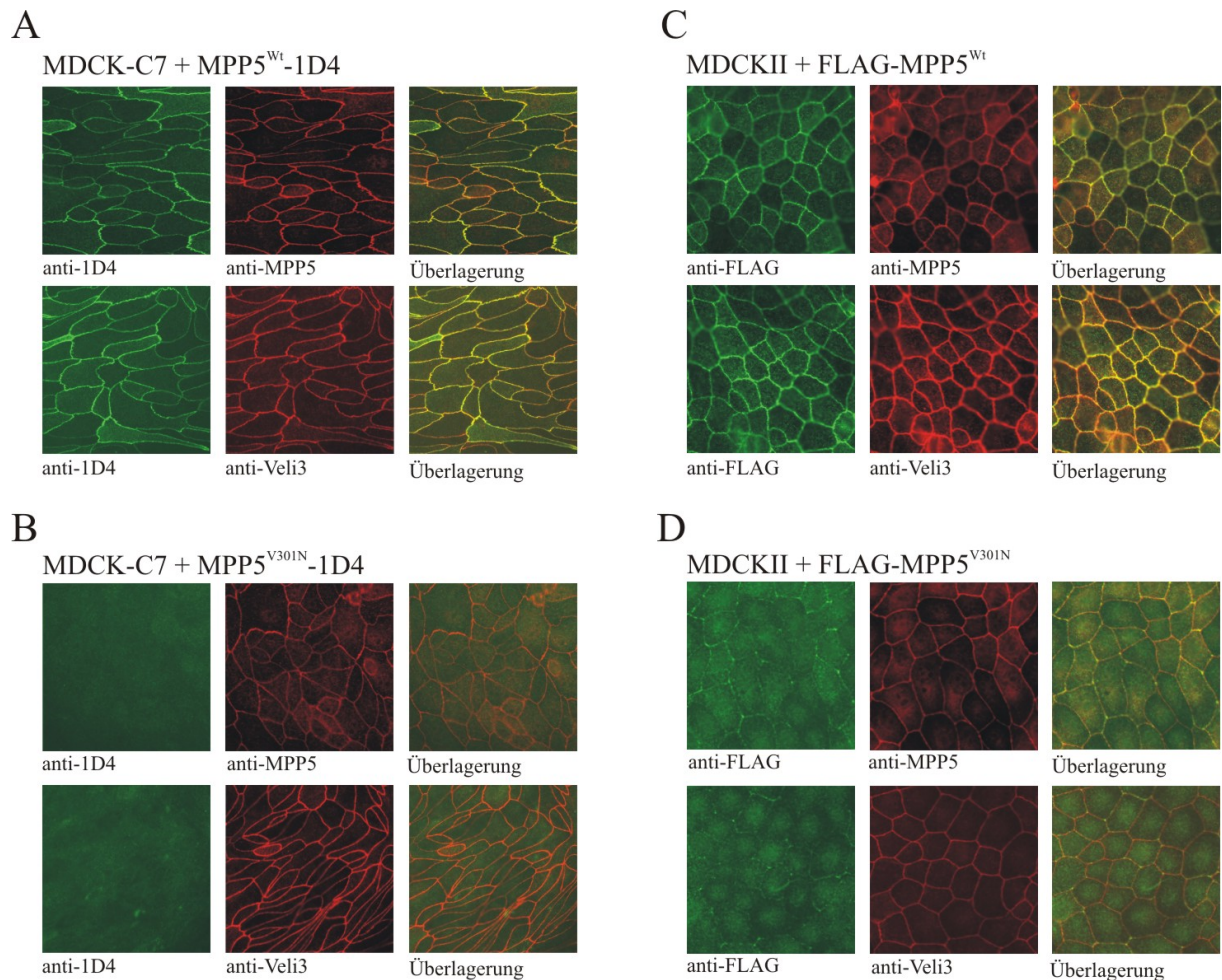


Abbildung 32: Immunzytochemische Untersuchung zur zellulären Lokalisierung von MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} in stabilen MDCK-Zelllinien. (A) Das mit anti-Rho-1D4-Antikörpern angefarbte MPP5^{Wt} (*grün*) kolokalisierte mit endogenem MPP5 (*rot*) und Veli3 (*rot*) an den Zellverbindungen in stabil transfizierten MDCK-C7-Zellen. (B) MPP5^{V301N} konnte in stabil transfizierten MDCK-C7-Zellen schwach im Zytoplasma nachgewiesen werden, die Lokalisierung von endogenem MPP5 und Veli3 an den Zellverbindungen war hingegen unverändert. (C) In stabil transfizierten MDCKII-Zellen wurde MPP5^{Wt} mit anti-FLAG-Antikörpern angefarbt. Die Überlagerung der beiden jeweils linken Bilder zeigte die Kolokalisierung von endogenem MPP5 und Veli3 an den Zellkontaktstellen. (D) Stabil exprimiertes MPP5^{V301N} war zum größten Teil im Zytoplasma und punktuell an den Zellverbindungen nachweisbar, wo es mit endogen exprimiertem MPP5 und Veli3 kolokalisierte.

In einem weiteren Experiment sollte der mögliche Einfluss von überexprimierten MPP5^{V301N} auf die zelluläre Verteilung von CRB3 untersucht werden. Da kein Antikörper gegen den Bindungspartner CRB3 zur Verfügung stand, wurden MDCK-C7-Zellen hergestellt, die MPP5^{V301N} und N-terminal FLAG-getaggetes CRB3 stabil exprimierten. Die immunzytochemische Untersuchung zeigte, dass FLAG-CRB3 durch MPP5^{V301N} in seiner Lokalisierung nicht beeinflusst wurde und weiterhin an der *Zonula occludens* zu finden war (Makarova *et al.*, 2003) (Abb. 33).

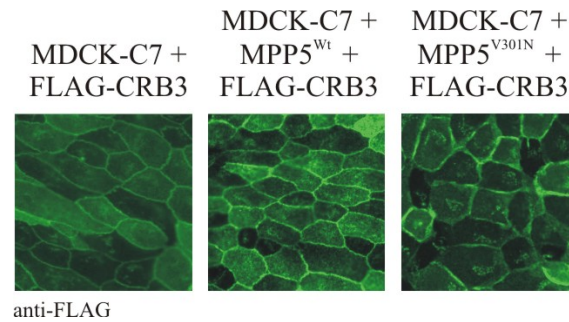


Abbildung 33: Nachweis von stabil transfiziertem CRB3 in MDCK-C7-Linien. CRB3 wurde in der immunzytochemischen Untersuchung mit anti-FLAG-Antikörpern in MDCK-C7-, MDCK-C7-MPP5^{wt}- und MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen an den Zell-Zell-Kontaktstellen nachgewiesen.

3.4 Die *Zonula occludens* in stabilen MPP5-MDCK-Zellen

3.4.1 Einfluss der V301N-Mutation in der PDZ-Domäne von MPP5 auf die Ausbildung der *Zonula occludens*

Anhand einer reduzierten Expression von MPP5, PATJ bzw. Lin-7 durch *knock-down*-Experimente war bereits gezeigt worden, dass schon die Expressionsänderung eines einzelnen Mitglieds der *Zonula occludens*-assoziierten Proteine zu einer verlangsamten Bildung der *Zonula occludens* führen kann (Straight *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005; Straight *et al.*, 2006). Die Auswirkung von stabil überexprimiertem MPP5 V301N- auf die zeitabhängige Ausbildung der *Zonula occludens* in MDCK-C7- und MDCKII-Zellen wurde mit Hilfe des Calcium-*switch*-assays untersucht. Der hierbei entscheidende Faktor ist die synchron ausgelöste Neubildung der Zellkontakte durch Zugabe von Ca²⁺, das vorher entzogen worden war. Bei der Entwicklung der *Zonula occludens* spielt Ca²⁺ eine entscheidende Rolle, da es das Transmembranprotein E-Cadherin aktiviert, welches zusammen mit Catenin das Protein Zonula Occludens-1 (ZO-1) an die Zell-Zell-Kontakte bringt. Durch die Interaktion mit anderen *Zonula occludens*-Proteinen wird ZO-1 an der lateralen Membran frei gesetzt, wodurch sich die *Zonula occludens* ausbildet (Rajasekaran *et al.*, 1996).

Zur Geschwindigkeitsmessung der *Zonula occludens*-Reorganisation wurde in bestimmten Zeitabständen eine Antikörperfärbung gegen ZO-1 durchgeführt. MDCK-Zellen, die in Ca²⁺-freiem Medium wuchsen, zeigten eine abgerundete Morphologie und besaßen keine *Zonula*

occludens, weshalb ZO-1 im Zytoplasma vorlag (Abb. 34, $t=0$). Es zeigte sich, dass die vollständige Wiederherstellung der *Zonula occludens* bei MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen im Vergleich zu den MDCK-C7-MPP5^{Wt} und MDCK-C7-Zellen verzögert war. Während bei den beiden letzteren Linien die *Zonula occludens* nach neun Stunden ($t = 9$) intakt war, zeigten die MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen auch nach 25 Stunden noch einige Lücken bei den Zellverbindungen (Abb. 34A). Entsprechend verhielt es sich bei den MDCKII-Zellen, allerdings war hier die Regeneration der Zellkontakte bei MDCKII und MDCKII-MPP5^{Wt} bereits nach fünf Stunden ($t = 5$) abgeschlossen, wohingegen diese bei den MDCKII-MPP5^{V301N}-Zellen bis zu zehn Stunden dauerte (Abb. 34B). Der Calcium-*switch-assay* wurde zur Bestätigung mehrfach mit unterschiedlichen Klonen durchgeführt und führte jeweils zum selben Ergebnis.

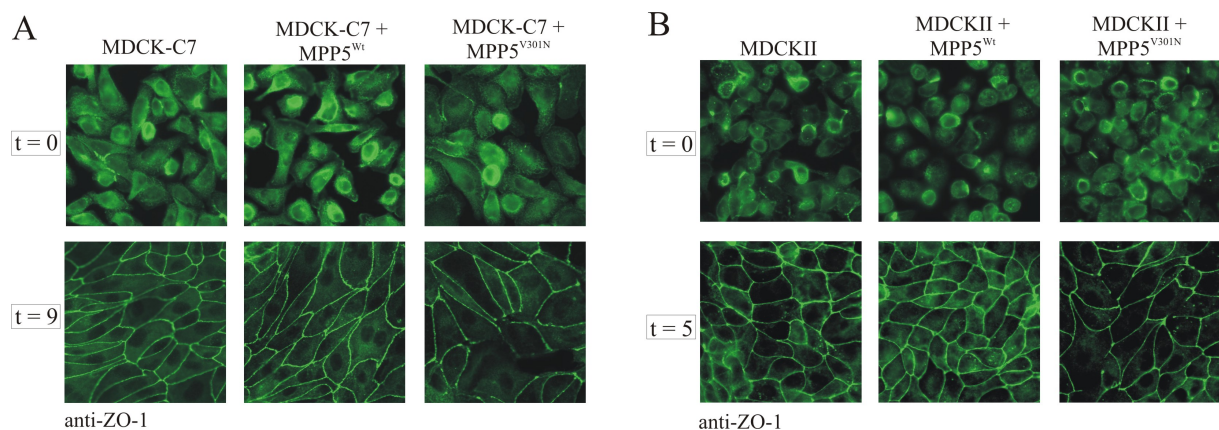


Abbildung 34: Die V301N-Mutation verlangsamt die Regeneration der *Zonula occludens*. Calcium-*switch-assay* mit (A) MDCK-C7-, MDCK-C7-MPP5^{Wt}- und MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen und (B) MDCKII-, MDCKII-MPP5^{Wt}- und MDCKII-MPP5^{V301N}-Zellen. Neun Stunden ($t = 9$, A), bzw. 5 Stunden ($t = 5$, B) nach Zugabe des Calcium-haltigen Mediums waren die Zellkontakte der MDCK-C7-MPP5^{V301N}- und MDCKII-MPP5^{V301N}-Zellen noch nicht wieder vollständig ausgebildet. Dagegen zeigten MDCK-C7/MDCKII und MDCK-C7-MPP5^{Wt}/MDCKII-MPP5^{Wt} lückenlose Zellverbindungen, wie die Färbung mit den monoklonalen anti-ZO-1 Antikörpern zeigte.

3.4.2 Einfluss der V301N-Mutation in der MPP5-PDZ-Domäne auf die Beschaffenheit der *Zonula occludens*

3.4.2.1 Messung des transepithelialen Widerstands

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die verlangsamte Polarisierung, hervorgerufen durch den Verlust von MPP5 oder dessen Bindungspartner PATJ, eine reduzierte Festigkeit der *Zonula occludens* zur Folge hatte. Im Fall der fehlenden MPP5-Expression trat dieser Effekt nur

vorübergehend ein, während der Verlust von PATJ eine dauerhafte Schwächung zur Folge hatte (Straight *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005). Um die Integrität einer konfluenten Zellschicht und die Festigkeit der *Zonula occludens* zu analysieren, wird der transepitheliale elektrische Widerstand (engl. *transepithelial electrical resistance*, TER) gemessen.

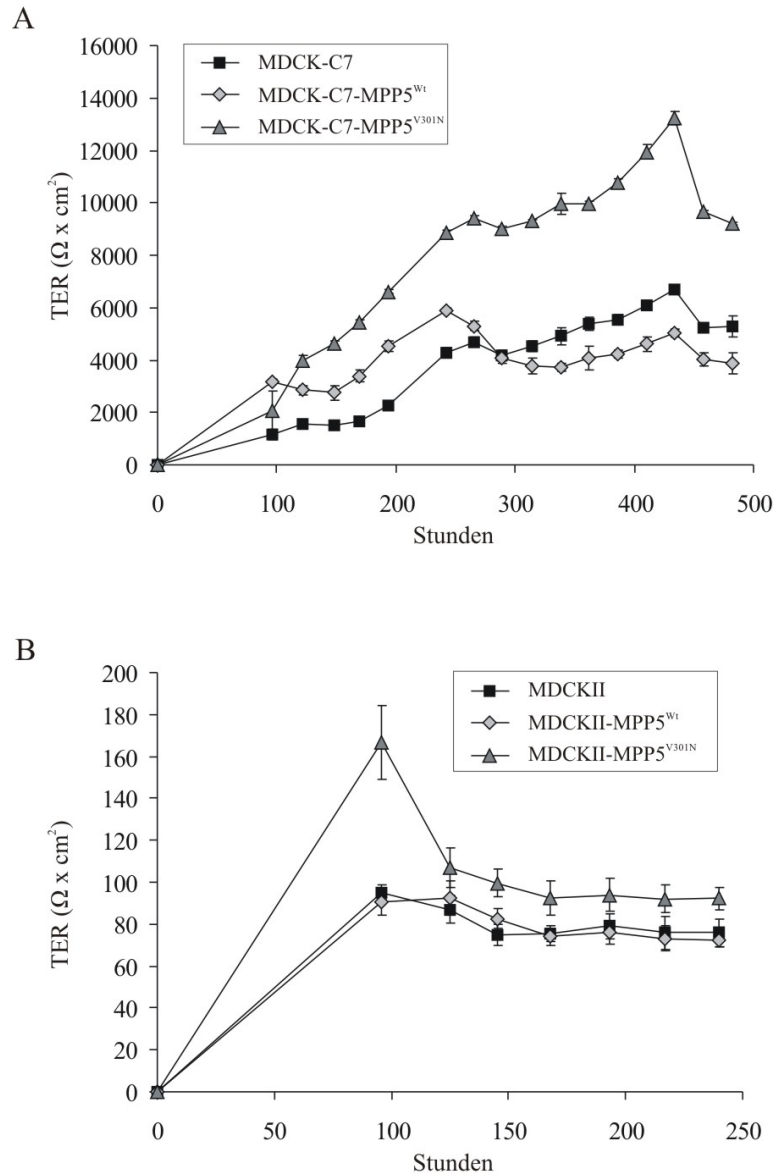


Abbildung 35: Messung des transepithelialen Widerstands. Die nicht transfizierten Zelllinien MDCK-C7 und MDCKII wurden in je 2 Schälchen auf Filtereinsätzen ausgesät. Von den stabilen Linien, die MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} exprimierten, wurden jeweils beide Klone einmal ausgesät. Die Duplikate jeder Zelllinie wurden jeweils dreimal gemessen und gemittelt ($n = 6$). Der Zeitpunkt 0 bezeichnet die Aussaat der Zellen. Der transepitheliale elektrische Widerstand ist in $\Omega \times \text{cm}^2$ angegeben, der Hintergrundwiderstand wurde von den Mittelwerten abgezogen, Fehlerbalken geben die Standardabweichung der Mittelwerte an. **(A)** Die MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen zeigten einen deutlich höheren Widerstand als MDCK-C7 und MDCK-C7-MPP5^{Wt}, der sich über den gemessenen Zeitraum kontinuierlich aufbaute, bis die Zellen abstarben. **(B)** Die Werte der MDCKII-MPP5^{V301N}-Zellen erreichten ein Maximum nach 100 Stunden um dann wieder abzufallen. Im Vergleich zu MDCKII und MDCKII-MPP5^{Wt} erreichten die MDCKII-MPP5^{V301N}-Zellen einen leicht erhöhten Widerstand.

Dabei spiegelt der gemessene Widerstand die Anzahl der transportierten geladenen Partikeln wie Na^+ - und K^+ -Ionen durch die Zellschicht wieder. Je höher der Widerstand ist, desto weniger Ionen passieren die Zellschicht. Von jeder Zelllinie wurden jeweils beide Klone gemessen. Da sich die beiden MPP5^{Wt} - und die beiden $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ -Klone der MDCK-C7-, bzw. MDCKII-Zellen sehr ähnlich verhielten, wurden ihre Daten in Abbildung 35 jeweils zusammengefasst. Die MDCK-C7- $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ -Zellen zeigten im Vergleich zu den MDCK-C7- und MDCK-C7- MPP5^{Wt} -Zellen einen deutlich erhöhten transepithelialen Widerstand. Dieser baute sich über mehrere Tage hinweg kontinuierlich auf, bis nach etwa 430 Stunden die Zellen abzusterben begannen (Abb. 35A). Auch bei den MDCKII- $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ -Zellen konnten nach einer anfänglich drastischen Erhöhung Widerstandswerte gemessen werden, die sich oberhalb der MDCKII- und MDCKII- $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ -Zellen einpendelten (Abb. 35B). Im Vergleich zu den MDCK-C7-Zellen war der Effekt des $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ Proteins auf den transepithelialen Widerstand der MDCKII-Zellen allerdings weniger ausgeprägt.

3.4.2.2 Analyse der molekularen Zusammensetzung

Es wurde bereits gezeigt, dass Veränderungen des transepithelialen Widerstandes ihren Ursprung in der veränderten Expression von Zellverbindungsproteinen, wie z.B. der Claudin-Proteinfamilie, haben können (Furuse *et al.*, 2001; Amasheh *et al.*, 2002; Wen *et al.*, 2004; Lipschutz *et al.*, 2005). Darüber hinaus ist bekannt, dass das Transmembranprotein Claudin-2 hierbei eine besonders hervorstechende Rolle spielt. So hängt dessen Expressionsstärke direkt umgekehrt proportional mit der Durchlässigkeit der Zellschicht zusammen (Furuse *et al.*, 2001; Amasheh *et al.*, 2002). Je weniger Claudin-2 exprimiert wird, desto höher ist der transepitheliale Widerstand. Die Claudin-2-Menge wird negativ über den ERK1/2-Signalweg (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen 1 und 2) reguliert, indem aktiviertes phosphoryliertes ERK1/2 die Claudin-2-Synthese hemmt (Lipschutz *et al.*, 2005).

Im nächsten Schritt wurden daher in Western-Blot-Analysen die Proteinexpression von Claudin-1 und Claudin-2, sowie deren beteiligte ERK1/2-Signalwegkomponenten zwischen MDCK-C7-, MDCK-C7- MPP5^{Wt} - und MDCK-C7- $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$, bzw. zwischen MDCKII-, MDCKII- MPP5^{Wt} - und MDCKII- $\text{MPP5}^{\text{V301N}}$ verglichen (Abb. 36). Hierzu wurden die Zellen auf großen

Filtereinsätzen ausgesät und geerntet, nachdem der epitheliale Widerstand ein Plateau erreicht hatte.

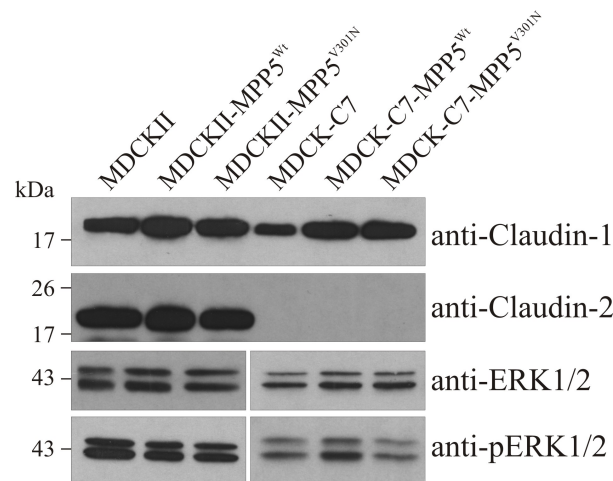


Abb. 36: Western-Blot-Analyse der Proteine Claudin-1, Claudin-2, ERK1/2 und phospho-ERK1/2 in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden auf Filtereinsätzen kultiviert und geerntet, nachdem der transepitheliale Widerstand ein Plateau erreicht hatte. Von den Zelllysaten wurden jeweils 20 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Die Menge an Claudin-1 war in den stabilen Linien im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen leicht erhöht. Da sich jedoch zwischen den MPP5^{V301N}- und MPP5^{Wt}-Linien kein Unterschied zeigte, kann der erhöhte Widerstand der MPP5^{V301N}-Linien nicht durch verschiedene Claudin-1-Mengen erklärt werden. Das bereits bekannte Fehlen von Claudin-2 in MDCK-C7-Zellen (Furuse *et al.*, 2001) konnte bestätigt werden (Abb. 36). In den drei MDCKII-Linien waren die Mengen an Claudin-2 gleich, die stabile Transfektion hatte keinen Einfluss auf die Expressionsstärke. Auch bei ERK1/2 und aktiviertem pERK1/2 konnte kein Unterschied innerhalb der MDCKII-, bzw. MDCK-C7-Linien festgestellt werden. Somit kam die Erhöhung des Widerstands in den mutanten Linien weder durch eine veränderte Claudin-1- oder Claudin-2-Expression noch durch dessen Aktivierung durch ERK1/2 zustande. Allerdings widerspricht das Ergebnis des anti-pERK1/2-Immunblots der nicht-transfizierten MDCKII- und MDCK-C7-Zellen früheren Ergebnissen (Lipschutz *et al.*, 2005). Demnach sollten MDCKII-Zellen sehr wenig und MDCK-C7-Zellen vergleichsweise mehr pERK1/2 exprimieren.

3.5 Einfluss der V301N-Mutation in der MPP5-PDZ-Domäne auf die Expression epithelialer Ionenkanäle

MDCK-C7-Zellen besitzen einen 20- bis 60-fach höheren transepithelialen Widerstand als MDCKII-Zellen (Stevenson *et al.*, 1988; Gekle *et al.*, 1994; Amasheh *et al.*, 2002 und Abb. 35). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass Ionen in diesen Zellen hauptsächlich transzellulär über Kanäle durch die Zellen gelangen (Amasheh *et al.*, 2002). Eine Erhöhung des TER in MDCK-C7-Zellen könnte daher stattdessen auf einer Veränderung in den Natriumleitenden Systemen beruhen. Der Natriumtransport über ein Epithel findet in einem zweistufigen Prozess statt. So wird an der apikalen Membran der Epithelzellen der epitheliale Natriumkanal (engl. *epithelial sodium channel*, ENaC) exprimiert, durch den die Na⁺-Ionen in die Zelle eindringen. An der basolateralen Membran werden sie durch die Na⁺/K⁺-ATPase wieder aus der Zelle heraus gepumpt (Snyder, 2005). Daher wurde der Einfluss von überexprimiertem MPP5^{Wt} und MPP5^{V301N} auf die Expression dieses Ionenkanals, bzw. -transporters untersucht.

3.5.1 Analyse der α -, β - und γ -Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals (ENaC)

Auf struktureller Ebene ist ENaC aus den drei partiell homologen Untereinheiten α , β und γ aufgebaut, die mit einer vorhergesagten Stöchiometrie von $2\alpha : 1\beta : 1\gamma$ in die Membran eingefügt sind (Canessa *et al.*, 1994; Rossier *et al.*, 2002) (Abb. 37). Alternativ wird auch eine nonamere Struktur vorgeschlagen, bei der jede Untereinheit dreimal vorkommt (Eskandari *et al.*, 1999).

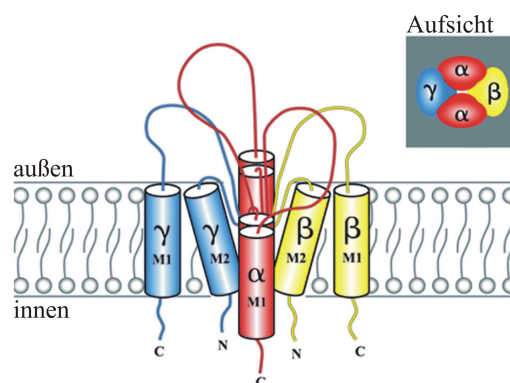


Abbildung 37: Schematische Darstellung des epithelialen Natriumkanals ENaC. Der ENaC ist aus den drei Untereinheiten α , β und γ aufgebaut, die im Verhältnis $2\alpha : 1\beta : 1\gamma$ in die Membran integriert sind. Verändert nach Rossier *et al.* (2002).

Über quantitative *real-time*-PCR wurde die mRNA-Expression der drei ENaC-Untereinheiten α , β und γ in den MDCK-C7-Zelllinien untersucht. Als Referenz bzw. Haushaltsgen wurde das Gen der ATPase (*ATP5B*) gewählt. Die Analyse wurde dreimal mit jeweils beiden MPP5^{Wt}- und MPP5^{V301N}-Klonen durchgeführt und resultierte in allen Fällen in vergleichbaren Ergebnissen. Bei allen drei Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals konnten in der MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zelllinie im Vergleich zur MDCK-C7- und zur MDCK-C7-MPP5^{Wt}-Zelllinie signifikant verringerte Expressionsniveaus beobachtet werden. Die Expression der Untereinheiten β -ENaC und γ -ENaC war in diesen Zellen sogar fast vollständig herunterreguliert (Abb. 38).

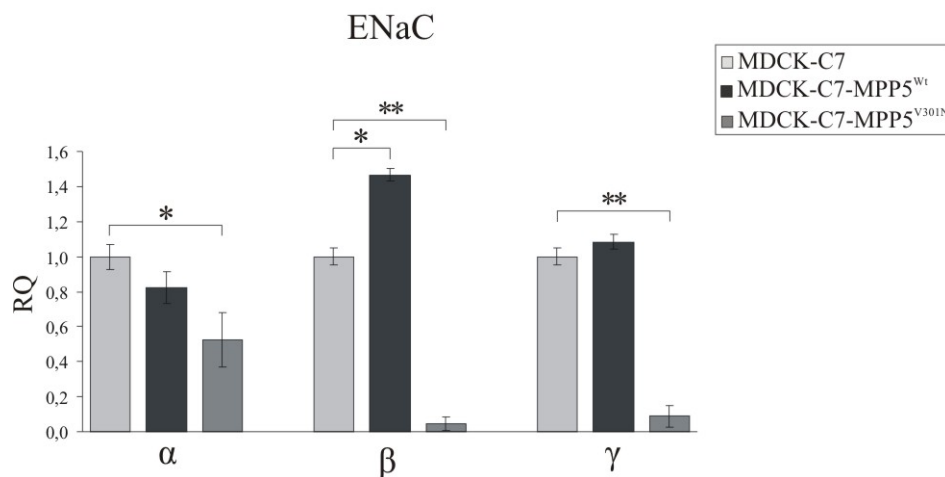


Abbildung 38: Quantitative *real-time*-PCR-Analyse der Untereinheiten des epithelialen Natriumkanals ENaC in den MDCK-C7-Linien. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Analysen. Jede Zelllinie wurde in Triplikaten gemessen. Die beiden MPP5^{Wt}- und MPP5^{V301N}-Klone wurden jeweils zusammengefasst. Die mutante Linie MDCK-C7-MPP5^{V301N} zeigte im Vergleich zu MDCK-C7 und MDCK-C7-MPP5^{Wt} eine signifikant verminderte Expression aller drei ENaC-Untereinheiten α , β und γ . Die y-Achse gibt die relative Quantifizierung (RQ) im Vergleich zur nicht-transfizierten MDCK-C7-Zelllinie (RQ=1) an. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen, die statistische Signifikanz ist mit Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

3.5.2 Analyse der basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase

Die Na⁺/K⁺-ATPase an der basolateralen Plasmamembran ist in der Regel ein Heterodimer, das aus einer katalytischen α - und einer regulatorischen β -Untereinheit besteht (Abb. 39). Das Protein katalysiert in einem Pumpzyklus den ATP-abhängigen Transport von 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle und 2 K⁺-Ionen in die Zelle (Scheiner-Bobis, 2002). Insgesamt gibt es vier α -Isoformen,

die ubiquitäre Untereinheit $\alpha 1$, und die gewebsspezifischen Untereinheiten $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$. Von der hochglykosylierten β -Untereinheit gibt es die drei Isoformen $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 3$. Ein drittes, als γ -Untereinheit bezeichnetes Peptid, scheint zusätzlich in einigen Geweben an der Regulation der Aktivität der Pumpe beteiligt zu sein (Scheiner-Bobis, 2002).

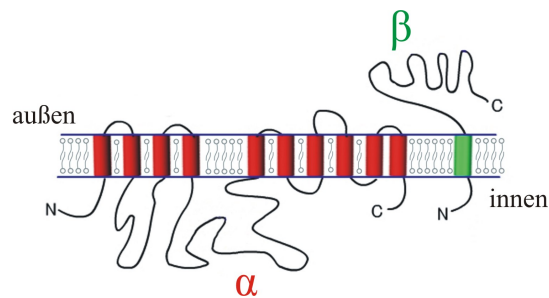


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Na^+/K^+ -ATPase. Die katalytische α -Untereinheit weist 10 Transmembrandomaenen (*rot*) auf, N- und C-Terminus liegen auf der zytosolischen Seite. Die regulatorische β -Untereinheit dagegen durchquert die Membran nur einmal (*grün*). Dabei liegt der N-Terminus im Zytosol und der C-Terminus ragt aus der Zelle heraus. Verändert nach: <http://park12.wakwak.com/-pharma1/textbook/Receptors/Na-K-ATPase.html>.

Es ist bekannt, dass MDCK-Zellen die Untereinheiten $\alpha 1$ und $\beta 1$ der Na^+/K^+ -ATPase exprimieren (Wendt *et al.*, 1998). Da Antikörper gegen $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\beta 2$ zur Verfügung standen, wurden diese Untereinheiten mittels Western-Blot-Analyse auf ihr Vorkommen in MDCK-C7-Zellen überprüft (Abb. 40).

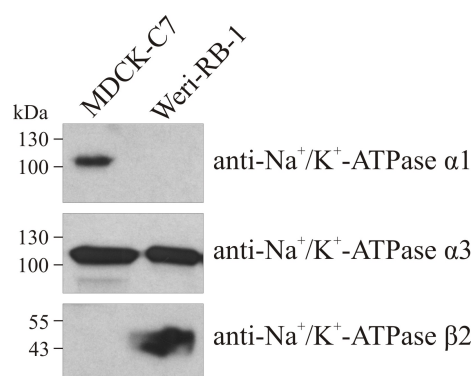


Abbildung 40: MDCK-C7-Zellen synthetisieren die $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten der Na^+/K^+ -ATPase. Die Western-Blot-Analyse zeigte das Vorhandensein der Untereinheiten $\alpha 1$ und $\alpha 3$ in MDCK-C7-Zellen. Als Positivkontrolle für den Nachweis der $\alpha 3$ - und $\beta 2$ -Untereinheit dienten Extrakte der humanen Retinoblastoma-Linie Weri-RB-1.

Als Positivkontrolle diente die humane Retinoblastoma-Zelllinie Weri-RB-1, die wie das Netzhautgewebe die $\alpha 3$ und $\beta 2$ Untereinheiten exprimiert (Molday *et al.*, 2007). Im Immunblot konnten in MDCK-C7-Zellen die $\alpha 1$ - und $\alpha 3$ -Untereinheiten, jedoch nicht die $\beta 2$ -Untereinheiten nachgewiesen werden (Abb. 40).

Analog zu den ENaC-Untereinheiten (siehe V.3.5.1), wurde daher ebenfalls die mRNA-Expression der Na^+/K^+ -ATPase-Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\beta 1$ über qRT-PCR untersucht. Hier konnten signifikante Unterschiede in der Expression der Untereinheiten $\alpha 3$ und $\beta 1$ der Na^+/K^+ -ATPase zwischen mutanter MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zelllinie und MDCK-C7, bzw. MDCK-C7-MPP5^{Wt}-Zelllinie festgestellt werden. Die $\alpha 1$ -Untereinheit zeigte jedoch in allen drei Zelllinien einen ähnlichen Expressionslevel (Abb. 41).

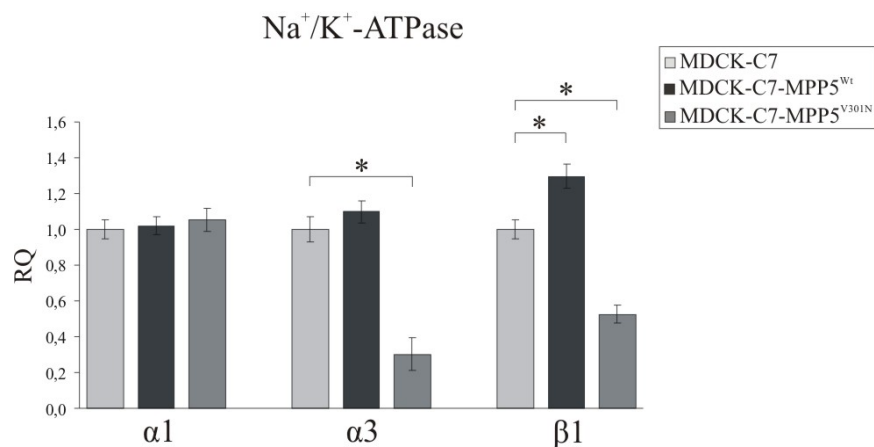


Abbildung 41: Quantitative *real-time*-PCR Analyse der Na^+/K^+ -ATPase in MDCK-C7-Linien. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei Analysen. Jede Zelllinie wurde in Triplikaten gemessen. Die beiden MPP5^{Wt}- und MPP5^{V301N}-Klone wurden zusammengefasst. Die Expression der $\alpha 1$ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase war in MDCK-C7-MPP5^{V301N} im Vergleich zu MDCK-C7 und MDCK-C7-MPP5^{Wt} nicht beeinträchtigt. Dagegen war das mRNA-Niveau der $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Untereinheiten signifikant erniedrigt. Die y-Achse gibt die relative Quantifizierung (RQ) im Vergleich zur nicht-transfizierten MDCK-C7-Zelllinie (RQ=1) an. Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen, die statistische Signifikanz ist mit Sternchen gekennzeichnet (* $p < 0,05$).

Es wurde daher geschlussfolgert, dass die verminderte mRNA-Expression der Untereinheiten β -ENaC und γ -ENaC, sowie der $\alpha 3$ - und $\beta 1$ -Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase in den MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zelllinien die Ursache für den erhöhten transepithelialen Widerstand in diesen Zellen darstellen könnte.

4 GENERIERUNG DER MPP5-V301N-KNOCK-IN-MAUS

4.1 Generierung des murinen MPP5-V301N-*knock-in*-Konstrukts

In dieser Arbeit wurde eine Mauslinie gentechnisch hergestellt, bei der die Funktion der PDZ-Domäne durch die V301N-*knock-in*-Mutation spezifisch ausgeschaltet ist. Damit sollte die Auswirkung einer fehlenden Interaktion zwischen CRB-Proteinen und MPP5 *in vivo* untersucht werden. Die genomische DNA des Mausstammes C57BL/6 diente als Matrize für die Generierung des Konstrukts zur Einführung der V301N-Mutation in das murine *Mpp5*-Gen. Das 5'-Fragment (2,4 kb, in Abb. 42 rot markiert) mit den Exons 6 und 7 wurde mit den Primern mMPP5-5'_XhoI_F und mMPP5-5'_R, das 3'-Fragment (4,1 kb) mit Exon 8 über das Primerpaar mMPP5-3'_SacI_F und mMPP5-3'_SacI_R (Abb. 42, grün) und Exon 7 mit den Primern mMPP5_Exon7_F und mMPP5_Exon7_R (698 bp, Abb. 42, blau) amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden zunächst jeweils mit pGEM-T ligiert. Durch *in vitro*-Mutagenese mit den Primern mMPP5V_301N_F und mMPP5_V301N_R wurden in Exon 7 zwei Punktmutationen (GTT nach AAT) eingeführt, die an Position 301 des Proteins einen Austausch von Valin zu Asparagin bewirken sollten (in Abb. 42 durch einen Stern markiert). Die Richtigkeit der ligierten Fragmente wurde durch direkte Sequenzierung validiert.

In Schritt 1 (siehe Abb. 42) wurde nun das 5'-Fragment über die eingeführten *XhoI*- und die endogene *HindIII*-Schnittstelle im *Mpp5*-Gen in den pBluescript II KS(-)-Vektor eingefügt. Das Neomycin-Resistenzgen (*Neo^r*), das von gleichgerichteten *loxP*-Stellen flankiert wird und ein Polyadenylierungssignal enthält (1,3 kb, Abb. 42 gelb), wurde mit den Enzymen *HindIII* und *SacI* aus dem Neoflox9-Vektor (Krämer, 2003) ausgeschnitten. Durch die Insertion von *Neo^r* in Schritt 2 wurde eine *SpeI*-Schnittstelle im pBluescript-Vektor eliminiert. Danach wurde in Schritt 3 über die endogenen Schnittstellen *SpeI* und *HindIII* im *Mpp5*-Gen das Exon 7 im 5'-Fragment herausgeschnitten und anschließend durch das mutierte Exon 7 ersetzt. In Schritt 4 wurde schließlich das 3'-Fragment mit den neu eingeführten *SacI*-Schnittstellen an *Neo^r* angefügt (Abb. 42). Das finale *knock-in*-Vektorkonstrukt bestand aus der murinen genomischen *Mpp5*-Sequenz von Exon 6 bis Exon 8, der Mutation V301N in Exon 7 und der Neomycin-Kassette, die direkt daneben als Selektionsmarker diente.

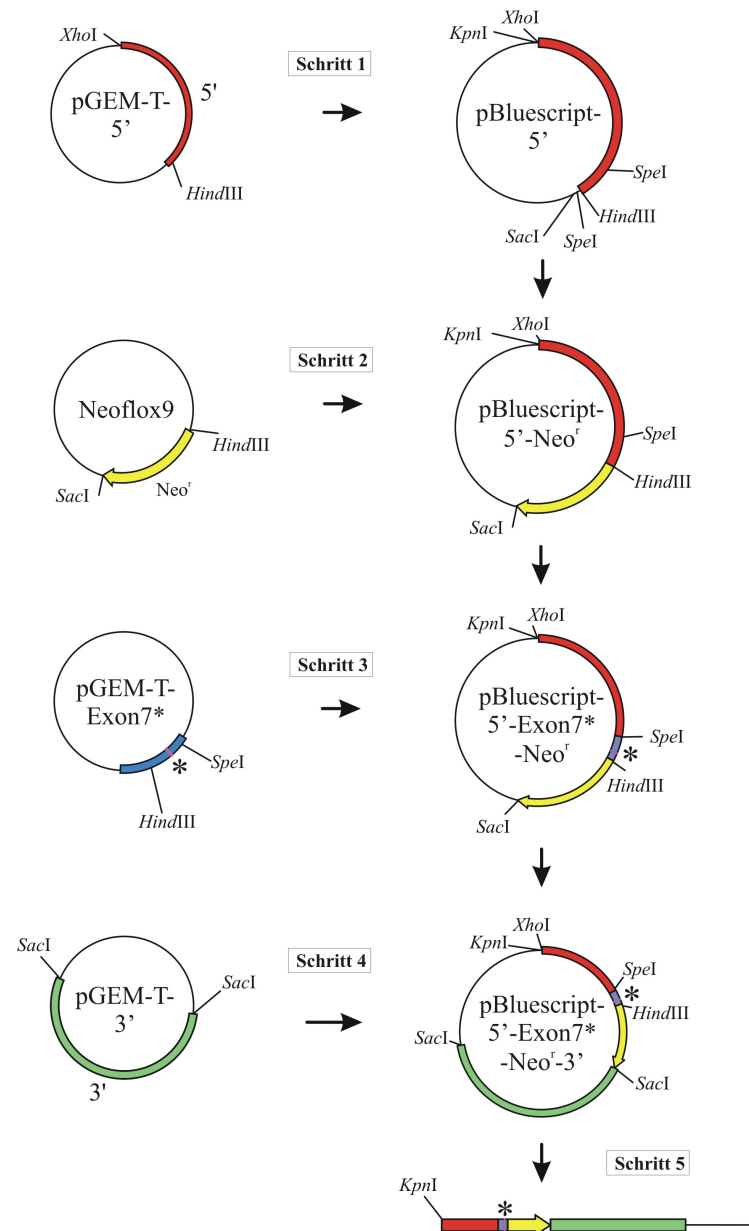


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie für das *Mpp5*^{V301N} knock-in-Konstrukt. Die unterschiedlichen Farben markieren die klonierten Fragmente der *Mpp5*-Sequenz, bzw. das Neomycin-Resistenzgen (siehe Text), der Stern kennzeichnet die eingeführte V301N-Mutation.

Bei dieser Klonierung gingen 311 bp des Introns 7 durch die Insertion der Neo-Kassette verloren (siehe auch Abb. 44). Nach jedem Klonierungsschritt wurden die Übergänge zwischen den Fragmenten mittels direkter Sequenzierung überprüft und bestätigt. Die Linearisierung des finalen 10,3 kb-großen knock-in-Konstrukts pBluescript-mMPP5-5'-Exon7*-Neo^r-3' erfolgte in Schritt 5 mit dem Enzym *KpnI* (Abb. 42). Die Richtigkeit des kompletten Konstrukts wurde über den Verdau mit zwei Restriktionsenzympaaren, nämlich *KpnI/SacI* und *HindIII/SpeI*, verifiziert (Abb. 43).

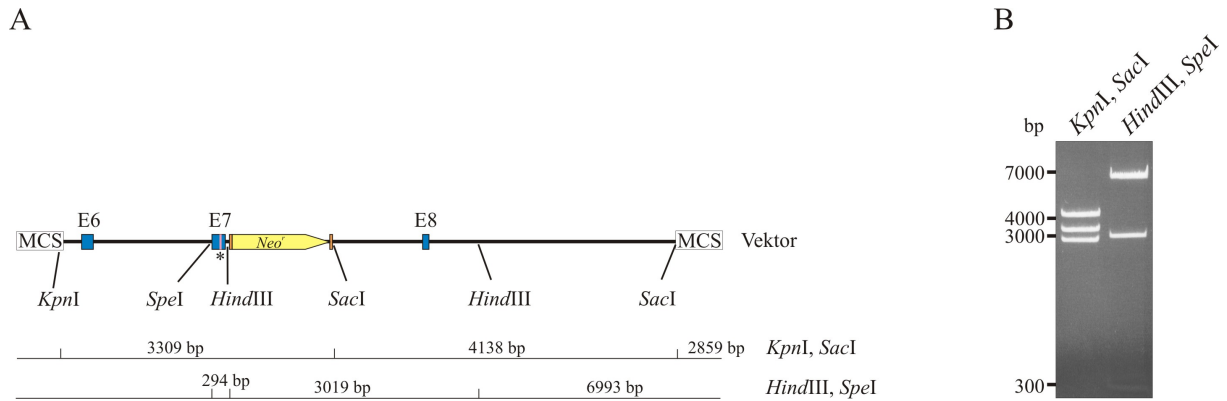


Abbildung 43: Restriktionsverdau des finalen MPP5-*knock-in*-Vektorkonstrukts. (A) Schematische und maßstabgetreue Darstellung des *knock-in*-Vektorkonstrukts mit Schnittstellen ausgewählter Restriktionsenzyme. Die aus dem Doppelverdau mit *KpnI/SacI* und *HindIII/SpeI* resultierenden Fragmentgrößen sind darunter angegeben. Die eingeführte V301N-Mutation in Exon 7 ist mit einem Stern markiert. Exons sind blau, die Neomycin-Kassette (*Neo^r*) gelb dargestellt. MCS: *multiple cloning site* (B) Das Agarosegel der beiden Doppelverdaus des Vektorkonstrukts zeigt die erwarteten Fragmentgrößen, die in (A) angegeben sind.

4.2 Transfektion und Überprüfung der embryonalen Stammzellen

Die Transfektion der embryonalen Stammzellen (ES-Zellen) mit dem Vektorkonstrukt fand am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik, Abteilung Entwicklungsgenetik in Berlin statt. Dafür wurden ihnen 100 µg des linearisierten und aufgereinigten *knock-in*-Konstrukts zur Verfügung gestellt. Die DNA von insgesamt 192 resultierenden Klonen wurden uns zur Überprüfung des korrekten Einbaus des Konstrukts durch homologe Rekombination (Abb. 44A) geschickt. In einer ersten PCR mit dem Primerpaar 1 (MPP5-5'-Screen-F und Neo-R) (Abb. 44A) wurden die zwei positiven Klone II-C12 (#128) und II-F11 (#163) identifiziert (Abb. 44B). Anschließend bestätigten vier weitere unabhängige PCR-Ansätze mit Primerpaaren, bei denen jeweils ein Primer im Neomycin-Resistenzgen und der andere außerhalb der Konstruktsequenz bindet (Primerpaare 2–6, siehe Abb. 44A), die Integration des Konstrukts. Alle PCR-Produkte entsprachen hierbei den vorhergesagten Größen (Abb. 44B). In beiden positiven Klonen konnte die GTT nach AAT Mutation im Exon 7 durch direkte Sequenzierung nachgewiesen werden.

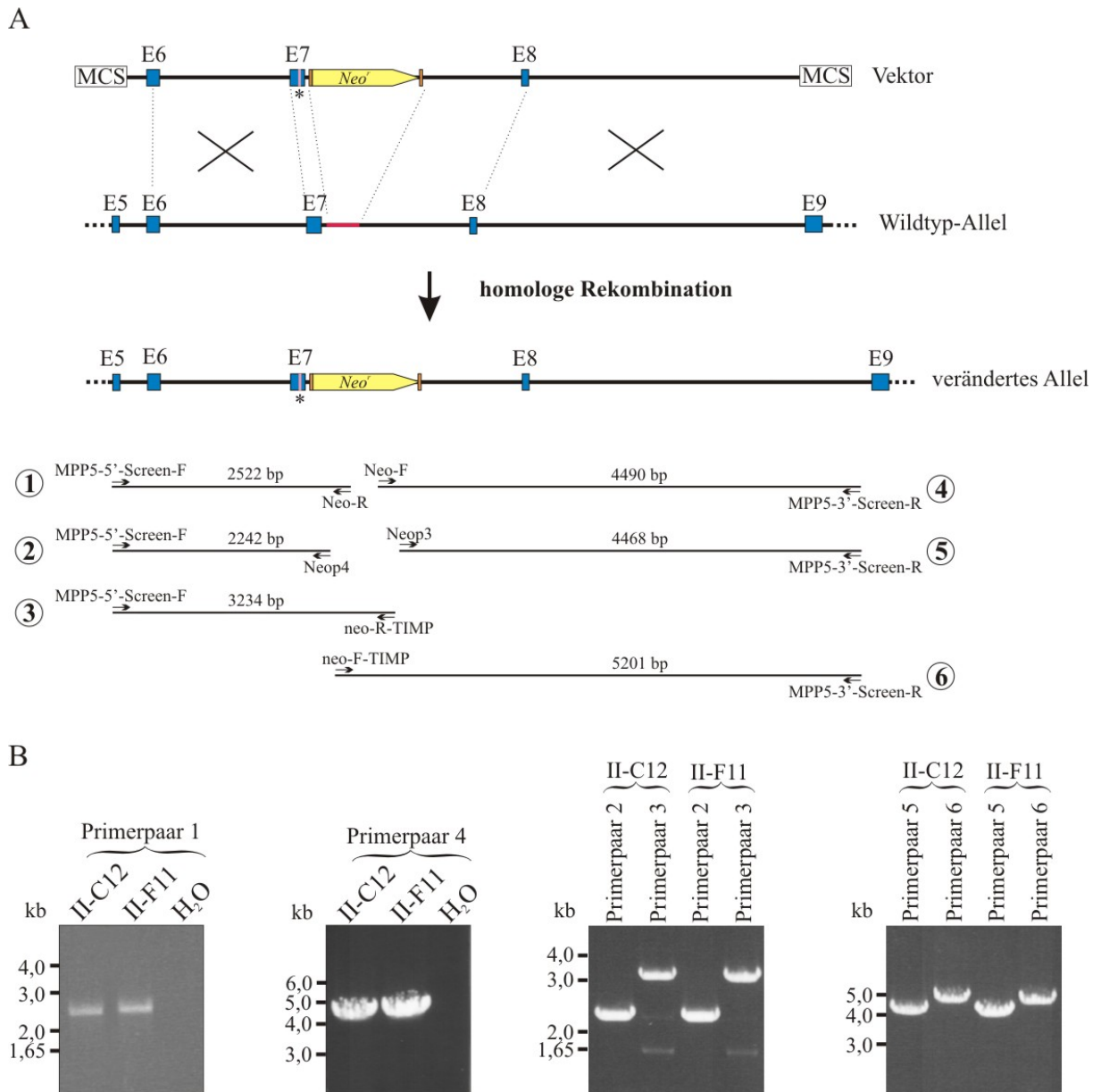


Abbildung 44: Analyse der transfizierten embryonalen Stammzellen auf den korrekten Einbau des Konstrukts (A) Durch homologe Rekombination integriert das Konstrukt in das Genom der ES-Zellen. Die verwendeten Primerpaare (1–6) zur Überprüfung des korrekten Einbaus sind in der maßstabgetreuen schematischen Abbildung eingezeichnet. Die Primersequenzen sind in Tabelle 13 im Appendix IX.1 angegeben. **(B)** Die Agarosegele zeigen die erwarteten PCR-Fragmente der beiden positiven Klone II-C12 und II-F11 mit den in (A) eingezeichneten Primerpaaren.

4.3 Herstellung der Chimären

Die Blastozysteninjektion mit dem ES-Klon II-C12 und der Transfer in scheinchwangere Mäuse wurde von der Firma PolyGene (Rümlang, Schweiz) durchgeführt. Bei drei chimären männlichen Nachkommen (#2601, #2602 und #2603) konnte das Vorhandensein von *knock-in*-Konstruktsequenzen durch vier unabhängige PCR-Reaktionen mit den Primerpaaren 2, 3, 5 und 6 mit DNA aus Mausschwänzen bestätigt werden (Abb. 45; Appendix IX.1 Tab. 13). Dies ist ein starker Hinweis auf den korrekten Einbau des *knock-in*-Konstrukts durch homologe Rekombination.

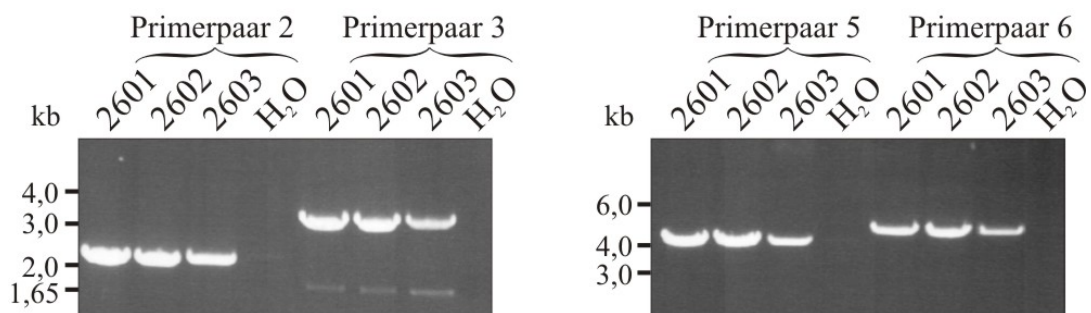


Abbildung 45: PCR-Analyse der DNA der chimären MPP5 *knock-in*-Tiere. Die Insertion des *knock-in*-Konstrukts in das Genom der drei chimären Mäuse #2601, #2602 und #2603 wurde mit den Primerkombinationen 2, 3, 5 und 6 (siehe Abbildung 44; Appendix IX.1 Tab. 13) überprüft. Die Agarosegele zeigen die PCR-Produkte mit den entsprechenden, erwarteten Größen (Primerpaar 2: 2242 bp, Primerpaar 3: 3234 bp, Primerpaar 5: 4468 bp, Primerpaar 6: 5201 bp).

Den endgültigen Beweis der korrekten Integration des Konstrukts ins Mäusegenom muss in einer Southern-Blot-Analyse erbracht werden, die im Rahmen dieser Arbeit allerdings zeitlich nicht mehr möglich war. Prinzipiell soll hierfür genomische Maus-DNA mit dem Restriktionsenzym *MseI* inkubiert werden, das sowohl innerhalb des Neomycin-Resistenzgens als auch außerhalb des rekombinierten Konstrukts im Genom schneidet (Abb. 46). Radioaktiv markierte Sonden (5'- und 3'-Sonde) sollen dann an genomische Sequenzen binden, welche ebenfalls außerhalb des rekombinierten Konstrukts liegen (Abb. 46). Im Southern-Blot soll dann anhand der als Banden auf dem Röntgenfilm sichtbaren, unterschiedlich großen Restriktionsfragmente, zwischen Wt- und mutanter DNA unterschieden werden können.

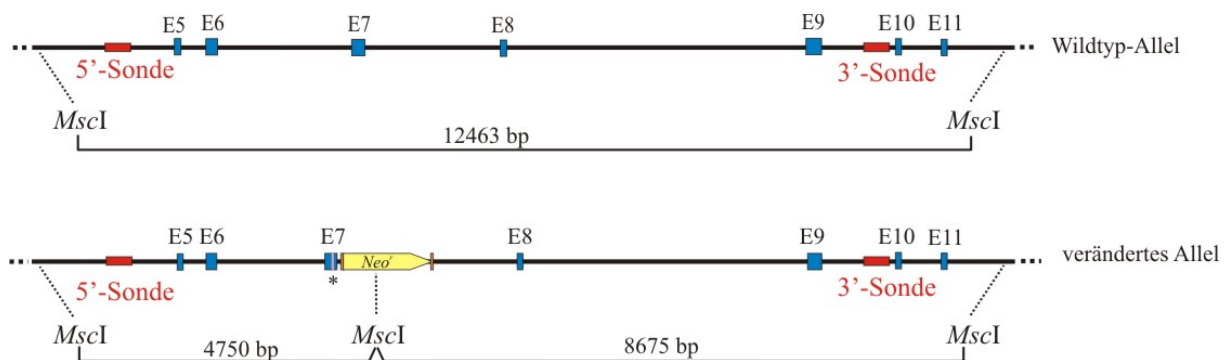


Abbildung 46: Graphische Darstellung der Lage der Sonden und erwartete Fragmentgrößen für einen Southern-Blot zur Überprüfung der korrekten Integration des Konstrukts ins Genom. *MscI*-Schnittstellen sind angegeben. 5'- und 3'-Sonden (rot) liegen beide außerhalb des rekombinierten Konstrukts (vgl. Abb. 44).

4.4 Cre-vermittelte Rekombination

Um das Neomycin-Resistenzgen aus dem Genom wieder zu entfernen, wurden die Chimären mit Mäusen verpaart, die das Gen für die Cre-Rekombinase tragen. Hierbei macht man sich zunutze, dass das Cre-Enzym die jeweiligen *loxP*-Stellen erkennt, daran bindet und dazwischen liegende Sequenzen herausschneidet. Der Vorgang der Cre-vermittelten Rekombination zwischen den *loxP*-Stellen ist in Abbildung 47 dargestellt.

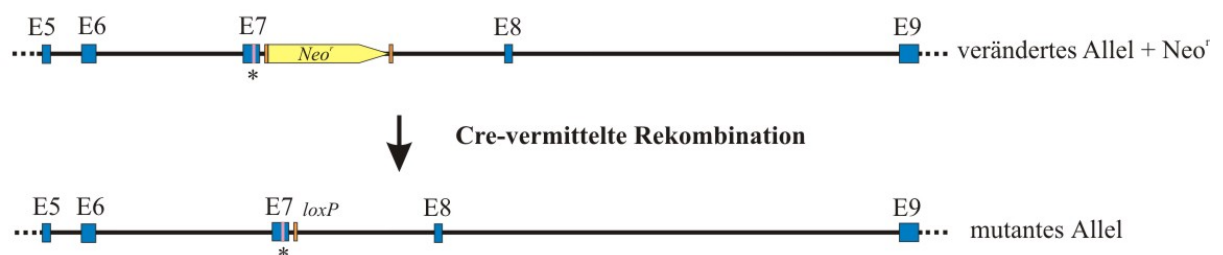
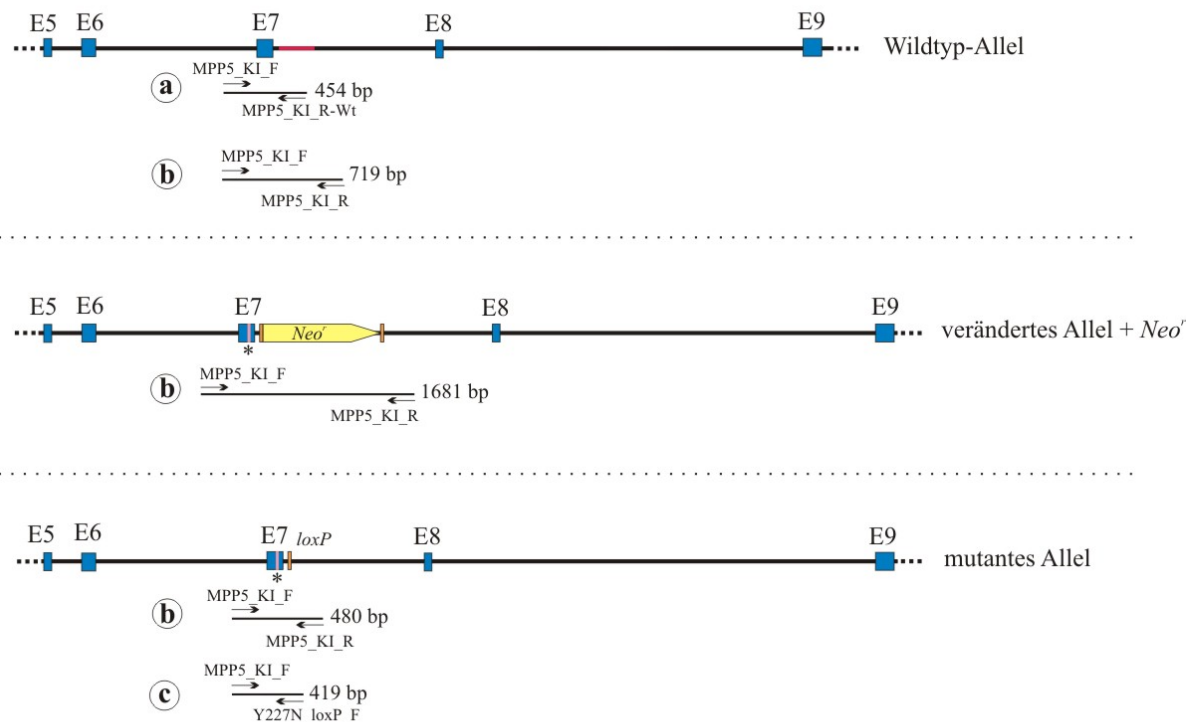


Abbildung 47: Cre-vermittelte Rekombination zur Entfernung des Neomycin-Resistenzgens. Die *loxP*-Stellen sind orange dargestellt.

4.5 Genotypisierung der MPP5-V301N-*knock-in*-Mäuse

Bei den Nachkommen aller chimären Tiere konnten Mäuse identifiziert werden, die heterozygot für das MPP5-V301N-Allel waren. Das bedeutet, dass die Mutation erfolgreich eingebracht wurde. Im Rahmen dieser Arbeit wurden insgesamt sechs Würfe von verschiedenen heterozygoten MPP5-V301N Elternpaaren mittels PCR mit DNA aus Mausschwänzen genotypisiert. Die Lage der Primerpaare und die Fragmentgrößen sind in Abbildung 48 dargestellt.

A



B

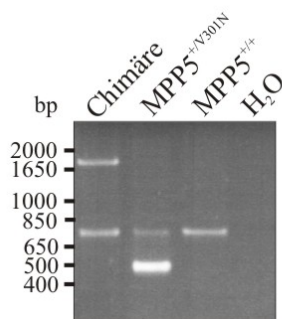


Abbildung 48: PCR-basierte Genotypisierung der MPP5^{V301N}-*knock-in*-Mäuse. (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Allele mit Lage der Primer (Pfeile) und entsprechenden PCR-Produktgrößen. Primerpaar „a“ und Primerpaar „c“ erkennen spezifisch das Wildtyp-Allel, bzw. das mutante Allel, Primerpaar „b“ dagegen bindet an alle Allele (B) Agarosegel einer PCR-Analyse einer chimären Maus (#2603), einer heterozygoten *Mpp5*^{+/^{V301N} (#2604) und einer *Mpp5*^{+/⁺ (#2608) Maus mit dem Primerpaar „b“ (MPP5_KI_F und MPP5_KI_R) mit den in (A) dargestellten erwarteten Fragmentgrößen.}}

Dabei ist Kombination „a“ für Wildtyptiere spezifisch, da der Primer MPP5_KI_R-Wt in dem Bereich der Wildtypsequenz bindet, der durch Einsetzen des Neomycin-Resistenzgens bei der Konstruktion des *knock-in*-Vektors verloren gegangen ist. Kombination „c“ ist für mutante Tiere spezifisch, da der Primer Y227N_loxP_F in der *loxP*-Sequenz bindet. Primerpaar „b“ bindet dagegen in allen Allelvarianten und kann als universelles Primerpaar verwendet werden (siehe Abbildung 48B).

Nach den mendelschen Regeln sollten bei der Verpaarung heterozygoter Tiere wildtypische, heterozygote und für die Mutation homozygote Tiere im Verhältnis 1:2:1 auftreten (Mendel, 1866). Bei den insgesamt 49 Nachkommen waren 29 Tiere heterozygote Träger für das MPP5-V301N Allel und 20 Mäuse wildtypisch. Es wurden keine homozygoten Mäuse identifiziert. Zur Untersuchung, ob die Tiere erst direkt nach der Geburt sterben und aufgefressen werden oder bereits im Embryonalstadium letale Defekte aufweisen, wurden Embryonen am pränatalen Tag E13 (Verpaarung #2611 ♂ het und #2618 ♀ het) und E11 (Verpaarung #2605 ♂ het und #2614 ♀ het) entnommen und genotypisiert. Auch hier konnten keine Homozygoten identifiziert werden (7 x Wildtyp, 6 x heterozygot).

VI DISKUSSION

1 ANALYSE DES MPP4-MULTIPROTEINKOMPLEXES

Zur Identifizierung von MPP4-bindenden Proteinen wurden bisher hauptsächlich das Hefe-Zwei-Hybrid-System (Yang *et al.*, 2007) oder die Immunpräzipitation (Stöhr *et al.*, 2005; Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007) zum Testen von ausgesuchten Kandidaten als Methoden eingesetzt. Diese Arbeit stellt einen proteomischen Ansatz vor, um den MPP4-organisierten Multiproteinkomplex *in vivo* aufzuklären und um neue, bisher unbekannte Partner zu finden.

1.1 Identifizierung der PSD95- β -Isoform als Interaktionspartner von MPP4

Zwei der identifizierten Proteine, die mit der MPP4-Immunaффinitätschromatographie aus bovinem Retinalysat aufgereinigt wurden, waren Veli3 und PSD95, die schon als MPP4-Bindungspartner, bzw. als Teil des MPP4-Komplexes beschrieben worden waren (Stöhr *et al.*, 2005; Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007). Dies bestätigte deutlich die Effizienz des gewählten experimentellen Ansatzes. Zusätzlich wurde die Assoziation zwischen MPP4 und PSD95 weiter charakterisiert und dabei demonstriert, dass diese beiden Proteine direkt über eine L27-Heterodimerisierung interagieren. Diese Art der Wechselwirkung ist von der Anwesenheit der L27-Domäne der PSD95- β -Isoform abhängig. PSD95- α , dem die N-terminale L27-Domäne fehlt, bindet MPP4 nicht. Ein vergleichbarer Fall findet sich bei der Interaktion zwischen PSD95- β und dem MAGUK-Protein CASK (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Serin-Proteinkinase) (Chetkovich *et al.*, 2002b). Auch hier heteromultimerisieren die L27-Domänen *in vitro*, wohingegen die PSD95- α -Isoform nicht an CASK bindet.

Im Rattenhirn wurde mittels *in situ*-Hybridisierung der *Psd95- β* -mRNA eine neuronale Lokalisierung ähnlich der *Psd95- α* -mRNA gefunden (Kleinhirn, *Hippocampus*, *Corpus Striatum* und Cerebraler Cortex). Jedoch machte die β -Isoform nur 10 % des gesamten PSD95-Proteins im Rattenhirn aus (Chetkovich *et al.*, 2002b). Über spezifische Funktionen der PSD95-Isoformen ist bislang noch wenig bekannt. In Gewebsschnittkulturen des Hippocampus konnte gezeigt werden, dass die PSD95-Isoformen die grundlegende α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-

isoxazol-Propionsäure-Rezeptor-(AMPA)-vermittelte Stärke der Synapse über verschiedene Mechanismen regulieren (Schluter *et al.*, 2006). Während PSD95- α die AMPAR-Transmission unabhängig vom Level beider Isoformen und der Aktivität der Synapse erhöhte, war der Effekt der L27-enthaltenen β -Isoform aktivitätsabhängig. Außerdem war die Funktion von PSD95- β , die Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig reguliert wird, komplett von der dominanten α -Isoform überlagert. Unterschiede in den funktionellen synaptischen Effekten von PSD95- α , der vorherrschenden Isoform, können so alleine ihrer N-terminalen Domäne zugeordnet werden (Schluter *et al.*, 2006). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus für diesen Effekt ist jedoch bisher unbekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auf mRNA-Ebene *Psd95- β* im Gegensatz zu *Psd95- α* in der Mausretina signifikant höher als im Gehirn exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass die β -Isoform den Großteil des retinalen PSD95-Proteins ausmacht. Immunhistochemische Analysen von Retinae verschiedener Säugerspezies demonstrierten durchwegs eine vorwiegend präsynaptische Präsenz von PSD95 entlang der Plasmamembran der Stäbchen- und Zapfen-Synapsenendköpfchen (Koulen *et al.*, 1998; Koulen, 1999; Stöhr *et al.*, 2003; Aartsen *et al.*, 2006). In der IPL waren kleinere Mengen an PSD95 postsynaptisch an Bipolarzell-Ribbonsynapsen, jedoch nicht an konventionellen Synapsen von Amakrinen Zellen angehäuft (Koulen *et al.*, 1998). Diese Untersuchungen wurden mit PSD95-Antikörpern durchgeführt, die ein gemeinsames Epitop beider Isoformen erkannten und somit keine Unterscheidung zwischen PSD95- α und PSD95- β ermöglichten. Interessanterweise fehlt PSD95 in MPP4-defizienten Photorezeptorsynapsen komplett (Aartsen *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2007), wohingegen die PSD95-Lokalisierung in den postsynaptischen Fortsätzen der IPL-Ganglienzellen bei den MPP4 *knock-out*-Mäusen nicht verändert waren (Aartsen *et al.*, 2006). Dies lässt vermuten, dass die Photorezeptorenden hauptsächlich, womöglich sogar exklusiv PSD95- β enthalten und dessen Rekrutierung und Aufrechterhaltung an der präsynaptischen Membran von der L27-vermittelten Interaktion mit MPP4 abhängt.

Von Aartsen *et al.* (2009) konnte mit Hilfe einer lentiviral-vermittelten molekularen Austauschstrategie in primären Retinakulturen gezeigt werden, dass die Isoformen tatsächlich unterschiedlich lokalisierten. Dabei wurden beide endogene Isoformen von PSD95 mit shRNA

(engl. *small hairpin RNA*) gegen *Psd95* herunter reguliert und durch GFP-fusioniertes PSD95- α oder PSD95- β ersetzt. Bipolare, Ganglion- und Photorezeptorzellen waren für die PSD95- α -Expression positiv, wobei das Signal im gesamten Photorezeptor verteilt war. Dagegen lokalisierte PSD95- β spezifisch an der präsynaptischen Membran des Photorezeptors (Aartsen *et al.*, 2009). Darüber hinaus stellte PSD95- β in Abwesenheit von endogenem PSD95 den MPP4-Komplex an der Plasmamembran wieder her. Dies deutete stark darauf hin, dass PSD95- β ein essentielles Mitglied des MPP4-Komplexes und entscheidend für seine korrekte Lokalisierung ist. Auch wenn MPP4 selektiv mit PSD95- β über die L27-Domänen interagiert, schien die alleinige Anwesenheit der L27-Domänen von MPP4 für die Aufrechterhaltung von PSD95- β an der präsynaptischen Plasmamembran nicht ausreichend zu sein (Aartsen *et al.*, 2009).

1.2 Hsc70 und Recoverin als neue Mitglieder des MPP4-Multiproteinkomplexes

Gute Kandidaten des MPP4-Gerüstkomplexes sind solche Proteine, die bei der Regulierung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels in den synaptischen Enden der Photorezeptoren beteiligt sind. Erste Hinweise hierfür ergaben sich durch die Arbeit an einer MPP4-defizienten Maus, bei der der Verlust von MPP4 in den Synapsen zur Fehllokalisierung von PMCA, der Pumpe zur Entfernung des zytosolischen Ca^{2+} , führte (Yang *et al.*, 2007). PMCA interagierten mit einem MPP4-abhängigen präsynaptischen Membranproteinkomplex, der auch PSD95 und Veli3 enthält. Yang *et al.* (2007) postulierten, dass MPP4 diesen Komplex organisiert und somit essentiell für die PMCA-Lokalisierung ist. Das Fehlen von MPP4 verhinderte die Bildung dieses Komplexes und führte zur zufälligen Verteilung von PMCA an der Plasmamembran und daher vermutlich auch zum Defekt in der Ca^{2+} -Homöostase (Yang *et al.*, 2007). Auch Aartsen *et al.* (2009) zeigten, dass MPP4 mit seinen zwei L27-Domänen verantwortlich für die Rekrutierung der PMCA an die Photorezeptor-Enden ist. Insbesondere war der C-terminale Teil von MPP4 zusammen mit PSD95- β an der spezifischen Lokalisierung der PMCA an der präsynaptischen Plasmamembran involviert (Aartsen *et al.*, 2009).

In der Arbeit von Yang *et al.* (2007) wurde mit Western-Blot-Analysen von Stäbchen-Photorezeptoren gezeigt, dass MPP4-defiziente Mäuse eine verminderte Recoverin-Expression

besitzen, was durch kompensatorische Veränderungen auf die homöostatische Ca^{2+} -Regulierung in den Photorezeptorsynapsen erklärt wurde (Yang *et al.*, 2007). Weiterhin wurde angenommen, dass eine Verminderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration bei Licht zu einer Ablösung des Recoverin von den äußeren Segmentmembranen führt und dieses daraufhin zur Synapse wandern kann (Strissel *et al.*, 2005). Die Daten der vorliegenden Arbeit implizieren das Ca^{2+} -bindende Recoverin als ein weiteres MPP4-assoziiertes Molekül. Ein MPP4-Multiproteinkomplex könnte also einen Bereich darstellen, in der Recoverin an die präsynaptische Membran binden und als Ca^{2+} -Puffer dienen könnte.

In dieser Arbeit wurde außerdem Hsc70 als MPP4-assoziiertes Komplexprotein isoliert. Interessant hierbei ist, dass bereits eine große Anzahl regulatorischer oder akzessorischer Ko-Chaperone identifiziert wurde, die mit Hsc70 interagieren (Young *et al.*, 2003). Diese Ko-Chaperone sind oft an verschiedenen intrazellulären Kompartimenten lokalisiert, wo sie zytosolisches Hsc70 für ortsabhängige Aufgaben heranziehen. Die Rekrutierung von Hsc70 durch Mitglieder der DNAJ-Klasse der Ko-Chaperone ist zum Beispiel wichtig für die Aufrechterhaltung der präsynaptischen Funktion. So spielen Hsc70 und das neuronale J-Domänen-Protein Auxilin in der Clathrin-vermittelten synaptischen Vesikelwiedergewinnung in Neuronen eine Rolle (Morgan *et al.*, 2001). Hsc70 fügt sich auch mit dem häufig vorkommenden präsynaptischen CSP (engl. *cystein string protein*) und anderen Proteinen zu einem Chaperonkomplex zusammen, der die für die synaptische Vesikelexozytose kritische Konformationsänderung auslöst (Swayne *et al.*, 2006). Interessanterweise führte der Verlust von $\text{CSP}\alpha$ in Mäusen zu einer rapiden Photorezeptordegeneration, was darauf hinweist, dass dieser Komplex spezifische Vitalfunktionen in der Photorezeptor-Ribbonsynapse ausübt (Schmitz *et al.*, 2006). Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Immunhistochemie zeigte eine relativ geringe Überlappung von Hsc70 und MPP4 an der Plasmamembran der Photorezeptorendigungen. In Hinsicht auf die Lokalisierung von MPP4 an die Membran von präsynaptischen Vesikeln der Zapfen- und Stäbchen-Photorezeptoren (Kantardzhieva *et al.*, 2005) scheint ein Zusammenwirken von MPP4 und Hsc70- $\text{CSP}\alpha$ in regulatorischen exozytotischen Prozessen dennoch möglich.

Zusätzliche Immunpräzipitations-Experimente mit bovinem Retinalysat, bei denen nicht die MPP4-Antikörper, sondern die der zu untersuchenden Partner verwendet wurden, unterstützen eine Assoziation zwischen dem MPP4-Gerüst-Komplex und Recoverin bzw. Hsc70. Anschließende *in vitro*-Bindungsstudien mit heterolog exprimierten Proteinen in 293-EBNA-Zellen zeigten dagegen keine direkte Interaktion zwischen MPP4 und Recoverin bzw. Hsc70. Eine mögliche Erklärung könnten weitere, noch unbekannte Proteine sein, die die Assoziation zwischen MPP4 und Hsc70, bzw. Recoverin vermitteln und nicht in 293-EBNA-Zellen, jedoch in Photorezeptoren exprimiert werden. Alternativ könnten auch Photorezeptor-spezifische Modifikationen der Proteine (z.B. Phosphorylierungen) der vermeintlichen Interaktionspartner die Bindung beeinflussen.

1.3 Interaktion von MPP4 mit dem Zytoskelett und integralen Membranproteinen

Zahlreiche Proteine, die über die MPP4-3H10 Immunaффinitäts-Chromatographie mit MPP4 präzipitiert und identifiziert wurden, waren Bestandteile des Zytoskeletts oder verschiedenster Signalwege. Dabei handelte es sich jedoch höchstwahrscheinlich um unspezifische Kontaminationen von häufigen zellulären Proteinen, wie z.B. Zytoskelettproteine, Translationsfaktoren und molekularen Chaperone, die immer wieder unspezifisch bei den gängigen Reinigungsmethoden beobachtet werden (Gavin *et al.*, 2002). MPP4 ist größtenteils resistent gegen die Detergenssolubilisierung retinaler Membranen, was auf eine Assoziation mit Zytoskelettelementen, die unter der Plasmamembran liegen, hinweist (Stöhr *et al.*, 2003). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die isolierten Zytoskelettproteine Bestandteile des MPP4-Proteinkomplexes sind.

Da MPP4 ein Membran-assoziiertes Protein ist, besteht die Möglichkeit, dass es neben den vorgestellten zytoplasmatischen Interaktionspartnern auch mit Transmembranproteinen interagiert. Dabei kommt beispielsweise die PDZ-Domäne in Frage, da diese bevorzugt die C-terminalen Enden von Transmembranproteinen bindet (Dimitratos *et al.*, 1999). Während die 2D-Gelelektrophorese-Technik für die Auftrennung löslicher zytoplasmatischer Proteine hervorragend geeignet ist, gibt es gewisse Grenzen für Proteine, die durch extreme Charakteristika

gekennzeichnet sind. So sind integrale Membranproteine hoch-hydrophob und/oder sehr groß, und lassen sich daher in der ersten Dimension nur erschwert oder gar nicht auftrennen, weshalb diese Proteine in der 2D-Gel-Elektrophorese letztendlich nicht detektiert werden können. Dies gilt ebenso für sehr saure wie für sehr basische Proteine. Um einige dieser Einschränkungen zu umgehen, werden für Membranproteine andere Techniken, wie z.B. das modifizierte 2D-System mit Benzyltrimethyl-*n*-hexadecylammonium-Chlorid (16-BAC) und SDS (Macfarlane, 1989; Hartinger *et al.*, 1996) verwendet. Eine andere Möglichkeit ist die 1D-SDS-PAGE nach Immunpräzipitation von Detergens-solubilisiertem Gewebe (Crockett *et al.*, 2004; Senkevich *et al.*, 2005), die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kam. Die Peptidfingerabdrücke der analysierten Banden der immunisierten Membranproteine lieferten saubere Spektren ohne Hintergrund. Mit Ausnahme von MPP4 ließen sich diese jedoch keinen bekannten Proteinen zuordnen, weshalb die verwendete NCBI-Inr-Datenbank hier als der limitierende Faktor angenommen werden kann. Möglicherweise handelt es sich hierbei um bisher unbekannte Proteine, die im bovinen Organismus noch nicht identifiziert wurden. Es würde sich daher anbieten, die Daten der Massenspektrometrie von Zeit zu Zeit anhand aktualisierter Datenbanken erneut zu überprüfen.

1.4 Schlussfolgerung

Zusammengefasst lässt sich feststellen, dass in diesem Teilprojekt der proteomische Ansatz der Immunaффinitätschromatographie auf zytoplasmatischer Ebene erfolgreich durchgeführt wurde und Proteine identifiziert werden konnten, die mit dem Gerüstprotein MPP4 interagieren. Es wurden einige bekannte Interaktionspartner gefunden und darüber hinaus gezeigt, dass MPP4 exklusiv die β -Spleißvariante von PSD95 bindet. Wie im Fall der Complexine (Reim *et al.*, 2005) ist dies ein weiterer Hinweis dafür, dass spezifische Proteine bzw. Proteinisoformen nötig sind, um die Photorezeptor-Ribbonsynapsen-Aktivität zu ermöglichen. Zusätzlich wurden Recoverin und Hsc70 als neue Interaktionspartner des MPP4-Multiproteinkomplexes detektiert, die in den synaptischen Enden MPP4 vermutlich bei der Ca^{2+} -Regulation und der Vesikel-Exozytose unterstützen.

2 UNTERSUCHUNGEN ZUR AUSWIRKUNG EINER PUNKTMUTATION IN DER PDZ -DOMÄNE DES MPP5-PROTEINS

2.1 Analyse der Protein-Protein-Interaktion von MPP5^{V301N}

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte der Beitrag von MPP5 am apikobasalen Polaritätskomplex untersucht werden. Besonderes Augenmerk lag hierbei auf der Rolle der PDZ-Domäne, die im makromolekularen Komplex das Bindeglied zu den CRB-Proteinen darstellt. Der erzeugte Austausch der konservierten, hydrophoben Aminosäure Valin gegen das hydrophile Asparagin an Position 301 der MPP5-PDZ-Domäne führte zu einem Funktionsverlust. Dies konnte durch deren gestörte Interaktion mit den drei CRB-Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System und mit CRB1 auch im *GST-pulldown-assay* gezeigt werden. Der *pulldown-assay* spiegelte dabei Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen wieder, die durch die komplette Entfernung der letzten vier Aminosäuren des CRB/Crumbs-Proteins (ERLI) ebenfalls die Interaktion mit MPP5/Stardust unterbinden konnten (Bachmann *et al.*, 2001; Hong *et al.*, 2001; Roh *et al.*, 2003; Gosens *et al.*, 2008). Somit konnte sowohl durch die Mutation einer Aminosäure in dem einen Partner, als auch durch den Verlust des Interaktionsmotivs des anderen Partners, der gleiche Effekt erzielt werden. Nach der vorhergesagten Sekundärstruktur der PDZ-Domäne (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/>) befindet sich die Aminosäure an Position 301 im β D-Faltblatt, und bildet somit einen Teil der hydrophoben Tasche (vgl. III.1.1.2, Abb. 1). Auch wenn diese Aminosäure nicht an der spezifischen Erkennung des C-terminalen Liganden beteiligt ist, scheint der Austausch einer einzigen hydrophoben durch eine hydrophile Aminosäure auszureichen, um die Bindung eines Partnerproteins zu verhindern.

Auch im Fall des Proteins Bridge-1, einem Koaktivator für die Gentranskription, verminderten Punktmutationen von Valin nach Prolin an verschiedenen Stellen der PDZ-Domäne die Interaktion mit der Histon-Acetyltransferase p300. Ein Austausch von Asparaginsäure nach Prolin zerstörte die Bindung komplett (Lee *et al.*, 2005). Ein weiteres Beispiel für die Wichtigkeit der richtigen Sequenz einer Erkennungsregion ist die Interaktion zwischen MPP5 und PAR-6. Eine Punktmutation von Valin nach Glycin in der ECR 1 (engl. *evolutionarily conserved region 1*) am N-Terminus des MPP5-Proteins verminderte die Bindung zur PDZ-Domäne von PAR-6 drastisch (Wang *et al.*, 2004).

2.2 Auswirkung der V301N-Mutation auf die MPP5-Lokalisierung in MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisierung des mutanten MPP5 in Epithelzellen, wurden die Zelllinien MDCK-C7 (Gekle *et al.*, 1994) und MDCKII (Richardson *et al.*, 1981) verwendet. Diese stellen zwei Subtypen dar, die aus einer ursprünglichen Nierentubuluszelllinie (MDCK) kloniert worden waren und sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Herkunft aus proximalen bzw. distalen Tubulus morphologisch sowie funktionell unterscheiden (Abb. 49).

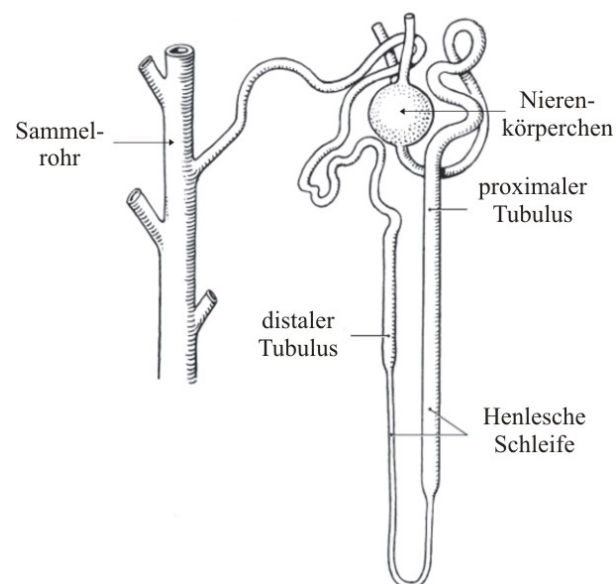


Abb. 49: Schematische Darstellung eines Nephrons. Das Nephron stellt die funktionelle Einheit der Niere dar. Verändert nach Feineis and Dauber (2000).

Der proximale, in der Nierenrinde gelegene Tubulus stellt den wichtigsten Teil des resorbierenden Systems dar und enthält die Schaltzellen (engl. *intercalated cells*, ICC). Im distalen und spät-distalen Teil, der die Hauptzellen (engl. *principal cells*, PC) beinhaltet, werden hauptsächlich Na^+ -Ionen resorbiert, und die Feineinstellung der Elektrolytresorption über apikale Na^+ -Kanäle hormonell kontrolliert (Gekle *et al.*, 1994; Blazer-Yost *et al.*, 1996). Die klonierten Subtypen ähneln jeweils einem der beiden Zelltypen, wobei die MDCK-C7-Linie die Hauptzellen und die MDCKII-Zellen die Schaltzellen repräsentieren (Richardson *et al.*, 1981; Gekle *et al.*, 1994). Ihr offensichtlichster Unterschied besteht in ihrem ausgebildeten

transepithelialen elektrischen Widerstand, der bei den MDCK-C7-Zellen etwa 20- bis 60-mal höher liegt, als bei MDCKII (Stevenson *et al.*, 1988; Gekle *et al.*, 1994; Amasheh *et al.*, 2002). Durch die Verwendung zweier Zelllinien mit unterschiedlichen Merkmalen und Eigenheiten sollten weitere Hinweise auf die Auswirkung der V301N-Mutation in der PDZ-Domäne des MPP5-Proteins gewonnen werden.

Die Überexpression des mutanten MPP5^{V301N} in den Nierenepithelzellen MDCK-C7 und MDCKII führte zur Fehllokalisierung des Proteins in das Zytoplasma. Dagegen fanden sich das heterolog überexprimierte MPP5^{Wt}, das endogene MPP5 und dessen Bindungspartner Veli3, sowie das in MDCK-C7-Zellen heterolog überexprimierte CRB3 an den Zellkontaktstellen (vgl. Makarova *et al.*, 2003; Roh *et al.*, 2003). Somit hat die Mutation in der PDZ-Domäne des MPP5 keinen Einfluss auf die Rekrutierung und die determinierte Lokalisierung dieser Proteine. Da die in dieser Arbeit verwendeten Zellen nach wie vor das endogene MPP5 exprimierten, sorgt dieses an den Zellkontakten anscheinend für die korrekte Position von Veli3.

Von Roh *et al.* (2002) wurde gezeigt, dass die Bindung der N-terminalen L27-Domäne von MPP5 an PATJ für die MPP5-Rekrutierung an die *Zonula occludens* und damit an CRB1 notwendig ist. Dass diese Interaktion durch die MPP5^{V301N}-Mutation nicht beeinträchtigt wurde, zeigte der *GST-pulldown-assay* mit dem paralogen Protein MUPP1. Somit schien nicht die Rekrutierung des MPP5-Proteins zu den Zellkontaktstellen, sondern vielmehr die Aufrechterhaltung seiner Position durch die fehlende Andockstelle beeinträchtigt worden zu sein. Interessanterweise wurde am Beispiel des *Crb1*-defizienten Mausmodells (*Crb^{rd8}*) bereits gezeigt, dass ein Verlust der Interaktion zwischen MPP5 und CRB1 auch in der Retina zu einer diffusen Verteilung von MPP5 führt (Mehalow *et al.*, 2003). Die retinalen Defekte bei der Zebrafischmutante *nok^{m227}* werden also vermutlich durch das Fehlen des *nok^{m227}*-Proteins an speziellen Plasmamembrandomänen in den Photorezeptoren bzw. Müller-Gliazellen ausgelöst. Unterstützend ergaben Untersuchungen der *nok^{m227}*-Mutante des Zebrafisches, dass das Crumbs-Protein für seine korrekte Rekrutierung ein funktionierendes Nok-Protein benötigt. Es wurde zusätzlich angenommen, dass auch andere Interaktionsdomänen von Nok neben der PDZ-Domäne hierfür in Frage kommen könnten (Wei *et al.*, 2006). Ebenso führte ein *knock-down* von MPP5 in Müller-Gliazellen, zu einem Verlust der CRB1-, CRB2- und teilweise auch der CRB3-

Lokalisierung (van Rossum *et al.*, 2006). In MDCK-Zellen dagegen scheint die Lokalisierung von CRB3 jedoch unabhängig von MPP5 zu sein, wie der *knock-down* von MPP5 zeigte (Straight *et al.*, 2004). Dies lässt eine unterschiedliche Regulierung in den verschiedenen Zellsystemen vermuten.

2.3 Einfluss von MPP5^{V301N} auf die Genexpression der MDCK-C7-Zellen

Der dominante, langfristige Effekt, der auf die Überexpression von MPP5^{V301N} zurückzuführen war, war die Erhöhung des transepithelialen Widerstandes. So baute sich bei diesen Zellen der TER langsam, jedoch unabhängig von der Ausbildungsgeschwindigkeit der *Zonula occludens* auf. In den MDCK-C7-Zellen, die von Natur aus einen sehr hohen Widerstand aufweisen, war die Erhöhung der transepithelialen Resistenz, d.h. der verlangsamte Transport von Ionen durch das Epithel, besonders deutlich. Für den Transport von Ionen durch Epithelzellen kommen prinzipiell zwei Hauptwege in Frage, nämlich der transzelluläre und der parazelluläre Weg (Abb. 50).

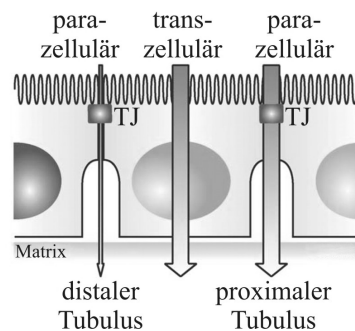


Abbildung 50: Para- und transzellulärer Transportweg von Ionen durch Epithelien. Der Ionenfluss über den parazellulären Weg ist im distalen Tubulus des Nephrons im Vergleich zum proximalen Tubulus wesentlich geringer. Verändert nach Miyoshi and Takai (2005).

Der transzelluläre Transport ist das Ergebnis der kombinierten Funktion von Transportern und Kanälen in der apikalen und basolateralen Plasmamembran, wobei der Transport aktiv oder passiv sein kann. Die ausschließlich passive parazelluläre Bewegung der Ionen aufgrund des

Konzentrationsungleichgewichts wird durch die *Zonula occludens* begrenzt. Ihre Zusammensetzung ist dabei keineswegs statisch, sondern kann feinreguliert werden. Der Aufbau und die Komponenten der *Zonula occludens* bestimmen die Durchlässigkeit der Epithelien (Kapus and Szaszi, 2006). Sind die Zell-Zell-Verbindungen so fest ausgebildet, wie bei den MDCK-C7-Zellen, werden Ionen fast ausschließlich über den transzellulären Weg transportiert, der parazelluläre Weg kann hier praktisch vernachlässigt werden (Amasheh *et al.*, 2002). Als Ursache des erhöhten TER bot sich für weitere Analysen daher weniger der parazelluläre, sondern vielmehr der transzelluläre, also der aktiv über Kanäle regulierte Transportweg an.

Tatsächlich wurde in den MDCK-C7-MPP5^{V301N}-Zellen eine Reduktion der Expressionsniveaus für den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und der Ionenpumpe Na⁺/K⁺-ATPase beobachtet, was den erhöhten Widerstand erklären könnte. Der ENaC und die Na⁺/K⁺-ATPase sind Gegenstand vieler Untersuchungen, da sie für einen funktionierenden Ionentransport in vielen Geweben unerlässlich sind. Der Natriumtransport durch Epithelien ist ein zweistufiger Prozess: Die Na⁺-Ionen gelangen zunächst durch den an der apikalen Membran exprimierten ENaC in die Epithelzelle und werden anschließend basolateral im Austausch mit K⁺-Ionen durch die Na⁺/K⁺-ATPase aus der Zelle herausgepumpt (Snyder, 2005). Von diesen zwei Stufen wird der Eintritt des Natriums im Allgemeinen als limitierender Schritt der transepithelialen Natriumreabsorption angesehen (Niisato *et al.*, 2007).

Inwieweit ein verlangsamter Durchtritt der Na⁺-Ionen durch die Zelle einen Einfluss auf die intrazelluläre Verteilung anderer Ionen, wie z.B. von Calcium hat, bleibt zu untersuchen. Erste Hinweise dafür lieferte das Ergebnis des Calcium-*switch-assays*. Der Effekt des *assays* fiel, verglichen mit dem in *knock-down*-Experimenten von anderen *Zonula occludens*-assoziierten Proteinen (Straight *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005; Straight *et al.*, 2006), relativ gering aus. Außerdem ließ sich eine verlangsamte Regeneration nicht mit dem später beobachteten erhöhten transepithelialen Widerstand in Einklang bringen. Da außerdem das endogene MPP5 nach wie vor an den Zell-Zellkontakten vorlag und die Zusammensetzung der *Zonula occludens* vermutlich unverändert war, könnte der langsamere Wiederaufbau ein sekundärer, durch das möglicherweise veränderte Ionenmilieu in der Zelle hervorgerufener Effekt sein.

Auch bei großen Änderungen der Wasser- und Salzaufnahme ist die Niere mit Hilfe ihrer spezialisierten Ionenkanäle in der Lage, die extrazelluläre Osmolarität und das Blutvolumen in engen Grenzen zu halten (Verrey *et al.*, 2000). Solch eine sensible Regulierung ist durch die Verwendung verschiedener Strategien möglich. Im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen, die durch rasche Wechsel zwischen Öffnen und Schließen gesteuert werden, wird der ENaC größtenteils durch Mechanismen reguliert, die seine Expression an der Zelloberfläche kontrollieren. Dazu gehören die Regulierung der intrazellulären Beförderung des Kanals an die Zellmembran und dessen Insertion, sowie die Endozytose und Degradierung, bzw. das Recycling der Kanäle aus den Endosomen (Malik *et al.*, 2006). Zusätzlich spielt hierbei auch die Proteinbiosynthese eine Rolle, die beispielsweise durch das Mineralcorticoid Aldosteron reguliert wird, das wiederum durch die Aktivierung mehrerer Zwischenproteine wirkt (Stockand, 2002). Obwohl solche Mechanismen auf Kosten der Geschwindigkeit gehen, liegt ihr potentieller Vorteil in ihrer größeren dynamischen Spannweite (Snyder, 2005). Die regulatorischen Mechanismen der ENaC-Aktivität und Translokation sind gut untersucht, wogegen die transkriptionelle Regulation bisher wenig verstanden wird (Niisato *et al.*, 2007).

Die Expression der Na^+/K^+ -ATPase ist ebenfalls Aldosteron-reguliert (Verrey, 1999), wobei ähnliche Elemente in den Promotoren der ENaC-Untereinheiten β und γ und dem Promotor der β 1-Untereinheit der Na^+/K^+ -ATPase eine gemeinsam koordinierte Regulation vermuten lassen (Bremner *et al.*, 2002). Dabei ist allerdings zu erwähnen, dass die Regulation der ENaC-Untereinheiten gewebsspezifisch ist und beispielsweise in der Niere andere Faktoren benötigt werden als im Colon oder in der Lunge (Bremner *et al.*, 2002; Stockand, 2002). Inwieweit sich die hier beobachtete erniedrigte Genexpression auf den tatsächlichen Proteinspiegel in der Zelle und besonders auf die Membran-inserierten Kanäle und Pumpen auswirkt, bleibt zu untersuchen. Hierbei würden sich Western-Blot, Immunzytochemie, sowie die Untersuchung der Zellen mit Hilfe der *patch-clamp*-Technik anbieten. Der beobachtete erhöhte transepitheliale Widerstand spricht jedoch für eine verminderte Anzahl von Natriumleitenden Systemen. Die Auswirkungen auf die Expression des ENaC beziehen sich zwar hauptsächlich auf die β - und γ -Untereinheiten, aber gerade diese sind für die Bestimmung der Halbwertszeit des Kanals und der Anzahl funktionsfähiger Kanäle an der Oberfläche der Membran verantwortlich (Gormley *et al.*, 2003). Der α -Untereinheit wird dagegen eine Schlüsselrolle bei der Kanalbildung zugeschrieben (Canessa

et al., 1994). Daher muss vermutlich für eine maximale Oberflächenexpression und Aktivität des ENaC die gleichzeitige Anwesenheit aller Untereinheiten gewährleistet sein (Firsov *et al.*, 1996). Ebenso ist für die Funktion der Na⁺/K⁺-ATPase das Vorhandensein beider Untereinheiten unerlässlich (Scheiner-Bobis, 2002).

Im renalen distalen Nephron ist der epitheliale Natriumkanal (ENaC) von fundamentaler Wichtigkeit für die Kontrolle des Natriumgleichgewichts. Obwohl er nur für einen relativ kleinen Anteil des reabsorbierten Natriums verantwortlich ist (< 5 %), bestimmt er doch limitierend das Maß der renalen Natriumreabsorption und ist daher für die Natriumbalance im gesamten Körper, sowie für das Blutvolumen und den damit verbundenen Blutdruck von essentieller Bedeutung (Garty and Benos, 1988; Garty and Palmer, 1997; Gormley *et al.*, 2003). In der Lunge dagegen ist der ENaC-vermittelte Natriumtransport für die Entfernung von Flüssigkeit aus den Alveolen und dadurch für den normalen Gasaustausch zuständig (Matalon and O'Brodoovich, 1999). Abweichungen von der ENaC-Funktion wurden entsprechend mit Krankheiten der Natriumhomöostase, des Blutvolumens, des Blutdrucks und der Lungenflüssigkeitsbalance in Verbindung gebracht (Hummler *et al.*, 1996; Garty and Palmer, 1997).

2.4 Hypothese für den Effekt des mutanten MPP5 in MDCK-C7-Zellen

Durch die gewonnenen Ergebnisse ist folgendes Bild vorstellbar: In einer wildtypischen MDCK-C7-Zelle ist die korrekte Lokalisierung des CRB-Proteinkomplexes für die normale Natriumreabsorption und die Regulation des ENaC und der Na⁺/K⁺-ATPase nötig. Dies geschieht möglicherweise durch eine direkte oder indirekte Assoziation des CRB-Komplexes mit ENaC an der apikalen Zellmembran. In MDCK-C7-Zellen, die das mutante MPP5^{V301N} überexprimieren, könnte diese Überexpression und die Fehllokalisierung im Zytoplasma als dominanter Effekt die Herunterregulierung der Na⁺-Transporter/-Pumpen nach sich ziehen. Dadurch würde die Anzahl der funktionierenden Kanäle an der Zelloberfläche abnehmen. Dies wiederum könnte sekundäre Auswirkungen, wie z.B. die Veränderung des Ca²⁺-Gleichgewichts haben. Interessanterweise wurde bei der Untersuchung des CRB1-defizienten Mausmodells (van de Pavert *et al.*, 2004) und einer *knock-in*-Maus mit einem Aminosäureaustausch in der extrazellulären Domäne des CRB1 (*Crb1*^{C249W/-}) bereits die Hypothese aufgestellt, dass eventuell

eines der CRB1-interagierende Proteine (MPP5, MPP3, Veli3) eine Rolle bei der Signalübertragung in den Nukleus spielen könnte (van de Pavert *et al.*, 2007).

Die Frage nach dem direkten Zusammenhang zwischen dem mutanten MPP5^{V301N} und der verminderten Expression des ENaCs und der Na⁺/K⁺-ATPase kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Es gibt allerdings einige Ansatzpunkte, die man zur Aufklärung dieser Beobachtungen verwenden könnte. Um Signalwege zu identifizieren, die durch das mutante MPP5^{V301N} gestört sind, könnten die vorhandenen Zelllinien zunächst auf den Effekt bekannter Regulatoren, z.B. durch die Zugabe der ENaC-Regulatoren Aldosteron und Vasopressin (Stockand, 2002; Rossier, 2004) und des Na⁺/K⁺-ATPase-Inhibitors Ouabain untersucht werden (Scheiner-Bobis, 2002). Außerdem könnte der vermeintliche MPP5-Interaktionspartner, der mit den Kanälen in Verbindung steht, mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems und GST-*pull-down-assay* identifiziert werden. Ein vergleichbares Ergebnis bei einem *knock-down* von CRB3 in MDCK-Zellen könnte weiterhin dazu dienen, die oben aufgestellte Hypothese zu bestätigen.

Untersuchungen an Myokardzellen des Zebrafisches konnten bereits eine genetische Interaktion zwischen *nok* und der Zebrafisch Na⁺/K⁺-ATPase *had* bei der Aufrechterhaltung der *Zonula occludens* nachweisen (Cibrian-Uhalte *et al.*, 2007). Ferner schienen sich das Ionengleichgewicht und die Stabilisierung der *Zonula occludens* gegenseitig zu kontrollieren. Die Studien am Zebrafisch und die Daten dieser Arbeit deuten daher darauf hin, dass MPP5/*nok* direkt an diesem Prozess beteiligt ist. Die Identifizierung von Kernexport- und Kernlokalisierungssignale im Nok-Protein lassen für MPP5/Nok außerdem eine nukleäre Funktion vermuten (Bit-Avrágim *et al.*, 2008). Somit könnte MPP5^{V301N} direkt in die Regulation der Expression von Genen, wie den ENaC und Na⁺/K⁺-ATPase Untereinheiten, eingreifen.

2.5 Analyse der Mpp5^{V301N} *knock-in*-Maus

Die Mpp5^{V301N}-*knock-in*-Maus ist generiert worden, um die Rolle der PDZ-Domäne *in vivo* untersuchen zu können. Die Charakterisierung dieser Tiere soll gezielte Hinweise auf den Beitrag von MPP5 an der Entstehung CRB1-assoziiertes Netzhautdegenerationen geben. Die bisherigen Untersuchungen der Mpp5^{V301N}-*knock-in*-Mäuse zeigten allerdings, dass Tiere mit einer

homozygoten *Mpp5^{V301N}*-Mutation nicht lebensfähig sind und bereits in frühen Embryonalstadien abgestoßen werden. Da homozygote Zebrafisch-*nok^{m227}*-Mutanten ebenfalls bereits im larvalen Stadium absterben (Wei and Malicki, 2002), weist dies insgesamt auf eine wichtige Rolle des MPP5/*nok* in der frühen Embryonalentwicklung hin. So führten auch andere Mutationen im *nok*-Gen des Zebrafischs zu schweren Defekten in Herz und Gehirn. Weiterführende Studien an der *nok^{m520}*-Mutante zeigten, dass Nok auch eine entscheidende Rolle bei der myocardialen Entwicklung spielt und die *nok^{m520}*-Mutation zu einer inkompletten Herzhöhlenverlängerung führt (Rohr *et al.*, 2006). Des Weiteren ist eine *nok*-Mutation im ersten Exon, die zu einer verminderten Proteinexpression im Zebrafisch führt, für eine fehlende Gehirnventrikelmorphogenese verantwortlich und hat einen gebogenen Schwanz zur Folge (Wiellette *et al.*, 2004; Lowery and Sive, 2005).

Bei der Annahme eines Funktionsverlustes des mutanten MPP5^{V301N} könnte in der heterozygoten MPP5-*knock-in*-Maus das mutante durch das wildtypische MPP5 ausgeglichen werden. Tatsächlich waren bei Beendigung dieser Arbeit die ältesten heterozygoten Tiere über ein Jahr alt und zeigten zumindest äußerlich keinen auffälligen Phänotyp. Das Vorhandensein von nur einem mutanten Allel ist somit nicht letal. Außerdem schien die Natriumreabsorption und die Regulation des ENaC und der Na⁺/K⁺-ATPase ausreichend zu funktionieren, weshalb insgesamt ein dominant negativer Effekt dieser Mutation ausgeschlossen werden kann.

Die Ergebnisse, die aus den Zellkulturversuchen mit mutantem MPP5^{V301N} gewonnen wurden, stammten aus Überexpressionsexperimenten und sind daher nicht direkt auf die Situation in den Zellen der MPP5-*knock-in*-Maus übertragbar. Zwar ist in der transfizierten MDCK-Zelle, ebenso wie in der heterozygoten Maus, das endogene wildtypische MPP5 neben dem mutanten Protein vorhanden, im Falle der Überexpression von MPP5^{V301N} sollte von dem wildtypische Protein im Vergleich dazu deutlich weniger vorliegen. Bei der MPP5-*knock-in*-Maus sollte das wildtypische und das mutante Protein hingegen zu gleichen Teilen vorhanden sein. Die entsprechende Menge an wildtypischem MPP5 scheint dort auszureichen, um den Effekt des mutanten MPP5^{V301N} auszugleichen, weshalb die Mäuse lebensfähig sind. Ob dennoch eine Veränderung in der Expression von ENaC und der Na⁺/K⁺-ATPase stattfindet, könnte durch *real-time* PCR-Analysen mit mRNA aus Nierengewebe untersucht werden. Ebenso sollte der Aufbau der Retina mit Hilfe

von immunhistochemischen Färbungen von Schnitten analysiert werden. Durch die Untersuchung von Embryos ab dem Tag E1 könnte außerdem der vermeintliche Zeitpunkt ermittelt werden, an dem homozygote Tiere abgestoßen werden.

Dem MPP5-Protein wird eine tragende Rolle beim Aufbau und der Aufrechterhaltung der Multiproteinkomplexe, die für die Polarität und Integrität der Zellen unerlässlich sind, zugeschrieben (Wei and Malicki, 2002; Roh *et al.*, 2003; Straight *et al.*, 2004; Margolis and Borg, 2005; Wei *et al.*, 2006). Darüber hinaus wurde gerade in letzter Zeit das Spektrum an Funktionen und Aufgaben von MPP5 erweitert. So konnte MPP5 eine Beteiligung bei der deregulierten Expression des Onkogens *Pttg1* und bei der *Zonula adhaerens*-Biogenese bzw. beim Lokalisieren von E-Cadherin nachgewiesen werden (van de Pavert *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2007). MPP5 erfüllt damit Funktionen, die über seine Rolle als Gerüstprotein hinausgehen und somit sind für den gesamten CRB-Komplex neue Möglichkeiten vorstellbar. Dies gilt sowohl für Epithelzellen, als auch für die Zellen der Retina. Weitere Untersuchungen des Mausmodells könnten zukünftig neue Einblicke in die molekularen Konsequenzen der Expression von MPP5^{V301N} in der Netzhaut liefern und dadurch zur Aufklärung der Entstehungsmechanismen CRB1-MPP5-assoziiertes Netzhauterkrankungen beitragen.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Aartsen, W. M., Arsanto, J. P., Chauvin, J. P., Vos, R. M., Versteeg, I., Cardozo, B. N., Le Bivic, A. and Wijnholds, J. (2009): *PSD95beta regulates plasma membrane Ca(2+) pump localization at the photoreceptor synapse*. Mol Cell Neurosci.
- Aartsen, W. M., Kantardzhieva, A., Klooster, J., van Rossum, A. G., van de Pavert, S. A., Versteeg, I., Cardozo, B. N., Tonagel, F., Beck, S. C., Tanimoto, N., Seeliger, M. W. and Wijnholds, J. (2006): *Mpp4 recruits Psd95 and Veli3 towards the photoreceptor synapse*. Hum Mol Genet 15, 1291-302.
- Amasheh, S., Meiri, N., Gitter, A. H., Schoneberg, T., Mankertz, J., Schulzke, J. D. and Fromm, M. (2002): *Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells*. J Cell Sci 115, 4969-76.
- Anderson, J. M. (1996): *Cell signalling: MAGUK magic*. Curr Biol 6, 382-4.
- Bachmann, A., Schneider, M., Theilenberg, E., Grawe, F. and Knust, E. (2001): *Drosophila Stardust is a partner of Crumbs in the control of epithelial cell polarity*. Nature 414, 638-43.
- Bhat, M. A., Izaddoost, S., Lu, Y., Cho, K. O., Choi, K. W. and Bellen, H. J. (1999): *Discs Lost, a novel multi-PDZ domain protein, establishes and maintains epithelial polarity*. Cell 96, 833-45.
- Bit-Avragim, N., Rohr, S., Rudolph, F., Van der Ven, P., Furst, D., Eichhorst, J., Wiesner, B. and Abdelilah-Seyfried, S. (2008): *Nuclear localization of the zebrafish tight junction protein nagie oko*. Dev Dyn 237, 83-90.
- Blazer-Yost, B. L., Record, R. D. and Oberleithner, H. (1996): *Characterization of hormone-stimulated Na⁺ transport in a high-resistance clone of the MDCK cell line*. Pflugers Arch 432, 685-91.
- Bradford, M. M. (1976): *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem 72, 248-54.
- Bremner, H. R., Freywald, T., O'Brodovich, H. M. and Otulakowski, G. (2002): *Promoter analysis of the gene encoding the beta-subunit of the rat amiloride-sensitive epithelial sodium channel*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 282, L124-34.
- Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H. and Marky, L. A. (1986): *Predicting DNA duplex stability from the base sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A 83, 3746-50.
- Butz, S., Okamoto, M. and Sudhof, T. C. (1998): *A tripartite protein complex with the potential to couple synaptic vesicle exocytosis to cell adhesion in brain*. Cell 94, 773-82.
- Canessa, C. M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. and Rossier, B. C. (1994): *Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits*. Nature 367, 463-7.
- Chappell, T. G., Welch, W. J., Schlossmann, D. M., Palter, K. B., Schlesinger, M. J. and Rothman, J. E. (1986): *Uncoating ATPase is a member of the 70 kilodalton family of stress proteins*. Cell 45, 3-13.
- Chen, C. K., Inglese, J., Lefkowitz, R. J. and Hurley, J. B. (1995): *Ca(2+)-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase*. J Biol Chem 270, 18060-6.
- Chetkovich, D. M., Bunn, R. C., Kuo, S. H., Kawasaki, Y., Kohwi, M. and Brecht, D. S. (2002a): *Postsynaptic targeting of alternativ postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms*. J Neurosci 22, 6415-25.

- Chetkovich, D. M., Bunn, R. C., Kuo, S. H., Kawasaki, Y., Kohwi, M. and Brecht, D. S. (2002b): *Postsynaptic targeting of alternative postsynaptic density-95 isoforms by distinct mechanisms*. J Neurosci 22, 6415-25.
- Cibrian-Uhalte, E., Langenbacher, A., Shu, X., Chen, J. N. and Abdelilah-Seyfried, S. (2007): *Involvement of zebrafish Na⁺,K⁺ ATPase in myocardial cell junction maintenance*. J Cell Biol 176, 223-30.
- Crockett, D. K., Lin, Z., Elenitoba-Johnson, K. S. and Lim, M. S. (2004): *Identification of NPM-ALK interacting proteins by tandem mass spectrometry*. Oncogene 23, 2617-29.
- Dean, D. O., Kent, C. R. and Tytell, M. (1999): *Constitutive and inducible heat shock protein 70 immunoreactivity in the normal rat eye*. Invest Ophthalmol Vis Sci 40, 2952-62.
- DeMarco, S. J. and Strehler, E. E. (2001): *Plasma membrane Ca²⁺-atpase isoforms 2b and 4b interact promiscuously and selectively with members of the membrane-associated guanylate kinase family of PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1) domain-containing proteins*. J Biol Chem 276, 21594-600.
- den Hollander, A. I., Davis, J., van der Velde-Visser, S. D., Zonneveld, M. N., Pierrottet, C. O., Koenekoop, R. K., Kellner, U., van den Born, L. I., Heckenlively, J. R., Hoyng, C. B., Handford, P. A., Roepman, R. and Cremers, F. P. (2004): *CRB1 mutation spectrum in inherited retinal dystrophies*. Hum Mutat 24, 355-69.
- den Hollander, A. I., Ghiani, M., de Kok, Y. J., Wijnholds, J., Ballabio, A., Cremers, F. P. and Broccoli, V. (2002): *Isolation of Crb1, a mouse homologue of Drosophila crumbs, and analysis of its expression pattern in eye and brain*. Mech Dev 110, 203-7.
- den Hollander, A. I., Heckenlively, J. R., van den Born, L. I., de Kok, Y. J., van der Velde-Visser, S. D., Kellner, U., Jurklies, B., van Schooneveld, M. J., Blankenagel, A., Rohrschneider, K., Wissinger, B., Cruysberg, J. R., Deutman, A. F., Brunner, H. G., Apfelstedt-Sylla, E., Hoyng, C. B. and Cremers, F. P. (2001): *Leber congenital amaurosis and retinitis pigmentosa with Coats-like exudative vasculopathy are associated with mutations in the crumbs homologue 1 (CRB1) gene*. Am J Hum Genet 69, 198-203.
- den Hollander, A. I., ten Brink, J. B., de Kok, Y. J., van Soest, S., van den Born, L. I., van Driel, M. A., van de Pol, D. J., Payne, A. M., Bhattacharya, S. S., Kellner, U., Hoyng, C. B., Westerveld, A., Brunner, H. G., Bleeker-Wagemakers, E. M., Deutman, A. F., Heckenlively, J. R., Cremers, F. P. and Bergen, A. A. (1999): *Mutations in a human homologue of Drosophila crumbs cause retinitis pigmentosa (RP12)*. Nat Genet 23, 217-21.
- Dimitratos, S. D., Woods, D. F., Stathakis, D. G. and Bryant, P. J. (1999): *Signaling pathways are focused at specialized regions of the plasma membrane by scaffolding proteins of the MAGUK family*. Bioessays 21, 912-21.
- Doerks, T., Bork, P., Kamberov, E., Makarova, O., Muecke, S. and Margolis, B. (2000): *L27, a novel heterodimerization domain in receptor targeting proteins Lin-2 and Lin-7*. Trends Biochem Sci 25, 317-8.
- Doyle, D. A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. and MacKinnon, R. (1996): *Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ*. Cell 85, 1067-76.
- Duncan, T., Fariss, R. N. and Wiggert, B. (2006): *Confocal immunolocalization of bovine serum albumin, serum retinol-binding protein, and interphotoreceptor retinoid-binding protein in bovine retina*. Mol Vis 12, 1632-9.

- Eskandari, S., Snyder, P. M., Kreman, M., Zampighi, G. A., Welsh, M. J. and Wright, E. M. (1999): *Number of subunits comprising the epithelial sodium channel*. J Biol Chem 274, 27281-6.
- Famiglietti, E. V., Stopa, E. G., McGookin, E. D., Song, P., LeBlanc, V. and Streeten, B. W. (2003): *Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina*. Brain Res 969, 195-204.
- Feineis, H. and Dauber, W. (2000): *Pocket Atlas of Human Anatomy*. Stuttgart, New York: Thieme.
- Firsov, D., Schild, L., Gautschi, I., Merillat, A. M., Schneeberger, E. and Rossier, B. C. (1996): *Cell surface expression of the epithelial Na channel and a mutant causing Liddle syndrome: a quantitative approach*. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 15370-5.
- Frischmeyer, P. A. and Dietz, H. C. (1999): *Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease*. Hum Mol Genet 8, 1893-900.
- Funke, L., Dakoji, S. and Brecht, D. S. (2005): *Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions*. Annu Rev Biochem 74, 219-45.
- Furuse, M., Furuse, K., Sasaki, H. and Tsukita, S. (2001): *Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells*. J Cell Biol 153, 263-72.
- Garin, J., Diez, R., Kieffer, S., Dermine, J. F., Duclos, S., Gagnon, E., Sadoul, R., Rondeau, C. and Desjardins, M. (2001): *The phagosome proteome: insight into phagosome functions*. J Cell Biol 152, 165-80.
- Garty, H. and Benos, D. J. (1988): *Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na⁺ channel*. Physiol Rev 68, 309-73.
- Garty, H. and Palmer, L. G. (1997): *Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation*. Physiol Rev 77, 359-96.
- Gavin, A. C., Bosche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J. M., Michon, A. M., Cruciat, C. M., Remor, M., Hofert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heurtier, M. A., Copley, R. R., Edlmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002): *Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes*. Nature 415, 141-7.
- Gekle, M., Wunsch, S., Oberleithner, H. and Silbernagl, S. (1994): *Characterization of two MDCK-cell subtypes as a model system to study principal cell and intercalated cell properties*. Pflugers Arch 428, 157-62.
- Gerber, S., Perrault, I., Hanein, S., Shalev, S., Zlotogora, J., Barbet, F., Ducroq, D., Dufier, J., Munnich, A., Rozet, J. and Kaplan, J. (2002): *A novel mutation disrupting the cytoplasmic domain of CRB1 in a large consanguineous family of Palestinian origin affected with Leber congenital amaurosis*. Ophthalmic Genet 23, 225-35.
- Gormley, K., Dong, Y. and Sagnella, G. A. (2003): *Regulation of the epithelial sodium channel by accessory proteins*. Biochem J 371, 1-14.
- Gosens, I., den Hollander, A. I., Cremers, F. P. and Roepman, R. (2008): *Composition and function of the Crumbs protein complex in the mammalian retina*. Exp Eye Res 86, 713-26.

- Harris, B. Z., Venkatasubrahmanyam, S. and Lim, W. A. (2002): *Coordinated folding and association of the LIN-2, -7 (L27) domain. An obligate heterodimerization involved in assembly of signaling and cell polarity complexes.* J Biol Chem 277, 34902-8.
- Hartinger, J., Stenius, K., Hogemann, D. and Jahn, R. (1996): *16-BAC/SDS-PAGE: a two-dimensional gel electrophoresis system suitable for the separation of integral membrane proteins.* Anal Biochem 240, 126-33.
- Hemmer, W., Riesinger, I., Wallimann, T., Eppenberger, H. M. and Quest, A. F. (1993): *Brain-type creatine kinase in photoreceptor cell outer segments: role of a phosphocreatine circuit in outer segment energy metabolism and phototransduction.* J Cell Sci 106 (Pt 2), 671-83.
- Higashide, T., McLaren, M. J. and Inana, G. (1998): *Localization of HRG4, a photoreceptor protein homologous to Unc-119, in ribbon synapse.* Invest Ophthalmol Vis Sci 5, 690-8.
- Hillier, B. J., Christopherson, K. S., Prehoda, K. E., Bredt, D. S. and Lim, W. A. (1999): *Unexpected modes of PDZ domain scaffolding revealed by structure of nNOS-syntrophin complex.* Science 284, 812-5.
- Hong, Y., Ackerman, L., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2003): *Distinct roles of Bazooka and Stardust in the specification of Drosophila photoreceptor membrane architecture.* Proc Natl Acad Sci U S A 100, 12712-7.
- Hong, Y., Stronach, B., Perrimon, N., Jan, L. Y. and Jan, Y. N. (2001): *Drosophila Stardust interacts with Crumbs to control polarity of epithelia but not neuroblasts.* Nature 414, 634-8.
- Hough, C. D., Woods, D. F., Park, S. and Bryant, P. J. (1997): *Organizing a functional junctional complex requires specific domains of the Drosophila MAGUK Discs large.* Genes Dev 11, 3242-53.
- Hummler, E., Barker, P., Gatzky, J., Beermann, F., Verdumo, C., Schmidt, A., Boucher, R. and Rossier, B. C. (1996): *Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice.* Nat Genet 12, 325-8.
- Hurd, T. W., Gao, L., Roh, M. H., Macara, I. G. and Margolis, B. (2003): *Direct interaction of two polarity complexes implicated in epithelial tight junction assembly.* Nat Cell Biol 5, 137-42.
- Izaddoost, S., Nam, S. C., Bhat, M. A., Bellen, H. J. and Choi, K. W. (2002): *Drosophila Crumbs is a positional cue in photoreceptor adherens junctions and rhabdomeres.* Nature 416, 178-83.
- Janßen, A. (2008): *Untersuchungen zu den molekularen Ursachen der beiden Makulopathien Sorsby Fundusdystrophie und X-gebundene juvenile Retinoschisis.* Universität Regensburg, Naturwissenschaftliche Fakultät III, Dissertation
- Jo, K., Derin, R., Li, M. and Bredt, D. S. (1999): *Characterization of MALS/Velis-1, -2, and -3: a family of mammalian LIN-7 homologs enriched at brain synapses in association with the postsynaptic density-95/NMDA receptor postsynaptic complex.* J Neurosci 19, 4189-99.
- Johnson, K., Grawe, F., Grzeschik, N. and Knust, E. (2002): *Drosophila crumbs is required to inhibit light-induced photoreceptor degeneration.* Curr Biol 12, 1675-80.
- Kamberov, E., Makarova, O., Roh, M., Liu, A., Karnak, D., Straight, S. and Margolis, B. (2000): *Molecular cloning and characterization of Pals, proteins associated with mLin-7.* J Biol Chem 275, 11425-31.
- Kantardzhieva, A., Gosens, I., Alexeeva, S., Punte, I. M., Versteeg, I., Krieger, E., Neefjes-Mol, C. A., den Hollander, A. I., Letteboer, S. J., Klooster, J., Cremers, F. P., Roepman, R. and Wijnholds, J. (2005): *MPP5 recruits MPP4 to the CRB1 complex in photoreceptors.* Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 2192-201.

- Kapus, A. and Szaszi, K. (2006): *Coupling between apical and paracellular transport processes*. *Biochem Cell Biol* 84, 870-80.
- Karnak, D., Lee, S. and Margolis, B. (2002): *Identification of multiple binding partners for the amino-terminal domain of synapse-associated protein 97*. *J Biol Chem* 277, 46730-5.
- Kivela, T., Tarkkanen, A. and Virtanen, I. (1986): *Intermediate filaments in the human retina and retinoblastoma. An immunohistochemical study of vimentin, glial fibrillary acidic protein, and neurofilaments*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 27, 1075-84.
- Klebes, A. and Knust, E. (2000): *A conserved motif in Crumbs is required for E-cadherin localisation and zonula adherens formation in Drosophila*. *Curr Biol* 10, 76-85.
- Knust, E. and Bossinger, O. (2002): *Composition and formation of intercellular junctions in epithelial cells*. *Science* 298, 1955-9.
- Kolb, H. (1991): *The neural organization of the human retina*. In "Principals and Practices of Clinical Electrophysiology of Vision" (Eds. Heckenlively, J.R. and Arden, G.B.) Mosby Year Book Inc., St. Louis, pp. 25-52.
- Koulen, P. (1999): *Localization of synapse-associated proteins during postnatal development of the rat retina*. *Eur J Neurosci* 11, 2007-18.
- Koulen, P., Fletcher, E. L., Craven, S. E., Brecht, D. S. and Wassle, H. (1998): *Immunocytochemical localization of the postsynaptic density protein PSD-95 in the mammalian retina*. *J Neurosci* 18, 10136-49.
- Krämer, F. (2003): *Molecular and Biochemical Investigations into VMD2, the gene associated with Best Disease*. Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Fakultät für Biologie, Dissertation
- Laemmli, U. K. (1970): *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* 227, 680-5.
- Lee, J. H., Volinic, J. L., Banz, C., Yao, K. M. and Thomas, M. K. (2005): *Interactions with p300 enhance transcriptional activation by the PDZ-domain coactivator Bridge-1*. *J Endocrinol* 187, 283-92.
- Lemmers, C., Medina, E., Delgrossi, M. H., Michel, D., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A. (2002): *hINADL/PATJ, a homolog of discs lost, interacts with crumbs and localizes to tight junctions in human epithelial cells*. *J Biol Chem* 277, 25408-15.
- Lemmers, C., Michel, D., Lane-Guermonprez, L., Delgrossi, M. H., Medina, E., Arsanto, J. P. and Le Bivic, A. (2004): *CRB3 binds directly to Par6 and regulates the morphogenesis of the tight junctions in mammalian epithelial cells*. *Mol Biol Cell* 15, 1324-33.
- Lenzi, D. and von Gersdorff, H. (2001): *Structure suggests function: the case for synaptic ribbons as exocytotic nanomachines*. *Bioessays* 23, 831-40.
- Li, M., Zhang, S. S. and Barnstable, C. J. (2003): *Developmental and tissue expression patterns of mouse Mpp4 gene*. *Biochem Biophys Res Commun* 307, 229-35.
- Lipschutz, J. H., Li, S., Arisco, A. and Balkovetz, D. F. (2005): *Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells*. *J Biol Chem* 280, 3780-8.
- Loughran, G., Healy, N. C., Kiely, P. A., Huigsloot, M., Kedersha, N. L. and O'Connor, R. (2005): *Mystique is a new insulin-like growth factor-I-regulated PDZ-LIM domain protein that promotes cell attachment and migration and suppresses Anchorage-independent growth*. *Mol Biol Cell* 16, 1811-22.
- Lowery, L. A. and Sive, H. (2005): *Initial formation of zebrafish brain ventricles occurs independently of circulation and requires the nagie oko and snakehead/atp1a1a.1 gene products*. *Development* 132, 2057-67.

- Macfarlane, D. E. (1989): *Two dimensional benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium chloride---sodium dodecyl sulfate preparative polyacrylamide gel electrophoresis: a high capacity high resolution technique for the purification of proteins from complex mixtures*. Anal Biochem 176, 457-63.
- MacKenzie, D., Arendt, A., Hargrave, P., McDowell, J. H. and Molday, R. S. (1984): *Localization of binding sites for carboxyl terminal specific anti-rhodopsin monoclonal antibodies using synthetic peptides*. Biochemistry 23, 6544-9.
- Makarova, O., Roh, M. H., Liu, C. J., Laurinec, S. and Margolis, B. (2003): *Mammalian Crumbs3 is a small transmembrane protein linked to protein associated with Lin-7 (Pals1)*. Gene 302, 21-9.
- Malik, B., Price, S. R., Mitch, W. E., Yue, Q. and Eaton, D. C. (2006): *Regulation of epithelial sodium channels by the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway*. Am J Physiol Renal Physiol 290, F1285-94.
- Margolis, B. and Borg, J. P. (2005): *Apicobasal polarity complexes*. J Cell Sci 118, 5157-9.
- Marmur, J. (1961): *A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms*. J. Mol. Biol. 3, 208-218.
- Matalon, S. and O'Brodovich, H. (1999): *Sodium channels in alveolar epithelial cells: molecular characterization, biophysical properties, and physiological significance*. Annu Rev Physiol 61, 627-61.
- Mayer, B. J. (2001): *SH3 domains: complexity in moderation*. J Cell Sci 114, 1253-63.
- Mayer, M. P. and Bukau, B. (1998): *Hsp70 chaperone systems: diversity of cellular functions and mechanisms of action*. Biol Chem 379, 261-8.
- McGee, A. W., Dakoji, S. R., Olsen, O., Bredt, D. S., Lim, W. A. and Prehoda, K. E. (2001): *Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins*. Mol Cell 8, 1291-301.
- McKay, G. J., Clarke, S., Davis, J. A., Simpson, D. A. and Silvestri, G. (2005): *Pigmented paravenous chorioretinal atrophy is associated with a mutation within the crumbs homolog 1 (CRB1) gene*. Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 322-8.
- Mehalow, A. K., Kameya, S., Smith, R. S., Hawes, N. L., Denegre, J. M., Young, J. A., Bechtold, L., Haider, N. B., Tepass, U., Heckenlively, J. R., Chang, B., Naggert, J. K. and Nishina, P. M. (2003): *CRB1 is essential for external limiting membrane integrity and photoreceptor morphogenesis in the mammalian retina*. Hum Mol Genet 12, 2179-89.
- Mendel, G. (1866): *Versuche über Pflanzen-Hybriden*. Verhandlungen des Naturforschenden Vereins zu Brünn 4: 3-47
- Miyoshi, J. and Takai, Y. (2005): *Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity*. Adv Drug Deliv Rev 57, 815-55.
- Molday, L. L., Wu, W. W. and Molday, R. S. (2007): *Retinoschisin (RS1), the protein encoded by the X-linked retinoschisis gene, is anchored to the surface of retinal photoreceptor and bipolar cells through its interactions with a Na/K ATPase-SARM1 complex*. J Biol Chem 282, 32792-801.
- Morgan, J. R., Prasad, K., Jin, S., Augustine, G. J. and Lafer, E. M. (2001): *Uncoating of clathrin-coated vesicles in presynaptic terminals: roles for Hsc70 and auxilin*. Neuron 32, 289-300.
- Nam, S. C. and Choi, K. W. (2003): *Interaction of Par-6 and Crumbs complexes is essential for photoreceptor morphogenesis in Drosophila*. Development 130, 4363-72.

- Niisato, N., Taruno, A. and Marunaka, Y. (2007): *Involvement of p38 MAPK in hypotonic stress-induced stimulation of beta- and gamma-ENaC expression in renal epithelium*. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 819-24.
- Omori, Y. and Malicki, J. (2006): *oko meduzy and related crumbs genes are determinants of apical cell features in the vertebrate embryo*. *Curr Biol* 16, 945-57.
- Pellikka, M., Tanentzapf, G., Pinto, M., Smith, C., McGlade, C. J., Ready, D. F. and Tepass, U. (2002): *Crumbs, the Drosophila homologue of human CRB1/RP12, is essential for photoreceptor morphogenesis*. *Nature* 416, 143-9.
- Perego, C., Vanoni, C., Villa, A., Longhi, R., Kaeck, S. M., Frohli, E., Hajnal, A., Kim, S. K. and Pietrini, G. (1999): *PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells*. *EMBO J* 18, 2384-93.
- Ponting, C. P., Phillips, C., Davies, K. E. and Blake, D. J. (1997): *PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites*. *Bioessays* 19, 469-79.
- Rajasekaran, A. K., Hojo, M., Huima, T. and Rodriguez-Boulan, E. (1996): *Catenins and zonula occludens-1 form a complex during early stages in the assembly of tight junctions*. *J Cell Biol* 132, 451-63.
- Reim, K., Wegmeyer, H., Brandstatter, J. H., Xue, M., Rosenmund, C., Dresbach, T., Hofmann, K. and Brose, N. (2005): *Structurally and functionally unique complexins at retinal ribbon synapses*. *J Cell Biol* 169, 669-80.
- Richard, M., Grawe, F. and Knust, E. (2006a): *DPATJ plays a role in retinal morphogenesis and protects against light-dependent degeneration of photoreceptor cells in the Drosophila eye*. *Dev Dyn* 235, 895-907.
- Richard, M., Roepman, R., Aartsen, W. M., van Rossum, A. G., den Hollander, A. I., Knust, E., Wijnholds, J. and Cremers, F. P. (2006b): *Towards understanding CRUMBS function in retinal dystrophies*. *Hum Mol Genet* 15 Spec No 2, R235-43.
- Richardson, J. C., Scalera, V. and Simmons, N. L. (1981): *Identification of two strains of MDCK cells which resemble separate nephron tubule segments*. *Biochim Biophys Acta* 673, 26-36.
- Roh, M. H., Fan, S., Liu, C. J. and Margolis, B. (2003): *The Crumbs3-Pals1 complex participates in the establishment of polarity in mammalian epithelial cells*. *J Cell Sci* 116, 2895-906.
- Roh, M. H., Makarova, O., Liu, C. J., Shin, K., Lee, S., Laurinec, S., Goyal, M., Wiggins, R. and Margolis, B. (2002): *The Maguk protein, Pals1, functions as an adapter, linking mammalian homologues of Crumbs and Discs Lost*. *J Cell Biol* 157, 161-72.
- Roh, M. H. and Margolis, B. (2003): *Composition and function of PDZ protein complexes during cell polarization*. *Am J Physiol Renal Physiol* 285, F377-87.
- Rohr, S., Bit-Avragim, N. and Abdelilah-Seyfried, S. (2006): *Heart and soul/PRKCi and nagie oko/Mpp5 regulate myocardial coherence and remodeling during cardiac morphogenesis*. *Development* 133, 107-15.
- Rossier, B. C. (2004): *The epithelial sodium channel: activation by membrane-bound serine proteases*. *Proc Am Thorac Soc* 1, 4-9.
- Rossier, B. C., Pradervand, S., Schild, L. and Hummler, E. (2002): *Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors*. *Annu Rev Physiol* 64, 877-97.
- Ruff, P., Speicher, D. W. and Husain-Chishti, A. (1991): *Molecular identification of a major palmitoylated erythrocyte membrane protein containing the src homology 3 motif*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 6595-9.

- Ruiz-Ederra, J., Garcia, M., Hicks, D. and Vecino, E. (2004): *Comparative study of the three neurofilament subunits within pig and human retinal ganglion cells*. Mol Vis 10, 83-92.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989): *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sampath, A. P., Strissel, K. J., Eilas, R., Arshavsky, V. Y., McGinnis, J. F., Chen, J., Kawamura, S., Rieke, F. and Hurley, J. B. (2005): *Recoverin improves rod-mediated vision by enhancing signal transmission in the mouse retina*. Neuron 46, 413-20.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977): *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A 74, 5463-7.
- Scheiner-Bobis, G. (2002): *The sodium pump. Its molecular properties and mechanics of ion transport*. Eur J Biochem 269, 2424-33.
- Schluter, O. M., Xu, W. and Malenka, R. C. (2006): *Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function*. Neuron 51, 99-111.
- Schmitz, F., Königstorfer, A. and Südhof, T. C. (2000): *RIBEYE, a component of synaptic ribbons: a protein's journey through evolution provides insight into synaptic ribbon function*. Neuron 28, 857-72.
- Schmitz, F., Tabares, L., Khimich, D., Strenzke, N., de la Villa-Polo, P., Castellano-Munoz, M., Bulankina, A., Moser, T., Fernandez-Chacon, R. and Südhof, T. C. (2006): *CSPalpha-deficiency causes massive and rapid photoreceptor degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A 103, 2926-31.
- Schneeberger, E. E. and Lynch, R. D. (2004): *The tight junction: a multifunctional complex*. Am J Physiol Cell Physiol 286, C1213-28.
- Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E. and Moss, B. (2005): *Poxvirus multiprotein entry-fusion complex*. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18572-7.
- Sheng, M. (2001): *Molecular organization of the postsynaptic specialization*. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 7058-61.
- Sheng, M. and Sala, C. (2001): *PDZ domains and the organization of supramolecular complexes*. Annu Rev Neurosci 24, 1-29.
- Shin, K., Straight, S. and Margolis, B. (2005): *PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells*. J Cell Biol 168, 705-11.
- Snyder, P. M. (2005): *Minireview: regulation of epithelial Na⁺ channel trafficking*. Endocrinology 146, 5079-85.
- Stevenson, B. R., Anderson, J. M., Goodenough, D. A. and Mooseker, M. S. (1988): *Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance*. J Cell Biol 107, 2401-8.
- Stockand, J. D. (2002): *New ideas about aldosterone signaling in epithelia*. Am J Physiol Renal Physiol 282, F559-76.
- Stöhr, H., Molday, L. L., Molday, R. S., Weber, B. H., Biedermann, B., Reichenbach, A. and Kramer, F. (2005): *Membrane-associated guanylate kinase proteins MPP4 and MPP5 associate with Veli3 at distinct intercellular junctions of the neurosensory retina*. J Comp Neurol 481, 31-41.
- Stöhr, H., Stojic, J. and Weber, B. H. (2003): *Cellular localization of the MPP4 protein in the mammalian retina*. Invest Ophthalmol Vis Sci 44, 5067-74.
- Stöhr, H. and Weber, B. H. (2001): *Cloning and characterization of the human retina-specific gene MPP4, a novel member of the p55 subfamily of MAGUK proteins*. Genomics 74, 377-84.

- Straight, S. W., Pieczynski, J. N., Whiteman, E. L., Liu, C. J. and Margolis, B. (2006): *Mammalian lin-7 stabilizes polarity protein complexes*. J Biol Chem 281, 37738-47.
- Straight, S. W., Shin, K., Fogg, V. C., Fan, S., Liu, C. J., Roh, M. and Margolis, B. (2004): *Loss of PALS1 expression leads to tight junction and polarity defects*. Mol Biol Cell 15, 1981-90.
- Strissel, K. J., Lishko, P. V., Trieu, L. H., Kennedy, M. J., Hurley, J. B. and Arshavsky, V. Y. (2005): *Recoverin undergoes light-dependent intracellular translocation in rod photoreceptors*. J Biol Chem 280, 29250-5.
- Swayne, L. A., Beck, K. E. and Braun, J. E. (2006): *The cysteine string protein multimeric complex*. Biochem Biophys Res Commun 348, 83-91.
- Tepass, U., Theres, C. and Knust, E. (1990): *crumbs encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of Drosophila epithelial cells and required for organization of epithelia*. Cell 61, 787-99.
- Tezel, G., Yang, X. and Cai, J. (2005): *Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma*. Invest Ophthalmol Vis Sci 46, 3177-87.
- van de Pavert, S. A., Kantardzhieva, A., Malysheva, A., Meuleman, J., Versteeg, I., Levelt, C., Klooster, J., Geiger, S., Seeliger, M. W., Rashbass, P., Le Bivic, A. and Wijnholds, J. (2004): *Crumbs homologue 1 is required for maintenance of photoreceptor cell polarization and adhesion during light exposure*. J Cell Sci 117, 4169-77.
- van de Pavert, S. A., Meuleman, J., Malysheva, A., Aartsen, W. M., Versteeg, I., Tonagel, F., Kamphuis, W., McCabe, C. J., Seeliger, M. W. and Wijnholds, J. (2007): *A single amino acid substitution (Cys249Trp) in Crb1 causes retinal degeneration and deregulates expression of pituitary tumor transforming gene Pttg1*. J Neurosci 27, 564-73.
- van den Hurk, J. A., Rashbass, P., Roepman, R., Davis, J., Voesenek, K. E., Arends, M. L., Zonneveld, M. N., van Roekel, M. H., Cameron, K., Rohrschneider, K., Heckenlively, J. R., Koenekoop, R. K., Hoyng, C. B., Cremers, F. P. and den Hollander, A. I. (2005): *Characterization of the Crumbs homolog 2 (CRB2) gene and analysis of its role in retinitis pigmentosa and Leber congenital amaurosis*. Mol Vis 11, 263-73.
- van Rossum, A. G., Aartsen, W. M., Meuleman, J., Klooster, J., Malysheva, A., Versteeg, I., Arsanto, J. P., Le Bivic, A. and Wijnholds, J. (2006): *Pals1/Mpp5 is required for correct localization of Crb1 at the subapical region in polarized Muller glia cells*. Hum Mol Genet 15, 2659-72.
- Verrey, F. (1999): *Early aldosterone action: toward filling the gap between transcription and transport*. Am J Physiol 277, F319-27.
- Verrey, F., Hummler, E., Schild, L. and Rossier, B. C. (2000). *Control of sodium transport by aldosterone*. The kidney, physiology and pathophysiology. G. Giebisch and D. Seldin. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. I: 1441-1471.
- Wang, Q., Chen, X. W. and Margolis, B. (2007): *PALS1 regulates E-cadherin trafficking in mammalian epithelial cells*. Mol Biol Cell 18, 874-85.
- Wang, Q., Hurd, T. W. and Margolis, B. (2004): *Tight junction protein Par6 interacts with an evolutionarily conserved region in the amino terminus of PALS1/stardust*. J Biol Chem 279, 30715-21.
- Wei, X. and Malicki, J. (2002): *nagie oko, encoding a MAGUK-family protein, is essential for cellular patterning of the retina*. Nat Genet 31, 150-7.

- Wei, X., Zou, J., Takechi, M., Kawamura, S. and Li, L. (2006): *Nok plays an essential role in maintaining the integrity of the outer nuclear layer in the zebrafish retina*. Exp Eye Res 83, 31-44.
- Wen, H., Watry, D. D., Marcondes, M. C. and Fox, H. S. (2004): *Selective decrease in paracellular conductance of tight junctions: role of the first extracellular domain of claudin-5*. Mol Cell Biol 24, 8408-17.
- Wendt, C. H., Towle, H., Sharma, R., Duvick, S., Kawakami, K., Gick, G. and Ingbar, D. H. (1998): *Regulation of Na-K-ATPase gene expression by hyperoxia in MDCK cells*. Am J Physiol 274, C356-64.
- Wiellette, E., Grinblat, Y., Austen, M., Hirsinger, E., Amsterdam, A., Walker, C., Westerfield, M. and Sive, H. (2004): *Combined haploid and insertional mutation screen in the zebrafish*. Genesis 40, 231-40.
- Williams, D. S., Arikawa, K. and Paallysaho, T. (1990): *Cytoskeletal components of the adherens junctions between the photoreceptors and the supportive Muller cells*. J Comp Neurol 295, 155-64.
- Woodford, B. J. and Blanks, J. C. (1989): *Localization of actin and tubulin in developing and adult mammalian photoreceptors*. Cell Tissue Res 256, 495-505.
- Woods, D. F. and Bryant, P. J. (1991): *The discs-large tumor suppressor gene of Drosophila encodes a guanylate kinase homolog localized at septate junctions*. Cell 66, 451-64.
- Yang, J., Pawlyk, B., Wen, X. H., Adamian, M., Soloviev, M., Michaud, N., Zhao, Y., Sandberg, M. A., Makino, C. L. and Li, T. (2007): *Mpp4 is required for proper localization of plasma membrane calcium ATPases and maintenance of calcium homeostasis at the rod photoreceptor synaptic terminals*. Hum Mol Genet 16, 1017-29.
- Yeaman, C., Grindstaff, K. K. and Nelson, W. J. (1999): *New perspectives on mechanisms involved in generating epithelial cell polarity*. Physiol Rev 79, 73-98.
- Young, J. C., Barral, J. M. and Ulrich Hartl, F. (2003): *More than folding: localized functions of cytosolic chaperones*. Trends Biochem Sci 28, 541-7.
- Yuan, A., Rao, M. V., Sasaki, T., Chen, Y., Kumar, A., Veeranna, Liem, R. K., Eyer, J., Peterson, A. C., Julien, J. P. and Nixon, R. A. (2006): *Alpha-internexin is structurally and functionally associated with the neurofilament triplet proteins in the mature CNS*. J Neurosci 26, 10006-19.

VIII ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

μ	Mikro ($\times 10^{-6}$)	E	Eluat oder embryonaler Tag
1D, 2D	ein-, -zweidimensional	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
16-BAC	Benzyltrimethylammonium- <i>n</i> -hexadecylammonium-Chlorid	ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
A	Adenosin	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Abb.	Abbildung	EM	Elektronenmikroskopie
Ade	Adenin-Hemisulfat	ENaC	epithelialer Natriumkanal (<i>epithelial sodium channel</i>)
Amp	Ampicillin	ERK	extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (<i>extracellular signal regulated kinase</i>) und andere (<i>et alia</i>)
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure	et al.	und andere (<i>et alia</i>)
aPKC	<i>atypical protein kinase C</i>	F	vorwärts (<i>forward</i>)
APS	Ammoniumsulfat	FCS	fetales Kälberserum
AS	Aminosäure(n)	FL	Nervenfaser-schicht (<i>fiber layer</i>)
ATPase	Adenosin-triphosphatase	FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BES	N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-Aminoethansulfonsäure	G	Guanosin
bp	Basenpaar(e)	g	Gramm oder Schwerebeschleunigung
BSA	bovines Serumalbumin	G418	Geneticin
C	Cytidin	GAPDH	Glyzerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
°C	Grad Celcius	GCL	Ganglienzellschicht
ca.	circa	GFAP	Gliafaser-Protein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
Ca ²⁺	Calcium	GST	Glutathion-S-Transferase
CASK	<i>calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase</i>	GUK	Guanlytkinase
CaM	Calmodulin	h	Stunde(n)
CC	Verbindungszilium (<i>connecting cilium</i>)	H ₂ O	Wasser
cDNA	komplementäre DNA	het	heterozygot
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)Dimethylammonio]-1-Propanesulfonat	His	Histidin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat	Hsc70	<i>heat shock cognate protein 70</i>
cm ²	Quadrat-zentimeter	Ig	Immunglobulin
CNBr	Cyanogenbromid	IH	Immunhistochemie
CO ₂	Kohlenstoffdioxid	ILM	innere limitierende Membran (<i>inner limiting membrane</i>)
CRB	<i>crumbs</i>	INL	innere Kernschicht (<i>inner nuclear layer</i>)
CSP	<i>cysteine string protein</i>	IP	Immunpräzipitation
Ct	Zyklus-Schwellenwert (<i>cycle threshold</i>)	IPG	<i>immobilized pH gradient</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phenylindol	IPL	innere plexiforme Schicht (<i>inner plexiform layer</i>)
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	IP3R	Inositol-Triphosphat-Rezeptor
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphate	IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
dH ₂ O	destilliertes Wasser	IS	innere Photorezeptorsegmente (<i>inner segments</i>)
DIC	Differentieller Interferenzkontrast (<i>differential interference contrast</i>)	IZ	Immunzytochemie
Dlg	<i>discs large</i>	kb	Kilobasenpaar(e)
Dlt	<i>discs lost</i>	kDa	Kilodalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	l	Liter
DMSO	Dimethylsulfoxid	lac	Laktose
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LB	<i>lysogeny broth</i>
DNase	Desoxyribonuklease	LCA	Leber congenitale Amaurose
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate	m	Milli ($\times 10^{-3}$)
DOC	Desoxycholat	M	Molar (mol/l)
dsDNA	doppelsträngige DNA	mA	Milliampere
DTT	Dithiothreitol	MAGUK	<i>membrane associated guanylate kinase</i>

MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight</i>	rcf	relative Zentrifugalkraft (<i>relative centrifugal force</i>)
MDCK	<i>Madin Darby Canine Kidney</i>	rd8	<i>retinal degeneration</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>	Rho	Rhodopsin
mg	Milligramm	RNA	Ribonukleinsäure
min	Minute	RNase	Ribonuklease
mm	Millimeter	RP	Retinitis Pigmentosa
mol	Molarität	RPE	retinales Pigmentepithel
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	rpm	Umdrehungen pro minute (<i>rounds per minute</i>)
MPP	palmitoyliertes Membranprotein (<i>membrane palmitoylated protein</i>)	RPMI	Zellkulturmedium vom <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial Institute
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)	RQ	relative Quantifizierung
MUPP1	<i>multi-PDZ domain protein 1</i>	RT	Raumtemperatur
n	Nano ($\times 10^{-9}$)	RT-PCR	reverse Transkriptase-PCR
NCBI	National Center for Biotechnology Information	S	Überstand (<i>supernatant</i>)
NEFL	<i>neurofilament light-chain polypeptide</i>	SAR	subapikale Region
NFL	Nervenfaserschicht	SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
nm	Nanometer	Sdt	<i>stardust</i>
Nok	Nagie oko	sec	Sekunde
OD	optische Dichte	SERCA	<i>Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase</i>
OLM	äußere limitierende Membran (<i>outer limiting membrane</i>)	SH3	src-Homologie 3
ONL	äußere Kernschicht (<i>inner nuclear layer</i>)	shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
ONPG	o-Nitrophenol- β -D-Galactopyranosid	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
OPL	äußere plexiforme Schicht (<i>outer plexiform layer</i>)	SOC	<i>super optimal broth with catabolite repression</i>
OS	äußere Photorezeptorsegmente (<i>outer segments</i>)	τ	Zeit (<i>time</i>)
P	Pellet oder postnataler Tag	T	Thymidin, Tween
PAA	Polyacrylamid	Tab.	Tabelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
Pals1	<i>protein associated with Lin-7 1</i>	TBE	Tris-Borat-EDTA
Par	<i>partitioning defective</i>	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i>)
PATJ	<i>Pals1-associated tight junction protein</i>	TCA	Trichloressigsäure (<i>trichloroacetic acid</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)	TE	Tris-EDTA
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	TEMED	Tetramethylethyldiamin
PDZ	PSD95, Dlg, ZO-1	TER	transepithelialer Widerstand (<i>transepithelial resistance</i>)
PEG	Polyethylenglykol	TJ (\approx ZO)	<i>tight junction</i>
PFA	Paraformaldehyd	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	U	Einheit (<i>unit</i>)
pH	potentia hydrogenii	u.a.	unter anderem
pI	isoelektrischer Punkt	V	Volt
PMCA	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPasen	Vol	Volumen
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid	Wt	Wildtyp
PNA	<i>peanut agglutinin</i>	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid
PPCRA	pigmentierte paravenöse chorioretinale Atrophie	YPDA	<i>yeast peptone dextrose adenine</i>
PPRPE	RP mit gut erhaltenem paraarteriolarem RPE	z.B.	zum Beispiel
PSD95	<i>postsynaptic density protein 95</i>	ZA	<i>Zonula adhaerens</i>
Pttg	<i>pituitary tumor transforming gene</i>	ZKÜ	Zellkulturüberstand
PVDF	Polyvinylidenfluorid	ZO (\approx TJ)	<i>Zonula occludens</i>
qRT	quantitative <i>real-time</i>		
R	rückwärts (<i>reverse</i>)		
r	rekombinant		

(Englische oder lateinische Begriffe sind durch Kursivschrift gekennzeichnet.)

IX APPENDIX

1 PRIMERLISTEN

In den folgenden Tabellen sind alle Primer aufgelistet, die für die selbst hergestellten Konstrukte in dieser Arbeit verwendet wurden. Alle weiteren Konstrukte standen bereits zur Verfügung und sind in Tabelle 15 angegeben.

Tabelle 7: Primer zur Eingrenzung des Epitops des MPP4-3H10 Antikörpers.

Epitop	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße	AS-Position
#1	bovF8_EcoRI	CTGAATTCAGTGAGGAAGCAATGAGGAT	132 bp	151 – 188
	bovR14_XhoI	GCCGCTCGAGTTAACCATGGATGACTCTGGC		
#2	bovF8_EcoRI	CTGAATTCAGTGAGGAAGCAATGAGGAT	178 bp	151 – 203
	bovR15_XhoI	TTCACCTCGAGTTAGTTTGTCCCCGGCGTATA		
#3	bovF12_EcoRI	CAGAATTCGGCCAGAGTCATCCATGGTG	127 bp	183 – 218
	bovR1_XhoI	CCTTCTCGAGTTATTGCTCAGGGTCCAGTCC		
#4	bovF8_EcoRI	CTGAATTCAGTGAGGAAGCAATGAGGAT	225 bp	151 – 218
	bovR1_XhoI	CCTTCTCGAGTTATTGCTCAGGGTCCAGTCC		

Tabelle 8: MPP5-Mutagenese-Primer.

Mutation	Primer	Sequenz (5'-3')
Fehlerkorrektur der Wt-PDZ-Domäne	MPP5_MutWT_F	TGGTCTGTTGCATGAAGGAGATGAAGTTCTA
	MPP5_MutWT_R	TAGAACTTCATCTCCTTCATGCAACAGACCA
V301N	MPP5_V301N_F	CATGAAGGAGATGAAAATCTAGAGATTAATGGC
	MPP5_V301N_R	GCCATTAATCTCTAGATTTTCATCTCCTTCATG
V314N	MPP5_V314N_F	ATTCGGGGGAAAAGATAACAATGAGGTTTTTTGAC
	MPP5_V314N_R	GTCAAAAAACCTCATTGTTATCTTTCCCCCGAAT
L332K	MPP5_L332K_F	ACTTTGACTTTTGTCAAGATTCCCAGTCAACAG
	MPP5_L332K_R	CTGTTGACTGGGAATCTTGACAAAAGTCAAAGT

(grau hinterlegt: Mutationssequenzen)

Tabelle 9: Primer für Hefevektoren zur Klonierung der intrazellulären Domäne von CRB1, CRB2 und CRB3 in den Hefevektor pGADT7 (Clontech, Mountain View, CA, USA).

Vektor	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße	AS-Position
pGADT7-hCRB1	CRB1F_EcoRI	CGGAATTCCTCCAACAAAAGGGCAACTCA	234 bp	1370 – 1406
	CRB1R	TCCAGTGTAATCCCAGTTGC		
pGADT7-hCRB2	CRB2F_EcoRI	TGGAATTCGGAAAAGCGCCGCCAGTCTGA	192 bp	1249 – 1285
	CRB2R_BamHI	CAGGATCCTTGGGTCTCCAGGTAGAAAC		
pGADT7-hCRB3	CRB3F_EcoRI	GGGAATTCGGGAGAAGCGGCAGACGGA	195 bp	84 – 120
	CRB3R_BamHI	GTGGATCCTGCGGTGTACAAGCCAGCAA		

Tabelle 10: Primer für die semi-quantitative RT-PCR

Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße
mPSD95_isoA_RT_F	CCCCTACTCGCCGCCGC	151 bp
mPSD95_isoA_RT_R	CAATCACAGGGGGAGAATTG	
mPSD95_isoB_RT_F	GAGATGTCCCAGAGACCAAGA	97 bp
mPSD95_isoB_RT_R	TGTGCAGCACTGTGAGGAG	
mGusex11F	GACCCGCCTCGCATGTTTCAG	265 bp
mGusex12rev	GCCCTGAACCGTGACCTCC	
MPP5F-EcoRI	CGGAATTCGAAGGACAAGAATAACTGC	1452 bp
Rho1D4-MPP5R	ACTTGGCTGGTCTCTGTTGGATCCCTCAGC	
Flag-MPP5-F	ACGACAAGCTTTCGGCCGCGATAACCATG	1060 bp
MPP5R-BamHI	CGGGATCCACTGTTTCCTTGGCAGGAGG	

Tabelle 11: Primer zur Klonierung der angegebenen Konstrukte.

Konstrukt	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße	AS-Position
pGEX-4T3-hPSD95-L27	hPSD95-L27F_BamHI	GAGGGATCCGAGATGTCCCAGAGACCAAG	268 bp	1 – 97
	hPSD95-L27R_BamHI	CTGGGATCCCAATCACTGGGGGAGAATTG		
pFLAG-CMV-4-hMPP5 mit Stoppcodon	hMPP5F_NotI	GGGCGGCCGCGATAACCATGACAACATC	2054 bp	volle Länge
	MPP5R3stop_BamHI	ATGGGATCCTCACCTCAGCCAAGTGGATGG TA		
pFLAG-CMV-3-hCRB3	hCRB3_C-term-EcoRI_F2	GCGAATTCGCAAATACAGACCACTTC	342 bp	27 – 120
	hCRB3_C-term-BamHI_R	CAGGATCCAGTCTGGGCAGTGTGG		
pCEP4.1-mPsd95-β	mPsd95_L27-F_KpnI	CGAGGTACCAGATGTCCCAGAGACCAAG	2388 bp	volle Länge
	mPsd95-FL-R_NotI	GAAGCGGCCGCGGGCTATTTCAGTCCAGAC CA		
pCEP4.1-bRecoverin	bRecoverin_XhoI-F	TTCTCGAGATCCACCCAGCAGTGTGA	670 bp	volle Länge
	bRecoverin_BamHI-R	GTGGATCCCAGAGTTTCTTTTCCTTCAGTT TCT		

Tabelle 12: Vektoren und zugehörige Primer zur Überprüfung und Sequenzierung von Inserts.

Vektor und Herkunft	Primer	Sequenz (5'-3')
pGEM-T (Promega, Mannheim, Deutschland)	M13F	CGCCAGGGTTTCCAGTCACGAC
	M13R	AGCGGATAACAATTCACACAGGA
pBluescript II KS (Stratagene, La Jolla, CA, USA)		
pGEX-4T (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK)	pGEX-F	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
	pGEX-R	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG
pCEP-4.1 (Invitrogen Carlsbad, California, USA)	pCEP-F	AGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCG
	EBV-R	GTGGTTTGTCCAAACTCATC
pGBKT7 (Clontech, Mountain View, CA, USA)	T7 Sequencing Primer BD	TAATACGACTCACTATAGGGC
	3'DNA-BD Sequencing Primer	TTTTTCGTTTTTAAAACCTAAGAGTC
pGADT7 (Clontech, Mountain View, CA, USA)	T7(AD)	CGATGATGAAGATACCCAC
	3'AD	AGATGGTGCACGATGCACAG
pFLAG-CMV (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)	pFLAG-F	CGTGTACGGTGGGAGGTCTA
	pFLAG-R	TTATTAGGACAAGGCTGGTG
pET-21 (Novagen, San Diego, CA, USA)	pET-21a-F	ATTAATACGACTCACTATAGGGG
	pET-21a-R	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG

Tabelle 13: Primer für die MPP5-V301N *knock-in*-Maus.

Verwendung/Vektor	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße	
pGEM-T-mMPP5-Exon7	mMPP5_Exon7_F	GTTACTTTAGCAATGTGAGG	698 bp	
	mMPP5_Exon7_R	TCAACAGAGATGTGTAGTGGCTATC		
Mutagenese in pGEM-T-mMPP5-Exon7	mMPP5_V301N_F	CACGAAGGAGACGAAAAATCTGGAGATCAACGGC	-	
	mMPP5_V301N_R	GCCGTTGATCTCCAGATTTTCGTCTCCTTCGTG		
pGEM-T-mMPP5-5'	mMPP5-5'_XhoI_F	CTCTCGAGTGGAAAGAGACCTAGTCATGCAG	2365 bp	
	mMPP5-5'_R	TCAACAGAGATGTGTAGTGGCTATC		
pGEM-T-mMPP5-3'	mMPP5-3'_SacI_F	TTGAGCTCGATAGCCACTACACATCTCTGTTGA	4148 bp	
	mMPP5-3'_SacI_R	AAGAGCTCTGGGATAGCAGGGAATCAAA		
Primerpaare zur Typisierung der embryonalen Stammzellen	1	MPP5_5'-Screen-F	GCCTTGTGAATGCTCCAC	2522 bp
		Neo-R	TAGCCGAATAGCCTCTCCAC	
	2	MPP5_5'-Screen-F	GCCTTGTGAATGCTCCAC	2242 bp
		Neop4	GACATTGGGTGAAACATTCC	
	3	MPP5_5'-Screen-F	GCCTTGTGAATGCTCCAC	3234 bp
		neo-R-TIMP	GAAGGCGATAGAAGGCGATG	
	4	Neo-F	CATCGCCTTCTATCGCCTTC	4490 bp
		MPP5_3'-Screen-R	TTCTGGTTCCTTTGGGTGGTG	
	5	Neop3	GACGAGTCTTCTGAGGGGATC	4468 bp
		MPP5_3'-Screen-R	TTCTGGTTCCTTTGGGTGGTG	
	6	neo-F-TIMP	GTGGAGAGGCTATTTCGGCTA	5201 bp
		MPP5_3'-Screen-R	TTCTGGTTCCTTTGGGTGGTG	
Primerpaare zur Genotypisierung der Mäuse	a	MPP5-KI-F	CAGTTGTACTTTAGCAATGTGAGG	480 bp
		MPP5-KI-R	CCAGCACTGTCCAGATAATTTAC	
	b	MPP5-KI-F	CAGTTGTACTTTAGCAATGTGAGG	454 bp
		MPP5-KI-R-Wt	TTGACAAATTCTGTAAGTTAGGC	
	c	MPP5-KI-F	CAGTTGTACTTTAGCAATGTGAGG	419 bp
		Y227N-loxP-F	CTCGAGGAATTCATAACTTCGTAT	
5'-Sonde für Southern Blot	MPP5-5'-Sonde-F Intron4	CTATGGGCTCTGGGAATCAA	314 bp	
	MPP5-5'-Sonde-R Intron4	TATGCCTCTTTTTGCCCTTG		
3'-Sonde für Southern Blot	MPP5-3'-Sonde-F Intron9	ATGTCACAGCGTGGAAGTAC	377 bp	
	MPP5-3'-Sonde-R Intron9	ACTGCCTTCCAAACCCTTTT		

(Primer, die zur Herstellung des *knock-in*-Konstrukts für die MPP5-V301N *knock-in*-Maus, zur Typisierung der embryonalen Stammzellen und zur Genotypisierung der Mäuse verwendet wurden. Außerdem sind die Primer zur Amplifizierung der Sonden für einen Southern Blot angegeben.)

Tabelle 14: Primer für die quantitative *real-time*-PCR.

Gen	Primer	Sequenz (5'-3')	Produktgröße
ATPase	Cf_ATPase-qRT-F	CGATAACATTTTCCGCTTCAC	64 bp
	Cf_ATPase-qRT-R	AGGGATCCTGCCAATAAAG	
α -ENaC	alpha-ENaC-qRT-F	CCCAAGTGAACAGGAAGGAC	65 bp
	alpha-ENaC-qRT-R	GCAGTCCGATTTGTTCTGGT	
β -ENaC	betaENaC-qRT-F2	GACATCCATCGGAGTGCTG	64 bp
	betaENaC-qRT-R2	GGTGCACCTGGCTGTAGGG	
γ -ENaC	gamma-ENaC-qRT-F	GCACGTCCACGCATCTAAG	63 bp
	gamma-ENaC-qRT-R	CAGTGGGATGTGTCATTTGAA	
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α 1	Cf_Na-K-a1_qRT-F	GGAAGGCTGCCAGAGACA	62 bp
	Cf_Na-K-a1_qRT-R	GAGAGTCATTCACGCCATCA	
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase α 3	Cf_Na-K-a3_qRT-F	CCCCAGCAGAAGCTCATTAT	61 bp
	Cf_Na-K-a3_qRT-R	TCACAGCCACGATTGCTC	
Na ⁺ /K ⁺ -ATPase β 1	Cf_Na-K-b1_qRT-F	AAGGAGTTTTTGGGCAGGA	76 bp
	Cf_Na-K-b1_qRT-R	CCAAGCAGCCGTAATAATATCA	

Tabelle 15: Zur Verfügung gestellte Konstrukte.

Konstrukt	AS-Position	Quelle
pGEX-4T-MPP4-L27N	1 – 89	Stöhr <i>et al.</i> , 2005
pGEX-4T-MPP4-L27NC	1 – 152	
pGEX-4T-MPP4-L27C	86 – 152	
pGEX-4T-MUPP1	1 – 129	H. Stöhr, Universität Regensburg
pGBKT7-MPP5-PDZ	204 – 347	
pGEM-bVeli3 #10	volle Länge, zur Umklonierung in pET-21a(+)	A. Karschin, Universität Würzburg
pGW1-CMV-PSD95- α	volle Länge	
pGW1-CMV-PSD95- α -myc	volle Länge	
pGBKT7-lamC		Clontech, Mountain View, CA, USA
pGBKT7-p53		
pGADT7-T-antigen		

2 SPEKTREN

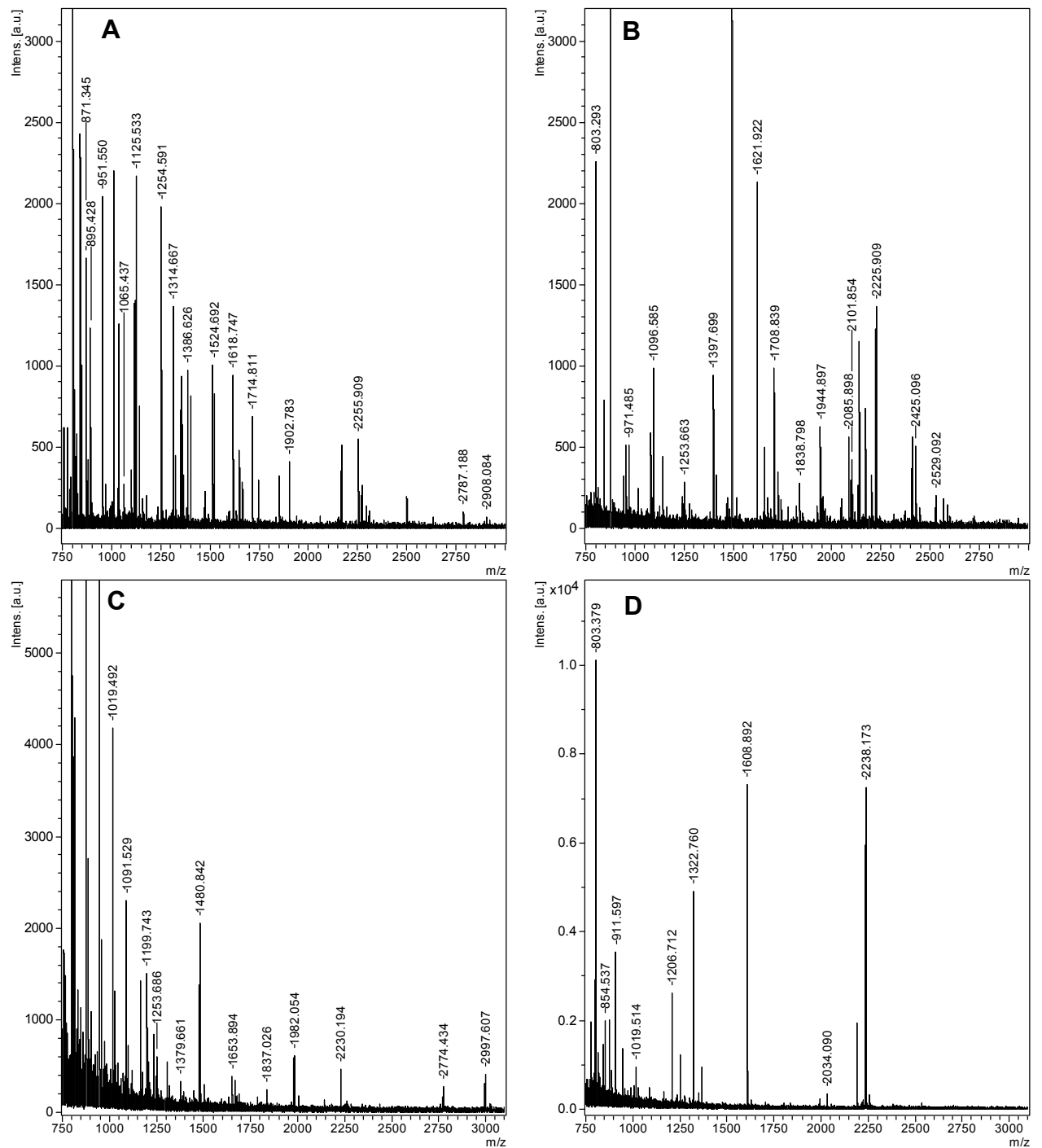


Abbildung 51: Exemplarische MALDI-TOF Massenspektren. Dargestellt sind die Peptidfingerabdrücke des tryptischen Verdau von (A) PSD95 (*spot 1*), (B) MPP4 (*spot 2*), (C) Hsc70 (*spot 5*) und (D) Veli3 (*spot 13a*) (vgl. Abb. 13A und Tab. 6). Die x-Achse repräsentiert den m/z -Wert, auf der y-Achse ist die Intensität der *peaks* in arbiträren Einheiten (engl. *arbitrary units*, a.u.) dargestellt.

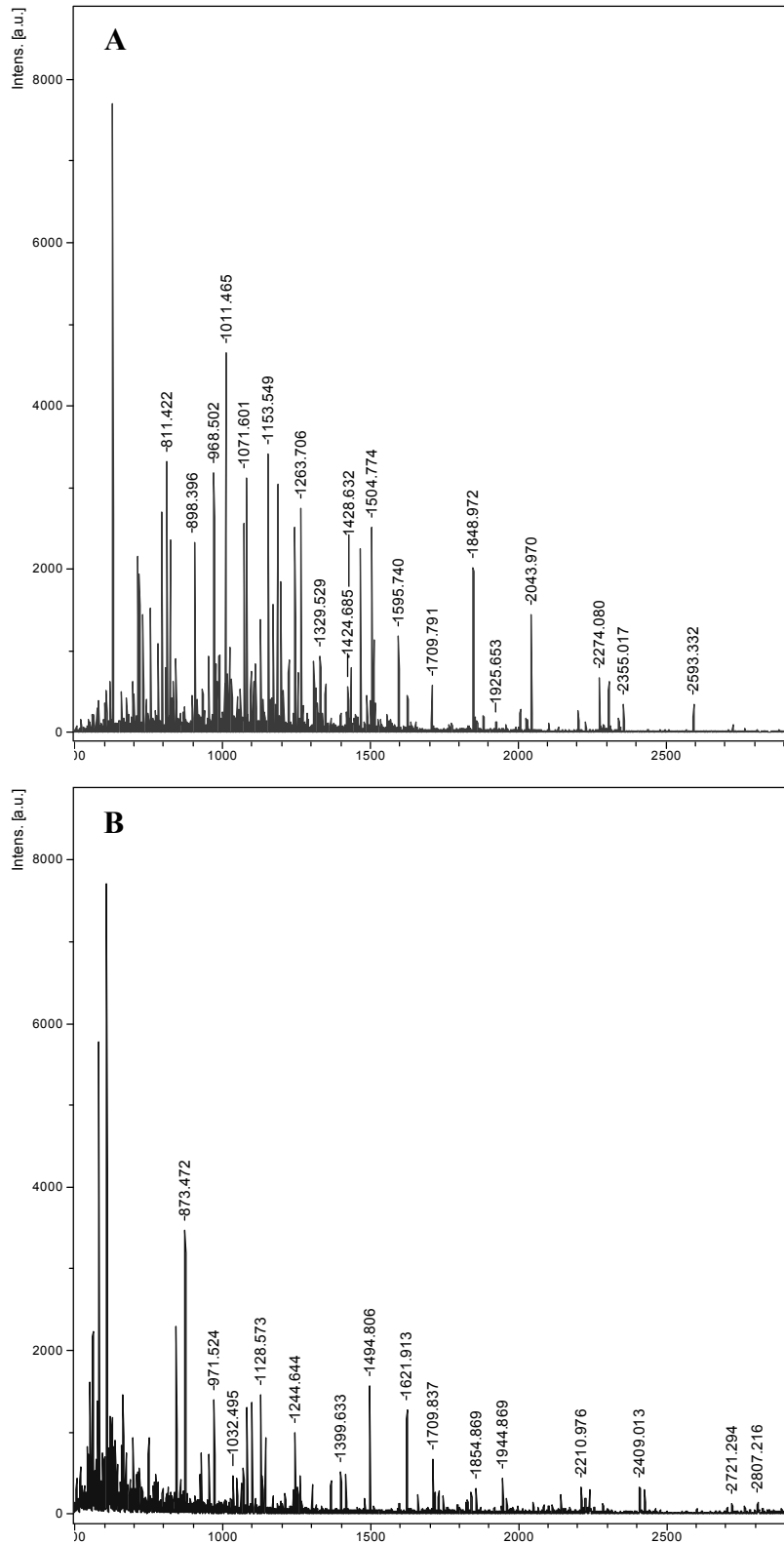


Abbildung 52: Beispiele der MALDI-TOF Massenspektren immunpräzipitierter Proteine aus der Membranfraktion. (A) Tryptischer Verdau der größten Bande und (B) der MPP4-Bande aus Abbildung 25. Die x-Achse repräsentiert den m/z -Wert, auf der y-Achse ist die Intensität der *peaks* in arbiträren Einheiten (engl. *arbitrary units*, a.u.) dargestellt.

X PUBLIKATIONEN

1 1. BEGUTACHTETE VERÖFFENTLICHUNGEN

Förster, J. R., Lochnit, G. und Stöhr, H. (2009): *Proteomic analysis of the membrane palmitoylated protein-4 (MPP4)-associated protein complex in the retina*. Exp Eye Res 88, 39–48.

Müller, S., Förster, J. and Beier D. (2006): *Repeated sequence motifs in the Helicobacter pylori P₁₄₀₈ promoter do not affect its transcription*. Microbiol Res 161(3): 212-21

2 2. KONGRESSBEITRÄGE

Förster, J. R., Lochnit, G., Pich A. und Stöhr, H. *A proteomic approach to identify MPP4-associated proteins in the bovine retina*. Poster Präsentation, Pro Retina Research-Colloquium 2006

Förster, J. R., Lochnit, G., Pich A. und Stöhr, H. *A proteomic approach to identify MPP4-associated proteins in the retina*. Poster Präsentation, GfH-Kongress 2006

Förster, J. R., Garms B, Stöhr, H. *The MAGUK scaffolding proteins in the mammalian retina*. Vortrag, Pro Retina Research-Colloquium 2005

XI LEBENSLAUF

Johanna Rosalie Förster
geb. 05.04.1977 in Würzburg
ledig, keine Kinder

Beruflicher Werdegang

- 04/09 – 07/09 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik,
Universität Regensburg
- 08/08 – 03/09 Anfertigung der Dissertation
- 12/08 – 01/09 WHK am Institut für Humangenetik, Universität Regensburg
- 05/04 – 07/08 Tätigkeit als Doktorandin am Institut für Humangenetik,
Arbeitsgruppe PD Dr. Heidi Stöhr
01/06 – 07/08 Universität Regensburg
05/04 – 12/05 Universität Würzburg
Thema: „Identifizierung und Analyse von Proteininteraktionen bei zwei
Mitgliedern der MAGUK-p55-Subfamilie, MPP4 und MPP5“
07/05 – 06/08 Förderung der Promotion durch ein Stipendium der Pro
Retina Deutschland e.V. (Selbsthilfevereinigung für Menschen mit
Netzhautdegenerationen)
- 08/03 – 04/04 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Humangenetik, Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
- 05/02 – 04/03 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Mikrobiologie, Julius-
Maximilians-Universität Würzburg
Thema: „Untersuchung der Zielgene des Zwei-Komponenten-Systems
0165/0166 von *Helicobacter pylori*“

Schulbildung und Studium

- 10/96 – 04/02 Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Biochemie und Tierphysiologie
Abschluss als Diplom-Biologin (Gesamtnote sehr gut)
Thema der Diplomarbeit: „Untersuchungen zur regulatorischen Funktion
von DNA-Wiederholungssequenzen in codierenden Bereichen des
Genoms von *Helicobacter pylori*“
- 09/87 – 06/96 Matthias-Grünwald-Gymnasium Würzburg
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,9)
- 09/83 – 07/87 Grundschule Johannes-Kepler-Schule Würzburg

Danke...

Bei Frau PD Dr. Heidi Stöhr möchte ich mich als allererstes für die Überlassung des Themas, die Betreuung und Unterstützung in den letzten Jahren, sowie die Korrektur dieser Arbeit bedanken. Ich fühle mich geehrt, ihr erstes „Doktorkind“ zu sein.

Für die Übernahme der Zweitkorrektur möchte ich Herrn Prof. Dr. Georg Krohne danken.

Herrn Prof. Dr. Bernhard Weber danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sowie aller Materialien.

Ohne die Finanzierung mit einem Stipendium der Pro Retina Deutschland e.V. wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank!

Bei Herrn PD Dr. Günter Lochnit und seinen Kollegen in Gießen bedanke ich mich für die Anfertigung und massenspektrometrische Auswertung der 2D-Gele, die einen entscheidenden Teil zu dieser Arbeit beigetragen haben. Für die Generierung der *knock-in*-Maus bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Abteilung Entwicklungsgenetik des Max-Planck-Instituts für Molekulare Genetik in Berlin und der Firma PolyGene in der Schweiz.

Allen Mitarbeitern, sowohl den bereits ausgeschiedenen als auch den aktuellen, möchte ich für jegliche Form der Unterstützung ganz herzlich danken. Dank euch war es eine Freude, täglich ins Labor zu kommen.

In jeder Phase dieser Arbeit gab es Menschen, die mir ganz besonders zur Seite standen, beruflich wie privat. Deswegen möchte ich mich bei Susanne Fröhlich für ihren unerschütterlichen Optimismus und ihre Aufbau-Arbeiten bedanken. Bianca Garms danke ich für den Spaß, den wir vor allem außerhalb des Labors hatten.

Ein großer Dank gilt Kristina Schild, die mich seit dem ersten Semester begleitet und immer ein offenes Ohr für mich hatte, auch aus der Ferne. Danke auch für die Überprüfung der Summary. Und vielen Dank an Julia Hoellenriegel. Ich hätte mir keine bessere *bench*-Nachbarin und vor allem Freundin in Regensburg wünschen können.

Ein besonders herzlicher Dank geht an Andreas Janßen, der mich ins Boot geholt hat und auch in stürmischen Zeiten an meiner Seite war. Danke für die schöne Zeit, die wir hatten, ich werde immer gerne daran zurück denken.

Zuletzt danke ich Lars Fritsche dafür, dass er damals den Weg in diese Arbeitsgruppe und somit zu mir gefunden hat. Von ganzem Herzen danke ich ihm für seine unendliche Geduld mit mir und seine Unterstützung in Allem. Er weiß selbst am besten, wie viel er zu dieser Arbeit beigetragen hat.