

Identifikation und Charakterisierung molekularer
Komponenten des Verbindungsciliums der
Photorezeptoren von Vertebraten

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"D o k t o r d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n"

am Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

von
Angelika Schmitt
geboren in Karlsruhe

Mainz 2000

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2001

”Zurück ins Land wo Milch und Honig fließen”

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut für Zell- und Neurobiologie der Universität Karlsruhe begonnen, und am Zoologischen Institut der Universität Mainz Abt. I fertiggestellt. In der Arbeit enthaltene Abbildungen sind zum Teil in Englisch gehalten, da die Ergebnisse auf Kongressen vorgestellt, und für Originalarbeiten verwendet wurden. Das Zitieren und Erstellen des Literaturverzeichnisses wurde entsprechend der Vorgaben des Springer Verlagshauses durchgeführt.

Die Arbeiten zu der vorliegenden Schrift wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) in Form einer Sachbeihilfe im Rahmen des Schwerpunktsprogramms "Molekulare Sinnesphysiologie" (Wo 548/3-1 bis 3-4), und durch die FAUN-Stiftung Nürnberg gefördert.

Veröffentlichungen und Kongreßbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden auf Kongressen vorgestellt und wurden als Originalarbeiten an folgenden Stellen veröffentlicht, oder sind in Vorbereitung:

Artikel:

- Wolfrum U, Liu XR, Schmitt A, Udovichenko IP, Williams DS (1998). Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **40**, 261-271.
- Wolfrum U und Schmitt A (1998). Rhodopsin transport through the photoreceptor cilium: Myosin VIIa, the product of the Usher 1B gene is involved. In: Hollyfield JG, Anderson G, LaVail M (Eds.) VII International Symposium on retinal degeneration. Plenum Press, pp 3-14.
- Wolfrum U und Schmitt A (1999). Evidence for myosin VIIa driven rhodopsin transport in the plasma membrane of the photoreceptor connecting cilium. In: Hollyfield JG, Andersson RE, LaVail M (Eds.), *Retinal degeneration diseases and experimental therapy*. Plenum Press, New York, pp 3-14.
- Wolfrum U und Schmitt A (2000). Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil. Cyto.*, **46**, 95-107.
- Wolfrum U, Schmitt A, Paulsen R (2001). Centrin, a novel calcium binding protein, is expressed in outer hair cells of mammalian inner ear (in Vorbereitung).
- Wolfrum U und Schmitt A (2001). Expression of centrin in the olfactory epithelium. (in Vorbereitung).
- Schmitt A und Wolfrum U (2001). Molecular dissection of the photoreceptor cilium. (in Vorbereitung).
- Schmitt A und Wolfrum U (2001). Identification and isolation of a novel actin-binding protein in photoreceptor cells. (vorläufiger Titel, in Vorbereitung).

Kongreßbeiträge:

- Schmitt A, Vansant G, Williams DS, Paulsen R, Wolfrum U (1997). Partial co-localization of centrin and myosin VIIa in sensory cells affected by Usher syndrome. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **38**, 1165.
- Schmitt A, Williams DS, Paulsen R, Wolfrum U (1997). Novel ciliary proteins in the sensory cells of mammalian retina, cochlea, and olfactory epithelium. *Verh. Dtsch. Zool. Ges.*, **90**, 382.
- Wolfrum U, Schmitt A, Williams DS, Paulsen R (1997). Are centrin and myosin VIIa, the Usher gene product, co-localized in photoreceptors, olfactory cells, and hair cells? In: Elsner N, Wässle H (Eds.) *Proc. of the 25th Göttingen Neurobiology Conference*. Thieme, Stuttgart, 523.
- Schmitt A, Paulsen R, Wolfrum U (1998). Isolation of genes encoding for ciliary proteins of mammalian photoreceptors by immuno screening. In: Elsner N, Wehner R (Eds.) *Göttinger Neurobiology Report II*. Thieme, Stuttgart, 439.
- Schmitt A, Paulsen R, Wolfrum U (1998). Strategy for the isolation of novel genes encoding for ciliary components of photoreceptors. *Europ. J. Cell Biol. [Supplement]*, **75**, 84.
- Wolfrum U und Schmitt A (1998). Evidence for myosin VIIa driven rhodopsin transport through the photoreceptor cilium. In: Baehr W, Spekreijse H, Zrenner E (Eds.) *Retinal development, degeneration and functional restitution*. Elsevier, Oxford, pp 34.

-
- Wolfrum U und Schmitt A (1998). Myosin VIIa, the product of an Usher gene drives rhodopsin transport through the photoreceptor cilium. *Europ. J. Cell Biol. [Supplement]*, **75**,180.
- Wolfrum U und Schmitt A (1998). Rhodopsin transport in the membrane of photoreceptor cilia - Myosin VIIa, the product of an Usher gene is involved. In: Elsner N, Wehner R (Eds.) *Göttinger Neurobiology Report II*. Thieme, Stuttgart, 440.
- Wolfrum U und Schmitt A (1998) Rhodopsin transport in the membrane of the photoreceptor cilium and the role of myosin VIIa, the Usher syndrome 1B gene product. *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.*, **39**, S678.
- Schmitt A, Bode C, Chuang JZ, Sung CH, Wolfrum U (1999). Intracellular transport of rhodopsin in vertebrate photoreceptors. *Zoology (Suppl.II)* **102**, 45.
- Grumann A, Schmitt A, Wolfrum U, Klumpp S (2000). Protein phosphatase type-1 associated with the ciliary axoneme of mammalian photoreceptor cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **Suppl. 50, Vol 79**, 36.
- Schmitt A und Wolfrum U (2000). Molecular dissection of the photoreceptor cilium. *Eur. J. Cell Biol.*, **Suppl. 50, Vol 79**, 36.
- Wolfrum U, Schmitt A, Wottrich R, Nagel K, Huntley BK, Kubicki K (2000). Molecular characterisation of the centrin cytoskeleton in sensory cells. *Eur. J. Biol.*, **Suppl. 50, Vol. 79**, 36.
- Wolfrum U, Bode C, Tai A, Sung CH, Schmitt A (2000). Rhodopsin transport in mammalian photoreceptor cells. *Eur. J.Biol.*, **Suppl. 59, Vol. 79**, 44.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. U. Wolfrum für die Vergabe des Themas und der Betreuung dieser Arbeit danken. Herrn Prof. Dr. R. Paulsen möchte ich für die Betreuung meiner Arbeit in Karlsruhe vom Mai 1997 bis April 1999 und für das freundschaftliche Klima in seinem Labor danken. Bei Prof. Dr. A. Dorresteyn bedanke ich mich für seine Hilfe in meiner Anfangszeit in Mainz, für die Hilfe bei Niederschrift dieser Arbeit, und die Übernahme des Koreferats. Zudem möchte ich allen Mitarbeitern und Doktoranden in Karlsruhe für die Zusammenarbeit und gegenseitige Hilfe danken, die oftmals noch bis Mainz reichte.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Zoologischen Instituts Abt. I in Mainz für ihre Hilfe beim Aufbau des Labors, so daß ich meine Arbeit fortsetzen konnte. Bei C. Kubicki bedanke ich mich für ihre Unterstützung und Hilfe beim Aufbau und Zusammenhalt des Labor als "gute Seele". Bei E. Sehn bedanke ich mich für ihre Hilfe und Betreuung am Elektronenmikroskop und ihre Unterstützung bei elektronenmikroskopischen Fragestellungen, und bei K. Lotz bedanke ich mich für ihre Hilfe und Unterstützung bei immunohistochemischen Experimenten. Bei C. Kelke bedanke ich mich für ihre Hilfe bei der Laborarbeit während der Zeit in Karlsruhe.

Bei C. Bode, A. Giesl und R. Schäfer bedanke ich mich für das freundschaftliche Klima im Labor. Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, so auch bei Dr. Latz und Frau Clermont-Wocker für deren Hilfsbereitschaft. Bei B. Huntley bedanke ich mich für die gast-freundliche Aufnahme während meiner Zeit in Rochester MN, während meines Laboraufenthaltes bei J.L. Salisbury, und bei J.L. Salisbury für die Möglichkeit, einige Wochen in seinem Labor zu arbeiten und erste Erfahrungen im Ausland zu sammeln.

Dankbar erwähnt sei auch die finanzielle Unterstützung meiner Dissertation durch die DFG im Rahmen des Schwerpunktprojektes "Molekulare Sinnesphysiologie" und die Faun Stiftung Nürnberg.

Abbildungsverzeichnis

Abb.	Titel	Seite
1	Aufbau der Retina von Vertebraten	2
2	Stäbchen- und Zapfen Photorezeptorzellen	3
3	Schematische Darstellung des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle	5
4	Schematische Darstellung der Aufreinigung von Photorezeptoren aus isolierten Rinderretinae in einem Flußdiagramm	19
5	Isolierung der Cilienapparate	20
6	λ -Zap cDNA-Banken	35
7	Biochemisch-molekularbiologische Strategie zur Isolierung von Klonen, deren cDNA-Insert für Proteinkomponenten des Verbindungsciliums kodieren	52
8	Zunahme der Reinheit der Proben 1-4 während der Photorezeptorzell-Aufreinigung	54
9	Graphische Darstellung der Proteinkonzentrationen in den Fraktionen 1 bis 20 der Aufreinigung Nr. 4	55
10	Western Blot Analyse zur Identifikation der Cilienapparate mit dem molekularen Markerprotein Centrin	56
11	Western Blot Analyse mit einem Antikörper acetyliertes α -Tubulin	57
12	Immunofluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Centrin	58
13	Primäre Charakterisierung der Proteinzusammensetzung isolierter Cilienapparate	59
14	SDS-PAGE isolierter Photorezeptorzellen und Cilienapparate	60
15	Analyse des Immunisierungsverlaufs bei Herstellung des polyklonalen AX4-Antiserums	61
16	Reaktivität des AX4-Antiserums mit molekularen Proteinkomponenten der Cilienapparate	62
17	Doppel-Immunofluoreszenz von AX4 und Centrin in der Rattenretina	63
18	Filterabzüge des Immunoscreens der zweiten Einzelplaqueisolierung	64
19	Bestimmung der Insertgröße von isolierten cDNA-Klonen	65
20	Schematische Darstellung der Analyse der cDNA-Klone	66
21	Isolierte Klone, die für bereits bekannte Proteine kodieren	70
22	Auswahl von isolierten Klonen mit Homologien zu Genen, die potentiell für Protein-Komponenten des Verbindungsciliums kodieren	72
23	Nukleinsäuresequenz von Ratten <i>EB2</i> im Vergleich zu Maus <i>EB2</i>	74
24	Schematische Darstellung des kodierenden Bereichs von Rn <i>EB2</i> vergleichend zu Mm <i>EB2</i>	75
25	ClustalW-Homologievergleich bekannter Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie	76
26	Darstellung der Verwandtschaft der einzelnen Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie als Kladogramm auf der Basis eines ClustalW-Homologievergleichs.	77
27	Potentielle Proteinmotive von Rn <i>EB2p</i> und Mm <i>EB2p</i>	77
28	Sekundärstrukturanalyse von Rn <i>EB2p</i> mit der GGBSM-Methode	78
29	Kontur-Plot der Wahrscheinlichkeit bestimmter Sekundärstrukturen von Rn <i>EB2p</i>	78
30	Lokalisation von <i>EB1/EB2</i> in der Retina einer Ratte	80
31	Proteindomänen von Human <i>Flightless</i>	81
32	Klon AS128	81
33	Nukleotidsequenz von Klon AS128	82
34	Analyse der Expression von <i>Flightless</i> durch Northern Blot Analysen	84
35	Isolierte <i>Flightless</i> -Klone	85
36	Graphische Darstellung der vollständigen Mm <i>Flightless</i> Sequenz	86
37	Nukleinsäuresequenz von Maus <i>Flightless</i>	87-89

38	Aminosäuresequenz von Maus Flightless (Mm Flip)	90
39	Hydrophathieprofil der Aminosäurereste 1-500 von Maus Flightless	93
40	Potentielle Proteinmotive von Mm Flip	94
41	Potentielle Sekundärstruktur von Mm Flip	96
42	Kontur-Plot und XY-Plot der Wahrscheinlichkeit bestimmter Sekundärstrukturen in Mm Flip aa 1-350	97
43	Potentielle Sekundärstruktur der Segmente 2 und 3 von Flightless im Vergleich zu Gelsolin	98-99
44	Homologievergleich der LRR-Domänen von Mm Flip, Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip	102
45	Lage und Aminosäuresequenzen der einzelnen Proteindomänen bei Mm Flip	103
46	Phylogramm der verwandtschaftlichen Beziehungen der Flightless-Subfamilie zur Gelsolin/Villin-Familie	105
47	Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen als berechnetes Phylogramm	106
48	Phylogramm der verwandtschaftlichen Beziehungen der Flightless-Familie in Bezug zu ausgewählten Vertretern der LRR-Protein Superfamilie	108
49	Expressionsprodukte der Klone 4.6.4 und 2.3.2	109
50	Nukleinsäuresequenz von Klon 4.6.4. mit korrespondierender Aminosäuresequenz	110
51	Analyse der Spezifität der Anti-Flightless Antikörper	111
52	Expression von Flightless in der Retina	112
53	Expression von Flightless in unterschiedlichen Geweben	113
54	Nachweis von Flightless in sensorischen Geweben	114
55	Lokalisation von Flightless im Skelettmuskel	115
56	Immunolokalisation von Flightless und Centrin in der Retina der Maus	116
57	Kolokalisation von Flightless und Centrin im Verbindungscilium und Basalkörper des Cilienapparates von Photorezeptorzellen	117
58	Immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation von Flightless in Photorezeptorzellen	119
59	Histogramm der Anzahl von silberverstärkten Goldpartikeln in unterschiedlichen subciliären Domänen von Querschnittes durch das Verbindungscilium von Photorezeptorzellen der Maus nach immuno-elektronenmikroskopischer Markierung mit Antikörpern gegen Flightless.	120
60	Immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation von Flightless im apikalen Bereich des Innensegments einer Photorezeptorzelle der Maus	120
61	Immuno-elektronenoptische Lokalisation von Aktin im Verbindungscilium einer Photorezeptorzelle	121
62	Histogramm der Anzahl silberverstärkter Goldpartikel nach immuno-elektronenmikroskopischen Markierungen mit Antikörpern gegen Aktin in verschiedenen Domänen des Verbindungsciliums	122
63	Schematische Darstellung des Aufbaus des Riechepithels	122
64	Indirekte Immunofluoreszenz-Markierung von Centrin und Flightless im olfaktorischen Epithel der Ratte	123
65	Indirekte Immunofluoreszenzmarkierung von Centrin und Flightless im Flimmerepithel der Nase	124
66	Immunolokalisation von Centrin und Flightless in den Haarzellen der Cochlea	125
67	Western Blot Analyse der Proben der Membranpräparation	127
68	Segmentstruktur und Homologien der Flightless-Proteine	136
69	Funktionen der Flightless-Proteine	137
70	Konservierungsgrad der Aktin-Bindungs-Helix und der Aminosäurereste verantwortlich für Calciumbindung	140
71	Kosensusequenz der LRR-Repeats des RI im Vergleich zum 23 Aminosäure-Repeat von Flightless	147

72	Möglichkeiten der Membran-Assoziation von Flightless	149
73	Transportprozesse im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen	155

Tabellenverzeichnis

Tab.	Titel	Seite
1	Verwendete Sequenzierungs-Primer	14
2	Verwendete Bakterienstämme und Vektoren	14
3	Liste der verwendeten primären Antikörper und Antiseren	15
4	Sekundäre Antikörper, die zum Nachweis der primären Antikörper verwendet wurden	16
5	Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele berechnet für ein Gel	23
6	Verwendete <i>E. coli</i> -Bakterien und geeignete Selektionsmedien	33
7	Klonierungsvektoren und Helferphagen	33
8	Internetadressen zur DNA- und Proteinanalytik	43
9	cDNA-Klone, isoliert im Immunoscreen einer retinalen Expressions-cDNA-Bank mit dem Anti-Axonema Antiserum AX4	67-68
10	Analyse der prozentualen Anteile der isolierten Klone in der retinalen Expressions cDNA-Bank der Ratte	70
11	Identitäten der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie	75
12	Homologievergleich der verschiedenen Flightless cDNA- und Proteinsequenzen	91
13	Physiochemischen Eigenschaften von Flightless bei der Maus, dem Menschen <i>Drosophila</i> und <i>C. elegans</i>	92

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Strukturelemente des Cilienapparates von Photorezeptorzellen.....	4
1.2 Molekulare Proteinkomponenten des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen.....	5
1.3 Funktionen des Verbindungsciliums einer Photorezeptorzelle.....	6
1.5 Problemstellung.....	8
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	10
2.1.2 Lösungen und Puffer.....	10
2.1.3 Medien für Bakterien-Zellkultur.....	12
2.1.4 Geräte.....	13
2.1.5 Plastikwaren.....	14
2.1.6 Oligonukleotide für Sequenzierung.....	14
2.1.7 Bakterienstämme und Vektoren.....	14
2.1.8 Versuchstiere.....	14
2.1.9 Antikörper.....	15
2.1.10 cDNA-Banken.....	16
2.1.11 Soft- und Hardware.....	16
2.2 Methoden.....	17
2.2.1 Präparative Methoden.....	17
2.2.1.1 Präparation der Organe und Gewebe	17
2.2.1.2 Isolierung von Rinderretinae	17
2.2.1.3 Aufreinigung der Photorezeptorzellen	18
2.2.1.4 Isolierung der Cilienapparate	19
2.2.1.5 Präparation von Photorezeptormembranen isolierter Außensegmente	20
2.2.2 Biochemische Methoden.....	22
2.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten	22
2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung	22
2.2.2.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	22
2.2.2.4 Western-Blot Analyse	23
2.2.2.5 Färbungen	24
2.2.2.5.1 Coomassiefärbung für SDS-PAGE	24
2.2.2.5.2 Färbung von PVDF-Membranen	24
2.2.2.6 Immunisierung von Kaninchen	25
2.2.2.7 Aufreinigung von Antiseren	25
2.2.2.7.1 Aufreinigung von Antiserums an Protein A Agarose	25
2.2.2.7.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern	26
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.3.1 Fällung von Nukleinsäuren	26
2.2.3.2 Entfernung von Proteinresten aus Nukleinsäure-Lösungen	27
2.2.3.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen	27
2.2.3.4 Auftrennung der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.3.5 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.3.6 Plasmid-DNA Präparation durch alkalischer Lyse	28
2.2.3.7 Isolierung von Gesamt RNA	29
2.2.3.8 Isolierung von mRNA	29
2.2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	30
2.2.3.9.1 Glasmilchelution	30
2.2.3.9.2 Gelelution mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit"	30
2.2.3.10 Dephosphorylierung von DNA	31
2.2.3.11 Modifikation von kohäsiven Enden von DNA-Fragmenten	31
2.2.3.12 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen	32

2.2.3.13 Kultivieren von <i>E. coli</i> Bakterien	32
2.2.3.14 Präparation und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> XL1 blue MRF ₁ und BL21	33
2.2.3.15 Ligation von DNA-Fragmenten	34
2.2.3.16 Durchmusterung von cDNA-Banken	34
2.2.3.16.1 Immunoscreening	36
2.2.3.16.2 Screen mit einer DIG-markierten DNA-Sonde	37
2.2.3.17 In vivo Ausschleußung von cDNA Klonen	39
2.2.3.18 Sequenzierung von isolierten Klone	39
2.2.3.18.1 Manuelle Sequenzierung mit dem "Thermosequense cycle Sequencing Kit"	40
2.2.3.18.2 Automatische Sequenzierung	41
2.2.3.19 Sequenzanalysen	42
2.2.3.20 Dot-Blot Analyse	43
2.2.3.21 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA Sonde	43
2.2.3.22 Northern Blot Analyse	44
2.2.3.23 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> BL21	45
2.2.4 Lichtmikroskopie.....	47
2.2.4.1 Fixierung der Gewebe	47
2.2.4.2 Einbettung und Schneiden der Präparate	47
2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	47
2.2.5 Ultrastrukturelle Lokalisation von Proteinen.....	48
2.2.5.1 Fixierung	48
2.2.5.2 Einbettung der Präparate in LR-White	49
2.2.5.3 Immunogoldmarkierung	49
2.2.5.4 Silberverstärkung nach Danscher (1981)	49
2.2.5.5 Schnittkontrastierung	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Präparation der Cilienapparate.....	52
3.1.1 Aufreinigung der Photorezeptorzellen und Isolierung der Cilienapparate.....	52
3.1.2 Identifikation der Cilienapparate.....	55
3.1.3 Western Blot Analyse von isolierten Cilienapparaten mit Antiseren gegen Cytoskelettproteine und photorezeptorspezifische Proteine.....	58
3.1.4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.....	60
3.2 Herstellung und Charakterisierung des AX4-Antiserums.....	61
3.3 Immunoscreen und primäre Analyse der isolierten Klone.....	63
3.3.1 Durchmusterung der retinalen cDNA-Bank mit dem AX4-Antiserum und partielle Sequenzierung der isolierten Klone.....	63
3.3.2 Analyse der isolierten Klone.....	69
3.4 Charakterisierung ausgewählter Klone.....	73
3.4.1 APC-Bindeprotein Rn EB2.....	73
3.4.1.1 Klon AS118 kodiert für Rn EB2	73
3.4.1.2 Klonierung der kodierenden Sequenz von Rn EB2	73
3.4.1.3 Sequenzanalyse von Rn EB2	75
3.4.1.4 Lokalisation von Rn EB2 in der Retina	79
3.4.1.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	80
3.4.2 Klon AS128 kodiert für Rn Flightless.....	80
3.4.2.1 Isolierung und Sequenzierung von Ratten und Maus Flightless	81
3.4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz von Maus Flightless	91
3.4.2.2.1 Analyse der Primärstruktur von Maus Flightless	91
3.4.2.2.2 Sekundärstrukturanalyse von Maus Flightless	94
3.4.2.2.3 Proteindomänen von Maus Flightless	99
3.4.2.2.4 Phylogenetische Analyse von Maus Flightless	104
3.4.2.2.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse	107
3.4.2.3 Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen Flightless	109
3.4.2.3.1 Generierung eines Antiserums gegen Flightless	109
3.4.2.3.2 Spezifität des Anti-Flightless Antiserums	111

3.4.2.4 <i>Western Blot Analyse: Expression von Flightless in sensorischen und nicht-sensorischen Geweben</i>	112
3.4.2.5 <i>Lokalisation von Flightless im Gewebe durch immunhistochemische Methoden</i>	114
3.4.2.6 <i>Immunologische Lokalisation von Flightless im Skelettmuskel</i>	115
3.4.2.7 <i>Lokalisation von Flightless in sensorischen Geweben</i>	116
3.4.2.6.1 <i>Lokalisation von Flightless in der Retina</i>	116
3.4.2.6.2 <i>Lokalisation von Flightless im Riechepithel und Innenohr</i>	122
3.4.2.8 <i>Liegt Flightless Membran-assoziiert vor?</i>	125
4 Diskussion	128
4.1 Welche Vorteile birgt die angewandte biochemisch-molekularbiologische Strategie, und welche limitierenden Faktoren mußten berücksichtigt werden?.....	128
4.2 Welche Funktion hat Rn EB2 als Proteinkomponente des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen?.....	133
4.3 Funktionen des Aktin-Bindungsprotein Flightless in Photorezeptorzellen.....	136
5 Schlußbetrachtung und Ausblick	152
6 Zusammenfassung	155
7 Literaturverzeichnis	157
8 Anhang	171
8.1 Abkürzungsverzeichnis	171
8.2 Liste von EST's, die bei verschiedenen Organisationen bezogen wurden	173
8.3 Genbank-Acession-Nummern der LRR-Domain-Proteine	173
8.4 Genbank-Acession-Nummern der Vertreter der Gelsolin/Villin-Familie	174
8.5 Liste der Proteinmotive von Mm Flip mit Angabe der Position und Sequenz	175
8.6 Proteindomänen von Mm Flip	178
9 Lebenslauf	179

1 Einleitung

Bei der Auseinandersetzung von tierischen Organismen mit ihrer Umwelt sind sensorische Informationen von essentieller Bedeutung. Aus einer Vielzahl von Umweltinformationen werden durch Sinnesorgane spezifisch Reize aufgenommen und ausgewertet. In den Sinnesorganen sind hochspezialisierte Sinneszellen mit anderen Zelltypen zu komplexen funktionellen Einheiten zusammengefaßt. Die Sinneszellen wandeln die Energie der unterschiedlichen Eingangsreize aus der Umwelt in spezialisierten Membranarealen in elektrische Potentialänderungen um (Signaltransduktion), die vom Nervensystem weitergeleitet und prozessiert werden. Die Sinneszelle dient dabei als Energiewandler und Verstärker, da die Rezeptorantwort die eingehende Reizenergie immer um ein Vielfaches übertrifft. Die Rezeptorzellen sind modalitätsspezifisch, d. h. sie sind auf die Aufnahme eines adäquaten Reizes ausgerichtet. Nach der Reizmodalität werden die Rezeptorzellen in Mechanorezeptoren, Chemorezeptoren, Photorezeptoren etc. klassifiziert. Bei Vertebraten sind, trotz der funktionellen Diversität der Sinneszellen, die reizaufnehmenden und signal-wandelnden Bereiche in der Regel auf zwei membran-assoziierte cytologische Grundstrukturen zurückzuführen: Es handelt sich um modifizierte Mikrovilli, die auf einem Cytoskelett aus Aktinfilamenten beruhen (Stereovilli der Haarzellen des Innenohrs), oder um modifizierte Cilien mit einem charakteristischen Mikrotubuli-Cytoskelett (z. B. das Außensegment der Photorezeptorzellen). Den modifizierten Cilien fehlt im Gegensatz zu motilen Cilien häufig das zentrale Mikrotubuli-Paar und assoziierte Strukturen wie die Radialspeichen und die Dynein-Arme (Röhlich, 1975; Besharse und Horst, 1990; Witman, 1990; Usukura und Obata, 1995). Die Sinneszellen des Riechepithels und der Retina werden aufgrund ihres ciliären Cytoskeletts auch als ciliäre Sinneszellen bezeichnet.

Die Retina als funktionell wichtigster Teil des Auges ist aus folgenden Schichten aufgebaut: Die Außenglieder und Teile der Innenglieder der Photorezeptorzellen bilden die äußerste Schicht aus (Photorezeptorzellschicht, Abb. 1). Die Rezeptorzellen ragen mit den apikalen Abschnitten ihrer Außensegmente in die Ausläufer des einschichtigen retinalen Pigmentepithels (RPE). Die Außensegmente der Photorezeptorzellen sind hochspezialisiert, dort erfolgt die Aufnahme des Lichtreizes und Umwandlung in ein elektrisches Signal (Transduktion). Darauf folgt die äußere Körnerschicht (engl. „outer nuclear layer“) aus Zellkörpern mit den Zellkernen der Photorezeptorzellen (Myoid). In der äußeren plexiformen Schicht (engl. „outer plexiform layer“) befinden sich die Synapsen zwischen den Sinneszellen und den II. Neuronen. Durch synaptische Kommunikation wird hier das transduzierte optische Signal auf die nachgeschalteten Bipolarzellen und Horizontalzellen übertragen. Auf die innere Körnerschicht (Perikaryenschicht der II. Neuronen) folgt die innere plexiforme Schicht (Synapsenschicht zwischen II. und III. Neuronen), nachfolgend die Ganglienzellschicht und Nervenfaserschicht, abgeschlossen durch die Gangliengrenzmembran (Abb. 1).

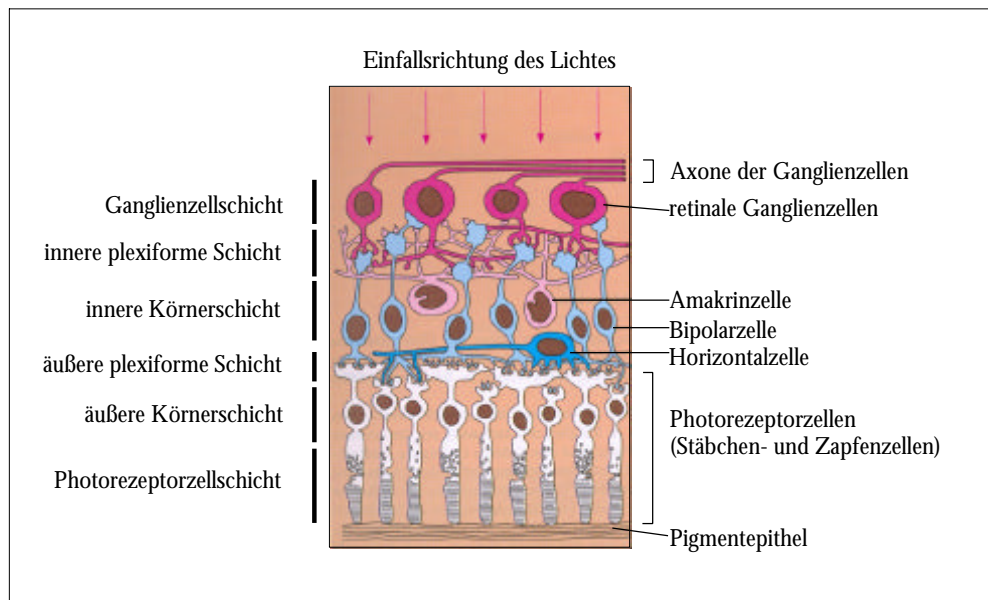


Abb. 1: Aufbau der Retina von Vertebraten (aus Campbell, 1997a)

In der Retina sind zwei funktionell unterschiedliche Typen von ciliären Rezeptorzellen vorhanden: Stäbchenzellen für das Dämmerungssehen und Zapfenzellen, die auf Farbsehen bei hellem Tageslicht spezialisiert sind (Abb. 2). Beide Rezeptorzelltypen sind funktionell und morphologisch in ein lichtsensitives Außensegment und metabolisch aktives Innensegment gegliedert, verbunden durch ein nichtmotiles modifiziertes Cilium. Dieses Cilium kann aufgrund seiner Ultrastruktur mit der Übergangs- oder Transientenzone motiler Cilien homologisiert werden (Matsusaka, 1974; Röhlich, 1975; Besharse und Horst, 1990; Molday, 1998). In den Membranstapeln des Außensegments (engl. „disks“) ist das Photopigment Opsin als integrales Membranprotein und die Komponenten der Signaltransduktionskaskade lokalisiert. Die Membranen der Photorezeptorzell-Außensegmente unterliegen einer ständigen Erneuerung, indem neu synthetisierte Membranen an der Basis des Außengliedes angefügt, und distale Bereiche des Außensegments von den Zellen des RPE phagocytiert werden (Young, 1967; Young und Bok, 1969; Bok, 1985). Die Membranscheiben der Stäbchen-Photorezeptorzellen werden an der Basis des Außensegments nach der Hypothese von Steinberg et al. (1980) durch Evagination, nach Williams et al. (1992) durch Invagination der Membran des Verbindungsciliums ausgebildet, abgeschnürt und sind von der Plasmamembran umgeben. Die Membranen der Außensegmente von Zapfen-Photorezeptorzellen hingegen sind eingefaltet, teilweise nach außen hin geöffnet und bilden ein Kontinuum mit der Photorezeptorzell-Plasmamembran (Abb. 2 C, Eckmiller, 1997). Das Innensegment ist Ort der Synthese und des Abbaus von Zellkomponenten. Hier werden die Proteine des Außensegments *de novo* synthetisiert, und gelangen über bisher nur in Ansätzen bekannte Transportwege zum Ort ihrer Funktion (Fariss et al., 1997; Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000).

Es ist davon auszugehen, daß der intrazelluläre Transport, vom Syntheseort im Innensegment in das Außensegment, unter anderem durch das Verbindungscilium (engl. „connecting cilium“) als einzige direkte cytoplasmatische Verbindung erfolgt. Am Beispiel von Stäbchen-Opisin wurde gezeigt, daß Proteinkomponenten des Verbindungsciliums am Transport des integralen Membranproteins in der Plasmamembran des Ciliums beteiligt sind (Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000).

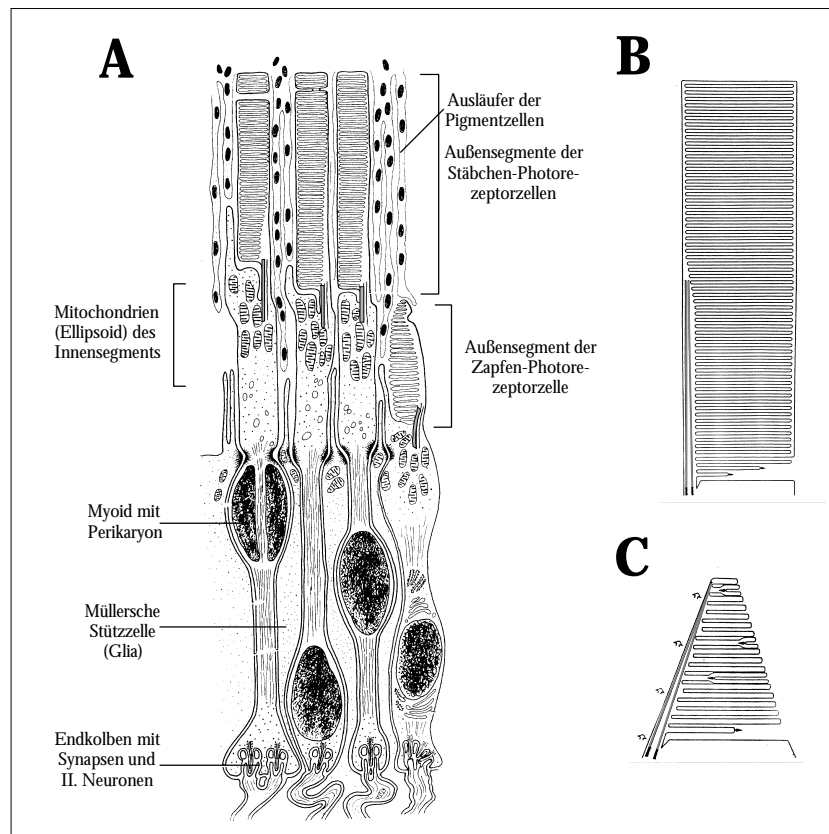


Abb. 2: Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptorzellen

A: Die Retina enthält Stäbchen- und Zapfen-Photorezeptorzellen als sensorische Zellen. **B:** Detail des Außensegments von Stäbchen-Photorezeptorzellen. **C:** Detail des Außensegments einer Zapfen-Photorezeptorzelle. Das Verbindungscilium erstreckt sich weit in das Außensegment der Photorezeptorzelle und wird ebenfalls kontinuierlich erneuert. (A: aus Kolb: Vergleichende Histologie, B und C: aus Eckmiller, 1997).

Das Cytoskelett der ciliären Photorezeptorzellen besteht wie bei jeder eukaryotischen Zelle aus folgenden Filamenttypen: Mikrofilamenten (Aktinfilamente), Mikrotubuli und Intermediärfilamenten. Diese werden durch unkonventionelle fibrilläre Cytoskelettelemente ergänzt, die aufgrund ihres geringen Durchmessers (2-4 nm) auch als Nanofilamente bezeichnet werden (Salisbury et al., 1995, Lyass et al., 1988; Roberts und King, 1991; Roberts und Stewart, 1997). Proteine des Zellskeletts dienen nicht nur der Stabilisierung der Zelle und der Erhaltung der Zellform, sie sind auch an Signaltransduktionsprozessen, Morphogeneseprozessen und intrazellulären Transportvorgängen beteiligt. Diese Funktionen werden nicht nur durch konventionelle Cytoskelettelemente wie Mikrotubuli und Aktinfilamente ausgeübt, sondern auch durch mit diesen Filamenten assoziierte Cytoskelettproteine. Die funktionelle Diversität der vier

Filamenttypen wird damit über eine Vielzahl von akzessorischen Proteinen bewirkt (z. B. Bost-Usinger et al., 1997; Körschen et al., 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000; Marszalek und Goldstein, 2000).

Während die Mechanismen der Signaltransduktion in Sinneszellen seit langem von zahlreichen Arbeitsgruppen intensiv untersucht werden, ist über die molekulare Zusammensetzung des Cytoskeletts der Rezeptorzellen bisher wenig bekannt. Dennoch sollte in den spezialisierten und stoffwechselaktiven Sinneszellen das Cytoskelett unter anderem beim Stofftransport und Stoffaustausch zwischen den verschiedenen Kompartimenten eine wichtige funktionelle Rolle spielen (z. B. Liebman 1987). Zudem weisen pathologische Veränderungen von Strukturkomponenten in Cilien von Patienten mit einer hereditären sensorischen Degenerationserkrankung, dem sogenannten Usher Syndrom (Usher, 1913/14), auf die Bedeutung des Cytoskeletts bei der Aufrechterhaltung der Funktion ciliärer Sinneszellen hin (Hunter et al., 1986; Barrong et al., 1992; Weil et al., 1995; Travis, 1998; Marszalek et al., 2000; Hong et al., 2000; Fariss et al., 2000). Die zunehmende Aufklärung der molekularen Zusammensetzung des ciliären Cytoskeletts einer gesunden Sinneszelle könnte daher auch zu einem besseren Verständnis der Pathomechanismen führen, die zu Degenerationserscheinungen von Sinneszellen führen. Bisher wurden in Photorezeptorzellen, und insbesondere im Verbindungscilium, nur wenige Cytoskelettproteine identifiziert, und deren Lokalisation und Funktion geklärt.

1.1 Strukturelemente des Cilienapparates von Photorezeptorzellen

Das Verbindungscilium als Teil des Cilienapparates war zunächst vorwiegend Gegenstand elektronenmikroskopischer Strukturuntersuchungen, gefolgt von biochemischen Analysen von isolierten Cilienapparaten (Matsusaka 1974; Röhlich, 1975; Matsusaka 1976; Horst et al., 1987; Fleischmann et al., 1980; 1981; Horst et al., 1990; Besharse und Horst, 1990). Anhand dieser Untersuchungen konnte die strukturelle und biochemische Homologie des Verbindungsciliums zur Übergangszone motiler Cilien aufgezeigt werden: Verbindungscilien von Photorezeptorzellen und motile Cilien weisen ein Mikrotubuli-Grundgerüst auf, das ausgehend von einem Basalkörper ausgebildet wird (Tokuyasu und Yamada, 1959; Röhlich, 1975; Greiner et al., 1981; Horst et al., 1990; Besharse und Horst, 1990; Usukura und Obata, 1995). Der Basalkörper liegt apikal im Innensegment der Photorezeptorzelle und wird mit der danebenliegenden Centriole zu einem Basalkörper-Centriolen-Komplex zusammengefaßt. Der Bereich um den Basalkörper dient als Mikrotubuli-Organisationszentrum („MTOC: microtubule organizing centre“) des Innensegments. Zahlreiche Mikrotubuli projizieren von diesem Bereich ausgehend in Richtung des Myoids (Troutt et al., 1990; Horst et al., 1990; Pagh-Roehl et al., 1991; Muresan et al., 1993). Ausgehend vom Verbindungscilium erstrecken sich Mikrotubuli auch in das Außensegment der

Photorezeptorzelle (Horst et al., 1990; Eckmiller und Toman, 1998). Abbildung 3 zeigt in einer Übersicht die einzelnen Strukturelemente des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle.

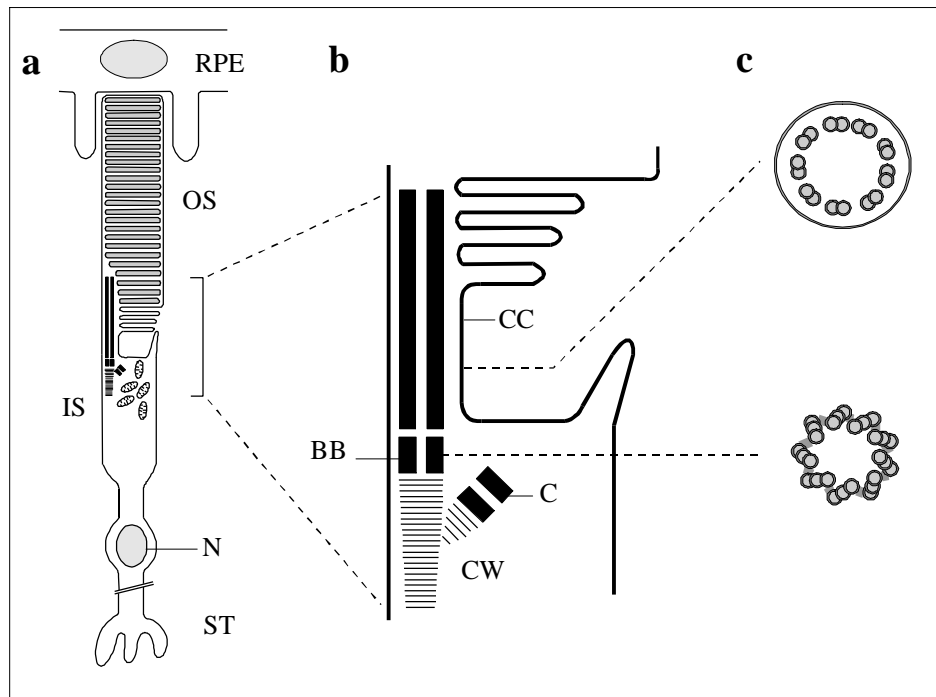


Abb. 3: Schematische Darstellung des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle

a: Schema einer Stäbchen-Photorezeptorzelle. **b:** Detail des Cilienapparates. **c:** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch das Verbindungscilium und den Basalkörper. Das Verbindungscilium einer Photorezeptorzelle ist eine cytoplasmatische Brücke zwischen dem Innensegment (IS) und Außensegment (OS). Das Cilium (CC), entspringt einem Basalkörper (BB), dieser bildet mit der danebenliegenden Centriole (C) den Basalkörper-Centriolen-Komplex aus, von welchem eine Cilienwurzel (CW) in das Innensegment der Photorezeptorzelle projiziert. RPE: Retinales Pigmentepithel, N: Zellkern, ST: Synapsenregion.

1.2 Molekulare Proteinkomponenten des Cilienapparates von Photorezeptorzellen

Bisher wurden folgende Proteine als Komponenten des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle identifiziert: post-translational modifiziertes α - und β -Tubulin bilden die axonemale Grundstruktur aus. Im Basalkörper-Centriolen-Komplex und in der Cilienwurzel ist γ -Tubulin enthalten (Sale et al., 1987; Arikawa und Williams, 1989; Horst et al., 1990; Muresan et al., 1993; Hollander et al., 1999). Zudem konnten verschiedene akzessorische Proteine, unter anderem Kinesin-Motorprotein-Unter-einheiten, cytoplasmatisches Dynein und Komponenten des Dynactin-Komplexes identifiziert werden (Beech et al., 1996; Muresan et al., 1997, Bost-Usinger et al., 1997; Eckmiller und Toman, 1998; Whitehead et al., 1999; Besharse et al., 1999; Marszalek et al., 2000). Aktinfilamente wurden zunächst nur distal im Verbindungscilium an der Basis des Außensegments zusammen mit α -Aktinin und Myosin II nachgewiesen (Besharse et al., 1977, Chaitin und Bok, 1986; Del Priore et al., 1987; Chaitin und Burnside, 1989; Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992). Kürzlich konnten wir jedoch Aktin entlang der Mikrotubuli des gesamten Verbindungsciliums nachweisen, kolokalisiert mit dem unkonventionellen Motorprotein Myosin VIIa (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Die unkonventionellen

Cytoskelettproteine Centrin 1 und Centrin 2 sind ebenfalls im Cilienapparat enthalten (Wolfrum 1995; Wolfrum und Salisbury, 1998). Zudem wurde das unkonventionelle Protein Myocilin im Basalkörper und der Cilienwurzel identifiziert (Kubota et al., 1997; Noda et al., 1997). Darüberhinaus sind hochmolekulare Glycoproteine im Verbindungscilium nahe der Plasmamembran lokalisiert (Horst et al., 1987, Horst et al., 1990; Muresan und Besharse, 1994). Überdies wurden ein GTPase regulierendes Protein (RGPR), eine Phosphatase (PP1) und Kinasen im Verbindungscilium identifiziert (Hollander et al., 1999; Hong et al., 2000; Grumann et al., 2000). Die zuvor genannten Proteine repräsentieren vermutlich nur einen kleinen Anteil aller Proteinkomponenten des Verbindungscilium. Zum besseren Verständnis der Funktion des ciliären Cytoskeletts von Sinneszellen ist es aber notwendig, mehr über die molekulare Zusammensetzung dieser Struktur zu erfahren.

1.3 Funktionen des Verbindungsciliums einer Photorezeptorzelle

Die Strukturelemente des Verbindungsciliums sind an folgenden Funktionen beteiligt: Durch das Cilium erfolgt intrazellulär ein Informationsfluß vom Außen- zum Innenglied, und zur Synapse der Photorezeptorzellen, und ein Substrat-Transport vom Syntheseort im Innensegment zum Ort des Bedarfs in das Außensegment **(1)**. Zum einen ist das Cilium an der Morphogenese der Membranen des Außensegments der Photorezeptorzellen beteiligt **(2)**. Zum anderen ermöglicht das Verbindungscilium die Aufrechterhaltung der biochemisch und funktionell unterschiedlichen Kompartimente der Innen- und Außensegmente der Photorezeptorzellen **(3)**.

(1) intrazellulärer Transport: In Photorezeptorzellen erfolgt die Neusynthese der Proteinkomponenten der Signaltransduktionskaskade im metabolisch aktiven Innensegment, die kontinuierliche Erneuerung der Membran-Disks hingegen im lichtsensitiven Außensegment. Durch „shedding“ werden an der Spitze des Außenglieds „verbrauchte“ Abschnitte entfernt. Gleichzeitig werden an der Basis neue Membran-Disks ausgebildet (Young und Bok, 1969; Young, 1976; Steinberg et al., 1980; Besharse, 1986; Usukura und Obata, 1995). Dieser „Turn-over“ macht umfangreiche polarisierte Transportprozesse von Membranmaterial und löslichen Proteinen vom Innensegment in das Außensegment der Photorezeptorzelle erforderlich. Bisher ist aber weitgehend unbekannt, wie und auf welchem Weg das benötigte Material transportiert wird. Zahlreiche Studien postulieren einen Transport auf cytoplasmatischem Weg durch die dünne intrazelluläre Brücke des Verbindungsciliums in das Außensegment der Photorezeptorzelle (Young, 1967, Young und Droz, 1968; Matsuska, 1974; Röhlich, 1975; Besharse und Pfenninger, 1980; Papermaster et al., 1985; Besharse et al., 1985; Spencer et al., 1988; Horst et al., 1990). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, daß unter anderem Motorproteine wie cytoplasmatisches Dynein, Myosin VIIa, und Kinesin II am Transport der Außensegment-Proteinen beteiligt sind (Tai et al., 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Opsin wird proximal im Innensegment am rauhen ER synthetisiert und

entlang von Mikrotubuli in post-Golgi-Vesikeln zur Basis des Außensegments transportiert (Tai et al., 1999). Durch einen bisher unbekanntem Mechanismus erfolgt die Übergabe an Motorproteine im Verbindungscilium und die Verlagerung in das Außensegment (Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marzalek et al., 2000). Die verschiedenen Proteine des Außensegments werden vermutlich auf unterschiedlichen Transportwegen vom Syntheseort im Innensegment zu ihrem Bestimmungsort in das Außensegment verlagert (Fariss et al., 1997; Marszalek et al., 2000).

(2) *Disk-Morphogenese im Außensegment:* In der Literatur sind mehrere Hypothesen bezüglich der Morphogenese der Disk-Membranen des Außensegments von Photorezeptorzellen zu finden, unter anderem durch Evagination oder Invagination der Plasmamembran des Verbindungsciliums, durch Expansion der Plasmamembran, oder durch Fusion vesikulärer Strukturen mit neugebildeten Disk-Membranen (Sjöstrand, 1959; Eakin und Westfall, 1964; Steinberg et al., 1980; zusammengefaßt dargestellt in Besharse und Horst, 1990; Williams et al., 1992; Usukura und Obata, 1995). Für die Ausbildung der Disk-Membranen ist ein intaktes Aktinzytoskelett notwendig. Darüberhinaus sind aktin-assoziierte Proteine wie Myosin II und α -Aktinin an diesen Prozessen beteiligt (Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989; Besharse und Horst, 1990; Chaitin und Coelho, 1992; Williams et al., 1992; Muresan und Besharse, 1994). Dennoch ist der Prozeß der Disk-Morphogenese noch weitgehend ungeklärt.

(3) *Diffusionsbarriere:* Das Verbindungscilium dient auch als Diffusionsbarriere zur Aufrechterhaltung der funktionellen Kompartimente der Innen- und Außenglieder der Photorezeptorzellen (Horst et al., 1987; Spencer et al., 1988; Horst et al., 1990; Besharse und Horst, 1990). Innen- und Außensegmente von Photorezeptorzellen weisen eine unterschiedliche Proteinzusammensetzung auf. Die Na^+/K^+ -ATPase ist spezifisch im Innensegment, Opsin im Außensegment lokalisiert (Röhlich, 1975; Horst et al., 1987; Spencer et al., 1988; Horst et al., 1990; Schneider und Craig, 1990; Besharse und Horst, 1990; Williams et al., 1992). Die Notwendigkeit der Funktion des Verbindungsciliums als Diffusionsbarriere wird am Beispiel von Opsin deutlich. Opsin wird gegen seinen Konzentrationsgradienten in das Außensegment transportiert. Ein bisher unbekannter Mechanismus verhindert eine Rückdiffusion in das Innensegment entlang des Gradienten (Hong et al., 1999). Eine Akkumulation von Opsin im Innensegment der Photorezeptorzelle und ein Verlust der Funktion des Verbindungsciliums als Diffusionsbarriere können zur Degeneration der Photorezeptorzellen durch Apoptose führen (Nir et al., 1987; Chang et al., 1993; Tai et al., 1999; Marszalek et al., 2000; Hong et al., 2000).

1.4 Problemstellung

Trotz der Forschungsarbeiten mehrerer Arbeitsgruppen während der letzten Jahre konnten bisher nur wenige Proteinkomponenten des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen identifiziert werden. Zunächst stand die Aufklärung der Struktur und Funktion des Mikrotubuli-

Grundgerüsts des modifizierten Ciliums im Vordergrund (Matsusuka, 1974; Röhlich, 1975; Besharse und Horst, 1990; Muresan und Besharse, 1994). Anschließend wurde der Prozeß der Disk-Morphogenese des Außensegments untersucht, und die Transportprozesse in einer Photorezeptorzelle analysiert (Young, 1967; Young und Bok, 1969; Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992; Besharse und Horst, 1990). Erst kürzlich wurde veröffentlicht, daß Motorproteine am Transport des integralen Membranproteins Opsin beteiligt sind (Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Aktuelle Arbeiten weisen zudem darauf hin, daß die Struktur und Funktion des Verbindungsciliums wesentlich komplexer ist, als bisher angenommen wurde (z. B. Hong et al., 2000; Marszalek et al., 2000). Desweiteren wurde deutlich, daß auch Defekte in Genen, die für Cytoskelettproteine kodieren, zu Degenerationen von sensorischen Epithelien führen (Weil et al., 1995; Liu et al., 1997; Tai et al., 1999).

Ziel der vorliegenden Dissertation ist es, durch die Identifikation und Charakterisierung der molekularen Komponenten des ciliären Cytoskeletts von Photorezeptorzellen, einen Einblick in die Funktion und Arbeitsweise einer gesunden Sinneszellen zu erhalten. Dies wiederum ermöglicht ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zu Degenerationen von Photorezeptorzellen führen. Die Identifikation und Charakterisierung von bisher unbekannter molekularer Komponenten des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen erfolgte durch Anwendung einer kombinierten biochemisch-molekularbiologischen Methode. Zunächst wurden Photorezeptorzellen aus Rinderretinae aufgereinigt, und deren Cilienapparate präpariert. Diese Cilienapparate wurden anschließend zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt. Das Antiserum dürfte dann Antikörper gegen die unterschiedlichen molekularen Komponenten der Cilienapparate enthalten. Mit diesem Antiserum wurde eine Rattenretina cDNA-Expressionsbank durchmustert und die isolierten Klone sequenziert. Durch Homologievergleiche der cDNA- und abgeleiteten Proteinsequenzen mit in Genbanken vorhandenen Sequenzdaten konnten Klone identifiziert werden, die potentiell für Fragmente von Cytoskelettproteinen kodieren. Anschließend wurde primär ein Klon zur weiteren Analyse ausgewählt: Klon AS128, der für ein C-terminales Fragment des Aktin-Bindungsprotein Flightless kodiert. In Northern Blot Analysen und Western Blot Analysen wurde die Expression von Flightless in sensorischen und nichtsensorischen Geweben untersucht. Zudem wurde die vollständige kodierende Sequenz von Maus Flightless kloniert. Im Hinblick auf eine subzelluläre Lokalisation, und eine biochemische Charakterisierung von Flightless wurde ein C-terminaler Aminosäurebereich von Flightless in *E. coli* rekombinant exprimiert und das Polypeptid zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt.

Zusammenfassend wurden folgende Fragestellungen im Rahmen dieser Dissertation bearbeitet:

1. Kann eine kombinierte biochemisch-molekularbiologische Strategie erfolgreich zur Identifikation und Isolierung bisher unbekannter Proteinkomponenten von Verbindungscilien eingesetzt werden?

- Können die Cilienapparate von Photorezeptorzellen in ausreichender Menge und Reinheit isoliert und angereichert werden?
- Enthält das hergestellte polyklonale Antiserum auch Antikörper gegen Proteine, die am Aufbau des Cilienapparates des Verbindungsciliums beteiligt sind?
- Können die Antikörper des polyklonalen Antiserums in einem Immunoscreen die Expressionsprodukte von Phagenklonen, die für Proteinkomponenten des Verbindungsciliums kodieren, detektieren?
- Sind in einer Ratten Retina cDNA-Bank Phagenklone enthalten, die für Cytoskelettproteine des Verbindungsciliums kodieren?

2. Ist das Mikrotubuli-Bindungsprotein EB2 Proteinkomponente des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen? Weist die Analyse der Aminosäuresequenz auf die Funktion dieses Proteins im Cilium hin?

3. Ist Flightless ein photorezeptorspezifisches Gen/Protein, oder wird es in weiteren sensorischen und nichtsensorischen Geweben exprimiert?

- Durch Northern Blot Analysen und Western Blot Analysen soll die Expression von Flightless in der Retina, und weiteren sensorischen und nichtsensorischen Geweben analysiert werden.

4. Ist Flightless tatsächlich eine Proteinkomponente des Verbindungsciliums?

- Durch Anwendung von immunocytochemischen und immuno-elektronenoptischen Methoden soll geklärt werden, ob Flightless Proteinkomponente des Verbindungsciliums ist, und in welcher subzellulären Domäne das Protein lokalisiert ist.

5. Welche funktionellen Domänen und Motive weist Flightless auf?

- Analysen der Primär- und Sekundärstruktur eines Proteins können Hinweise auf dessen funktionellen Eigenschaften geben.

6. Ist Flightless in weiteren ciliären sensorischen Zellen enthalten?

- Wird Flightless in weiteren ciliären sensorischen Epithelien exprimiert?
- Steht Flightless möglicherweise in Bezug zu Degenerationserscheinungen sensorischer Epithelien?

Die Beantwortung dieser Fragen sollte es ermöglichen, mehr Informationen über die molekulare Zusammensetzung des Verbindungsciliums der Photorezeptorzellen von Vertebraten zu erhalten. Gleichzeitig ermöglichen diese Kenntnisse zunehmend einen besseren Einblick in die funktionelle Rolle des Cytoskeletts in sensorischen Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Chemikalien und Materialien waren von höchster erhaltlicher Reinheit und wurden von folgenden Firmen bezogen: Fa. Merck (Darmstadt), Fa. Roth (Karlsruhe), Fa. Serva (Heidelberg), Fa. Becton Dickinson (Heidelberg) oder Fa. Sigma (Deisenhofen). Molekularbiologische Agenzien und Materialien für die Biochemie wurden bei folgenden Firmen erworben:

Fa. Amersham Pharmacia (Freiburg): Hybond-N-Membranen, Thermosequenase-Sequenzierkit Version 2.0, Cy5-markierte vektorspezifische Primer T3 und M13, ECL-Western-Blot Kit, HiTrap-Säulen, pGEX Vektoren, Thrombin, GSH-Sepharose, Anti-GST-Antikörper, reduziertes Glutathion.

Fa. AGS (Heidelberg): Taq-Polymerase, Restriktionsenzyme und Puffer, Agarose, dNTPs, Agarose.

Fa. Roche Diagnostics (Mannheim): Restriktionsenzyme und Puffer, Klenow-Enzym, Alkalische Phosphatase, DIG-Luminescent Detection Kit, Plasmid-Isolierungskit.

Fa. Biorad (München): PVDF-Membranen, Protein Standards, Protein-A-Agarosebeads.

Fa. Gibco BRL (Eggenstein): 1 kb Plus DNA-Leiter, Restriktionsenzyme und Puffer, RNA-Leiter, T4-DNA-Ligase, T4-DNA-Polymerase, T4-Kinase, 10 kDa Proteinleiter, RNAGuard.

Fa. Stratagene (Heidelberg): Restriktionsenzyme und Puffer

2.1.2 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Lösungen mit Reinstwasser (hergestellt über eine MilliQ-Anlage, Millipore) angesetzt und autoklaviert.

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA.

TAE-Puffer (1X): 40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,4.

TBE: 900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0.

Ladepuffer für DNA-Agarosegele: 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 30% (v/v) Glycerin in TE-Puffer.

1 kb Plus DNA-Leiter: 0,03% (w/v) Bromphenolblau, 10% (v/v) Glycerin in TE-Puffer, 10% (v/v) 1 kb Plus DNA-Leiter (Fa. Gibco).

PBS: "Phosphat buffered saline", 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄ pH 7,4.

Phosphatpuffer: 0,1 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O, 0,1 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, pH 7,4.

modifizierter RIPA-Proteinextraktionspuffer: 10 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 0,5% NP-40, 0,5% Deoxycholsäure, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM β -Glycerophosphatase, pH 7,4.

RIPA-Proteinextraktionspuffer: 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0,5% Natrium-Deoxycholat, 1 mM Natrium-Vanadat, 30 mM Natrium-Pyrophosphat.

Hepes-Proteinextraktionspuffer: 0,5 M Hepes, pH 7,4.

Laemmli-Puffer: 62,5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau, 0,04% NaN₃, pH 6,8.

SM-Puffer: 100 mM NaCl, 8 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,01% Gelatine.

HERT-Puffer: 4 mM NaHCO₃ (Fa. Roth), 0,18 mM Glucose, 2,1 mM Hepes, 0,1 mM Ascorbinsäure, 0,5 mM Taurin, 1fach „Earles Balanced Salt Solution“ (EBSS), pH 7,5.

Cytoskelettextraktionspuffer: 100 mM Hepes, 10 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 10 mM EGTA, 100 mM KCl, 5% DMSO, 20 mM DTT, 0,2 mM GTP, 25 μ g/ml Phalloidin, 0,4 mM Taxol, 2% Triton X-100, pH 7,5.

Proteaseinhibitor-Mix: 0,42 μ g/ml Leupeptin, 0,83 mg/ml Pepstatin, 0,83 mg/ml Aprotinin in 1 ml DMSO.

CMOD: modifizierter Cytoskelettextraktionspuffer, 200 mM Hepes, 20 mM MgSO₄ x 7 H₂O, 20 mM EGTA, 200 mM KCl, pH 7,5.

SDS-PAGE Trenngelpuffer: 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS.

SDS-PAGE Sammelgelpuffer: 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS.

SDS-PAGE Elektrodenpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,01% (w/v) SDS, pH 8,3.

Modifizierter „Twobin“ Blotpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 68 mM CaCl₂, 20% Methanol (Fa. Roth), pH 8,3.

Tween-20 Waschpuffer: 0,05% Tween 20, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂.

„Non Fat Dry Milk“-Blockierungslösung: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5% Skim-Milk, 1 mM CaCl₂, 0,04% NaN₃.

Boehringer Blockierungslösung: 0,05% Boehringer Blocking Reagenz (Fa. Roche), 150 mM NaCl, 0,04% NaN₃.

Äquilibrierungslösung: 100 mM Tris HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂.

3% NBT (Fa. Roth) in 75% Dimethylformamid.

2% BCIP (Fa. Roth) in 100% Dimethylformamid.

Coomassiefärbelösung: 50% (v/v) Methanol, 10% Eisessig (v/v), 0,02% Serva Blau G (Fa. Serva).

Entfärberlösung: 10% Eisessig (v/v), 25% Methanol.

Kopplungspuffer: 0,2M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3.

Waschpuffer A (Affinitätsreinigung von Antiseren): 0,5 M Ethanolamin, 0,5 M NaCl, pH 8,3.

Waschpuffer B (Affinitätsreinigung von Antiseren): 0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl, pH 4,0.

TBS-Puffer: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1 M HCl, pH 7,6.

TBS-T-Puffer: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 1 M HCl, 0,1% Tween 20.

Lösung A (Immunoscreen): 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, pH 9,5.

Alk-Phos -Puffer: 100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl.

Denaturierungslösung: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.

Neutralisierungslösung: 0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl.

20fach SSC: 3M NaCl, 3M Na-Citrat, pH 7,4.

Maleinsäurepuffer: 150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7,5.

2.1.3 Medien für Bakterien-Zellkultur

Alle angegebenen Medien wurden autoklaviert:

LB-Medium: 10 g/l NaCl (Fa. Roth), 10g/l Bacto Trypton (Fa. Becton Dickinson), 5g/l Hefeextrakt (Fa. Roth). Wo notwendig, wurden die Antibiotika Ampicillin mit einer Konzentration von 75-100 µg/ml zugegeben.

LB-Agar: 10 g/l NaCl, 10g/l Bacto Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 1,5% Agar (Fa. Roth). Wo notwendig, wurden die Antibiotika Ampicillin mit einer Konzentration von 75-100 µg/ml, Tetracyclin in einer Konzentration von 12,5 µg/ml und Kanamycin in einer Konzentration von 25 µg/ml zugegeben.

LB-Glucose: 10 g/l NaCl, 10g/l Bacto Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 25 mM Glucose (Fa. Roth).

NZY-Medium: 5g/l NaCl, 2g/l MgSO₄ x 7 H₂O (Fa. Roth), 5g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ-Amin (Fa. Sigma), pH 7,5.

NZY-Agar: 5g/l NaCl, 2g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 5g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ-Amin, pH 7,5, 1,5% Agar.

NZY-Top-Agar: 5g/l NaCl, 2g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 5g/l Hefeextrakt, 10 g/l NZ-Amin pH 7,5, 0,7% „low melting“ Agarose (Fa. Sigma).

YT-Medium: 2,5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l Bacto Trypton.

YTA-Medium: 2,5 g/l NaCl, 5 g/l Hefeextrakt, 8 g/l Bacto Trypton, Zugabe von Ampicillin zur Endkonzentration von 75 µg/ml.

2.1.4 Geräte

Autoklav	Varioklav Dampfsterilisator, Fa. H + P
Blotting-Kammer	"Semi-Dry" transfer cell Transblot SD, Fa. Biorad
Elektrophorese-Kammer	Fa. Amersham Pharmacia
Flachbett (DNA-Agarosegele)	Fa. Biorad, Mini Protean III Elektrophoresekammer
Vertikal (Proteingele)	2050 Midget-Elektrophorese-Einheit der Fa. Pharmacia Biotech
Bakterien-Inkubatoren	Binder-Inkubator
Inkubator	Inova 4230, Fa. New Brunswick Scientific U.S.A., Edisor
Schüttelinkubator	
Mikroskope	Leitz DMRB, Fa. Leica
DIK-Durchlichtmikroskop	Zeiss Axiovert 35 Photomikroskop
	Leica TCSNT
	Leica
Laser Scanning Mikroskop	Nuiare Cleanbench Class II
Binokular	Zeiss Leo 906 E
Sterile Werkbank	Zeiss EM900
Elektronenmikroskop	Biorad Power Pac 200
	Biorad Power Pac 300
	Fischer Phero-Stab 500
	Perkin Elmer Cetus Thermal Cyler
	Biorad Smartspec 3000
	Kodak, Polaroid Gelcam, Sofortbildkamera
	Fischer Accumet Basic
	Branson Sonifier Cell Disrupter B 15, Braun, Labsonic 1510
Netzgeräte	
PCR-Gerät	
Photometer	
Photoeinheit zur Geldokumentation	
pH-Meter	
Ultraschallgerät	
Zentrifugen	
Labor-Kühlzentrifuge	Hermle Z233-MKZ
Labor-Tischzentrifuge	Hereaus Labofuge 400
Labor-Tischkühlzentrifuge	Hereaus Labofuge 400E
Tischzentrifuge	Hereaus Biofuge Pico
Ultrazentrifuge	Sorvall RC28S
Digitalwaage	Sartorius BP610
Ultraschallbad	Bendelin Sonorex RK 103, Berlin
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Wärmeschrank	Binder
Hybridisierungssofen	Binder
Heizrührer	Heidolph MR3001 K
Schüttler	Edmund Bühler KS-15
Inkubationsschüttler	Thermomixer compact, Fa. Eppendorf
Heizblock	HLC TM 130-6
Heizwasserbad	GFL Heizwasserbad
Lichttische	
UV-Lichttisch	VL Vilber Lourmat UV-Transilluminator
Lichttisch	VL Vilber Lourmat Lichttisch
UV-Crosslinker	VL Vilber Lourmat
Automatischer Sequenzierer	Fa. Amersham Pharmacia Biotech
AlfExpress	
Manuelle Sequenzierapparatur	Fa. Gibco Life Technologies

2.1.5 Plastikwaren

Alle verwendeten Gefäße wurden von den Firmen steril geliefert. Es wurden Produkte der Firmen Greiner (Nürtingen) und Nunc (Wiesbaden) verwendet. Petrischalen, und Kulturschalen, Zentrifugenröhrchen (50 ml und 15 ml mit Spitzboden), und Reaktionsgefäße (0,2 µl, 0,5 µl, 1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße wurden von der Fa. Roth (Karlsruhe) bezogen. Kanülen wurden von der Fa. Becton Dickinson in Heidelberg bezogen.

2.1.6 Oligonukleotide für die Sequenzierung

Oligonukleotide wurden von der Firma Gibco Life Technologies BRL in Auftragssynthese hergestellt. Cy5-markierte Primer für Sequenzierungsreaktionen wurden bei Amersham Pharmacia Biotech erworben.

Primerbezeichnung	Nukleotidsequenz
T3	5'- AATTAACCCCTCACTAAAGGG -3'
T7	5'- GTAATACGACTCACTATAGGGC - 3'
M13	5'- GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA - 3'

Tabelle 1: Verwendete Sequenzierungs-Primer

2.1.7 Bakterienstämme und Vektoren

	Vektor
GST-Expressionssystem (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)	pGEX-KG, pGEX-2T, pGEX-3, pGEX-1
Klonierungsvektor (Fa. Stratagene)	pBluescript SK(-)-Phagemid von Stratagene
Bakterienstämme	
Proteinexpression	<i>E. coli</i> BL12
Bakterienkultur	<i>E. coli</i> XL1 MRF'
Ausschleusung	<i>E. coli</i> SOLR

Tabelle 2: Verwendete Bakterienstämme und Klonierungsvektoren

2.1.8 Versuchstiere

Zur Antikörperproduktion wurden Kaninchen (Stamm "New Zealand White"), und zur Präparation von Gewebe Ratten ("Sprague Dawley") und Mäuse (C57/BL6) verwendet. Die Kaninchen wurden von der Fa. SAVO (Kissleg) bezogen und ab einem Alter von 12 Wochen immunisiert. Die Ratten und Mäuse wurden von der Fa. Jackson Labs bezogen. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen bei 25°C, 12 Stunden hell/12 Stunden dunkel gehalten. Adulte Tiere wurden mit CO₂ getötet und benötigte Organe und Gewebe für lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Untersuchungen sofort weiterverarbeitet. Gewebe zur Herstellung von Proteinextrakten (für Western Blot Analysen) und Isolierung von RNA wurden in flüssigem Stickstoff bei ca. -165°C schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.1.9 Antikörper

Für immunocytochemische und immunohistochemische Experimente sowie Western Blot Analysen wurden folgende Antikörper in der angegebenen Verdünnung verwendet (Tab. 3):

Antikörper	Antigen	Antikörper erzeugt in	Immunohistochemie	Western Blot	Quelle
20H5	Chlamydomonas Centrin	Maus-Hybridoma	1:250	1:2500	J.L. Salisbury
Mmcen1	Maus Centrin 1	Kaninchen	1:100	1:500	A. Schmitt
AX4	Cilienapparate aus Rinder-PRC	Kaninchen	1:500	1:5000	A. Schmitt
Rn Fli	Rn Flightless C-Terminus	Kaninchen	1:50-1:250	1:200-1:500	A. Schmitt
S65-6	Arrestin	Maus-Hybridoma	-	1:500	L.S. Lang
S65-63	Arrestin	Maus-Hybridoma	-	1:500	L.S. Lang
SCT 128	Arrestin	Maus-Hybridoma	-	1:500	L.S. Lang
K16-155	Opsin	Maus-Hybridoma	1:100	1:800	P.A. Hargrave
K16-50	Opsin	Maus-Hybridoma	1:100	1:800	P.A. Hargrave
R2-15	Opsin	Maus-Hybridoma	1:100	1:800	P.A. Hargrave
B6-30a1	Opsin	Maus-Hybridoma	1:100	1:800	P.A. Hargrave
α -Actinin	α -Actinin (Ratte)	Maus-Hybridoma	1:50	1:500	M. Knippers
β -Tubulin	β -Tubulin	Maus-Hybridoma	-	1:500	Fa. Sigma
γ -Tubulin	γ -Tubulin	Kaninchen	1:50	1:500	Fa. Sigma
Clone 6-11b-1	acetyliertes α -Tubulin	Maus-Hybridoma	1:200	1:2000	Fa. Sigma
α -Aktin	α -Aktin	Maus-Hybridoma	-	1:100	M. Knippers
Myosin II	Myosin II	Maus-Hybridoma	-	1:200	M. Knippers
Klon C4	Aktin	Maus-Hybridoma	1:200	1:2000	Fa. Sigma
Klon DM1A	α -Tubulin	Maus-Hybridoma	1:100	1:1000	Fa. Sigma
6D4	Calmodulin	Maus-Hybridoma	-	1:1000	Fa. Sigma
Klon No-5	EB1	Maus Hybridoma	1: 250	1:2500	Transduction Lab.
GST	GST	Maus Hybridoma	1:500	1:5000	Fa. APB
Klon70.1	cytoplas. Dynein Intermediärkette	Maus-Hybridoma	1:200	1:2000	Fa. Sigma

Tab. 3: Liste der verwendeten primären Antikörper und Antiseren

PRC: „photoreceptor cells“; Fa. APB: Amersham Pharmacia Biotech

Die polyklonalen Antiseren AX4, Anti-Maus Centrin1 (MmCen1) und Anti-Flightless wurden am Zoologischen Institut I, Universität Karlsruhe während der Doktorarbeit hergestellt. Das AX4-Antiserum wurde an Protein A, die beiden anderen Antiseren am Antigen affinitätschromatographisch aufgereinigt. Der Nachweis der primären Antikörper, sowohl *in situ* als auch

in Western Blot Analysen, erfolgte durch entsprechende sekundäre Antikörper, die in der folgenden Tabelle zusammengefaßt sind:

Antikörper	Markierung	Methode	Verdünnung	Bezugsquelle
Ziege Anti-Kaninchen	Rhodamin	IF	1:400	Cappel Oregon, Technica Corp., Durham, USA
Ziege Anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	WB	1:4000	Sigma, Deisenhofen, Germany
Ziege Anti-Kaninchen	1 nm Goldpartikel	EM	1: 150	Nanoprobes, New York, USA
Ziege Anti-Maus	1 nm Goldpartikel	EM	1:100	Nanoprobes, New York, USA
Ziege Anti-Maus	10 nm Goldpartikel	EM	1:75	Nanoprobes, New York, USA
Ziege Anti-Maus	Fluorescein Isothiocyanat	IF	1:400	Cappel Oregon, Technica Corp., Durham, USA
Ziege Anti-Maus	Alkalische Phosphatase	WB	1:25.000	Sigma, Deisenhofen, Germany
Esel Anti-Ziege	Rhodamin	IF	1:200 bis 1:400	Cappel Oregon, Technica Corp., Durham, USA
Esel Anti-Ziege	Alkalische Phosphatase	WB	1: 10.000	Sigma, Deisenhofen, Germany

Tab. 4: Sekundäre Antikörper, die zum Nachweis von primären Antikörpern verwendet wurden. IF: Immunofluoreszenz, EM: Immunocytochemie (Immunogoldmarkierung), WB: Western Blot Analyse

2.1.10 cDNA-Banken

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende cDNA-Banken durchmustert:

1. OligodT-geprimte Rattenretina cDNA-Bank, hergestellt von P. Sander am Zoologischen Institut I der Universität Karlsruhe
2. OligodT-geprimte Mausretina cDNA-Bank, spezifisch angereichert an Phagen mit cDNA-Insert > 2 kb, dankend erhalten von S. Azarian.
3. OligodT-geprimte Rattentestis cDNA-Bank, erworben bei Stratagene.

2.1.11 Soft- und Hardware

Die Analyse der elektronenmikroskopischen Präparate erfolgte am Elektronenmikroskop (Zeiss EM900 und LEO 906E) durch die Belichtung von Negativfilmen (Fa. Kodak). Die Negative wurden unter Verwendung eines Durchlicht-Flachbettscanners (Fa. Agfa, Modell Duoscann T2500) digitalisiert und mit dem Programm "Corel Draw" beschriftet. Immunofluoreszenzmarkierungen von Proteinen in Gewebeschnitten wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Leitz DMRB (Fa. Leica) oder dem konfokalen Laserscanning Mikroskop TCSNT der Fa. Leica analysiert und dokumentiert. Schwarz-Weiß-Negative und Diafilme wurden unter Verwendung des genannten Scanners digitalisiert und weiterbearbeitet. Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen von Daten in Diagrammen wurden mit dem Programm "Excel" durchgeführt. Nukleinsäuresequenzen und Aminosäuresequenzen wurden

unter Verwendung des Programms "PCGene" (Fa. IntelliGenetics Inc., Geel, Belgien) sowie im Internet zur Verfügung stehender Programme analysiert.

2.2 Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Bei Verwendung spezieller Kits wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.2.1 Präparative Methoden

2.2.1.1 Präparation der Organe und Gewebe

Bei Präparationen wurden den Ratten und Mäusen verschiedene Organe und Sinnesepithelien entnommen. Die Retinae wurden isoliert, indem das Fell um die Augenpartie entfernt, das Auge mit einer gebogenen Pinzette von unten umfaßt und mit einer frischen Rasierklinge ein Längsschnitt durch die Cornea des Auges geführt wurde. Durch vorsichtiges Anheben der Pinzette wurde der Druck im Auge langsam erhöht, und die Linse und der Glaskörper des Auges herausgedrückt. Diese wurden mit einer zweiten Pinzette abgezogen, und durch ein weiteres Anheben der gebogenen Pinzette die Retina vom Pigmentepithel abgelöst, mit einer feinen Pinzette aus dem Auge entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Cochlea wurde präpariert, indem zunächst das Mittelohr von der Seite aus geöffnet wurde. Anschließend wurde die Cochlea vorsichtig vom Vestibularorgan abgetrennt und isoliert. Das Riechepithel wurde entnommen, indem in das Gaumendach eingeschnitten und der Nasenraum in der Mitte durchgetrennt wurde. Das Riechepithel lag dann im hinteren Abschnitt am Siebbein an. Zudem wurden Niere, Skelett- und Herzmuskel, Gehirn, Testis, Milz und Leber entnommen. Für immunohistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Gewebe fixiert und eingebettet. Gewebe zur Herstellung von Proteinextrakten oder Isolierung von RNA wurden in flüssigem Stickstoff bei ca. -165°C schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Isolierung von Rinderretinae

Rinderaugen wurden vom lokalen Schlachthof bezogen und nach Erhalt zwei Stunden im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Die Isolierung der Retinae erfolgte, indem das Auge durch einen Schnitt um die Iris herum geöffnet und die Linse entfernt wurde. Durch vier seitliche Einschnitte wurde das Auge umgestülpt und die Retina mit einer gebogenen Pinzette in Richtung des Sehnervs zusammen-geschoben ohne das darunterliegende Pigmentepithel mitzuführen. Jeweils zehn isolierte Retinae wurden in 5 ml HERT (4 mM NaHCO_3 (Fa. Roth), 0,18 mM Glucose (Fa. Roth), 2,1 mM Hepes (Fa. Roth), 0,1 mM Ascorbinsäure (Fa. Sigma), 0,5 mM Taurin (Fa. Sigma), EBSS („Earles balanced salt solution“, (Fa. Sigma), pH 7,2) mit 50% Saccharose aufgenommen und bei -80°C gelagert. Es wurden ca. 800 Retinae präpariert, um 5-6 mg isolierter Cilienapparate zu erhalten. Diese wurden zur Herstellung des polyklonalen

Antiserums AX4, zur biochemischen Charakterisierung der Cilienapparate und für immunocytochemische und elektronenoptische Experimente eingesetzt.

2.2.1.3 Aufreinigung der Photorezeptorzellen

Die Aufreinigung der Photorezeptorzellen wurde mit einem modifizierten Protokoll durchgeführt (verändert nach Papermaster et al., 1974; Fleischmann et al., 1980 und Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Alle Schritte wurden im schwachen Rotlicht durchgeführt, nach jedem Schritt eine Probe von 1 ml entnommen, 10 µl davon auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben, eingedeckt und mit einem Zeiss Axiovert Mikroskop analysiert und dokumentiert. Die Dichtegradienten-Zentrifugationen wurden mit einer Sorval Ultrazentrifuge RC28S in einem Ausschwenkrotor (S 20/36) durchgeführt. Bei einer Aufreinigung wurden 120 isolierte Retinae eingesetzt. Diese wurden über Nacht bei 4°C auf Eis aufgetaut und PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid, Fa. Serva) zu einer Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben. Durch vorsichtiges Schütteln der Retinae im Medium (50%ge Saccharoselösung in HERT) wurden die Photorezeptorzellen durch Scherkräfte von den übrigen retinalen Zellschichten abgetrennt. Diese Suspension wurde durch ein 400 µm Netz (Fa. Greiner) filtriert (Abb. 4), im Netz zurückgebliebene Reste nochmals in 2 ml Medium aufgenommen, kurz geschüttelt und erneut filtriert. Das Filtrat wurde auf 5 ml 50% Saccharose in HERT aufgetragen, zentrifugiert (18.000 rpm (31.000 g), 4°C für 1 Stunde), die Zellen des Pigmentepithels abgetrennt und die Außensegmente angereichert. Anschließend folgte eine weitere Reinigung der Außensegmente durch Zentrifugation auf einem kontinuierlichen 50-25%gen Saccharosegradienten in HERT (18.000 rpm (31.000 g), 4°C für 2 Stunden). Dadurch entstanden zwei Banden, wobei die obere Bande vorsichtig abgenommen und durch Zentrifugation auf 5 ml 50%ger Saccharose in HERT angereichert wurde (18.000 rpm (31.000 g), 4°C, 1 Stunde). Anschließend wurde die Saccharosekonzentration der Probe durch Zugabe von HERT verringert und die Außensegmente pelletiert (20.000 rpm (39.000 g), 4°C, 20 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bei -80°C aufbewahrt oder unmittelbar zur Detergenzextraktion der Cilienapparate eingesetzt.

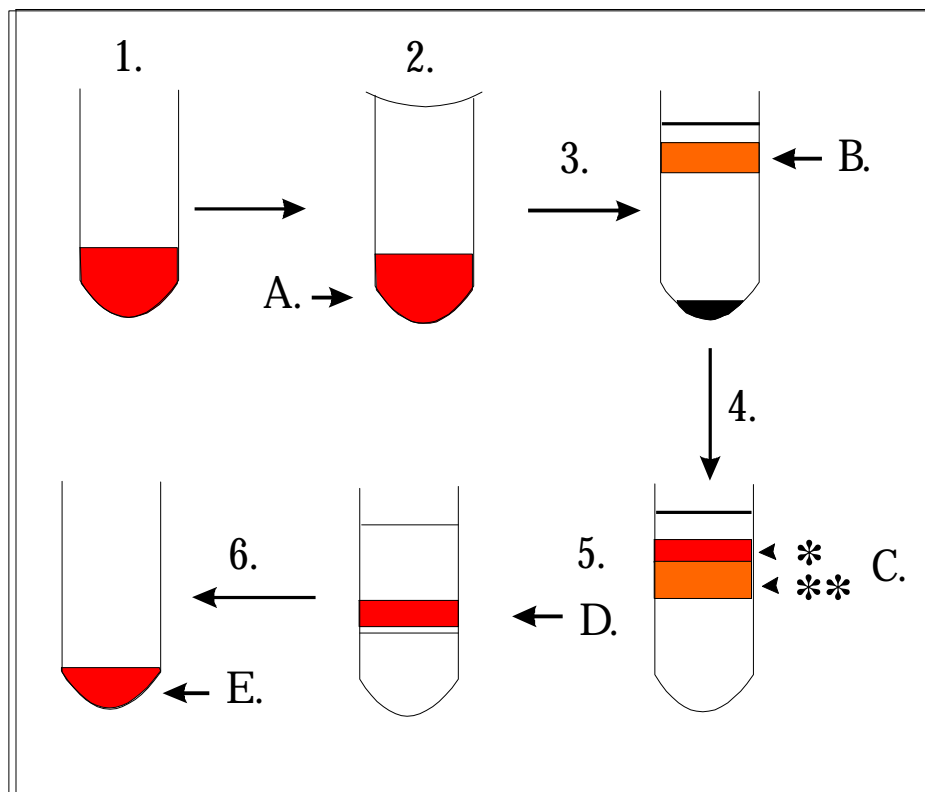


Abb. 4: Schematische Darstellung der Aufreinigung von Photorezeptorzellen aus isolierten Rinderretinae in einem Flußdiagramm

1: Rinderretinae in 50% Saccharose in HERT. **2:** Filtration durch ein 400 µm Netzchen. **3:** Zentrifugation auf einem 50% Saccharosekissen. **4:** Zentrifugation auf einem kontinuierlichen 50-25%igen Saccharose-Dichtegradienten. **5:** Reinigung auf einem 50% Saccharosekissen. **6:** Pelletierung der IS und OS. **7:** Cytoskelettextraktion. **A:** Probe Nr. 1, **B:** Probe Nr. 2, **C:** Probe Nr. 3, Vereinigung von OS-IS und OS, **D:** Probe Nr. 4. **E:** Pelletierte OS-IS und OS. *: OS, **: OS-IS

2.2.1.4 Isolierung der Cilienapparate

Die isolierten Photorezeptorzellen von ca. 20 Retinae wurden in 1 ml Cytoskelett-Extraktionspuffer (100 mM Hepes (pH 7,5), 10 mM MgSO₄ (Fa. Serva), 10 mM EGTA (Fa. Sigma, pH 7,5), 100 mM KCl (Fa. Roth), 5% DMSO (Fa. Sigma), 20 mM DTT (Fa. Roth), 0,2 mM GTP (Fa. Sigma), 25 µg Phalloidin (Fa. Sigma), 0,04 mM Taxol (Fa. Sigma), 2% Triton X-100 (Fa. Sigma) und 2 µl Proteaseinhibitorcocktail (0,42 mg/ml Leupeptin (Fa. Sigma), 0,83 mg/ml Pepstatin A (Fa. Sigma), 0,83 mg/ml Aprotinin (Fa. Sigma)), Endkonzentration 1 µg/ml resuspendiert, und eine Stunde auf Eis extrahiert. Anschließend wurde die Lösung auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten (jeweils 5 ml 60%/50%/40%ge Saccharose (Fa. Roth) in CMOD (200 mM Hepes, pH 7,5, 20 mM MgSO₄, 20 mM EGTA, pH 7,5, 200 mM KCl) aufgetragen und für drei Stunden bei 18.000 rpm (31.000 g) und 4°C zentrifugiert (Abb. 5). Die isolierten Cilienapparate reicherten sich als scharfe Bande nahe der Phasengrenze 50%/60% Saccharose an. Der gesamte Gradient wurde von oben in 1 ml Fraktionen abgenommen, wodurch 20 bis 25 Fraktionen entstanden.

Die Fraktionen wurden zunächst durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen analysiert, um jene mit angereicherten Cilienapparaten eindeutig zu identifizieren. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen mittels BCA-Assay wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die Fraktionen mit angereicherten Cilienapparaten wurden vereinigt, und durch Zentrifugation (Festwinkelrotor (F 28/36) bei 20.000 rpm (39.000 g)) pelletiert. Nach mehrmaligem Waschen in sterilfiltriertem PBS wurden die Cilienapparate in 100 μ l sterilfiltriertem 0,1 M PBS aufgenommen und bei -80°C gelagert.

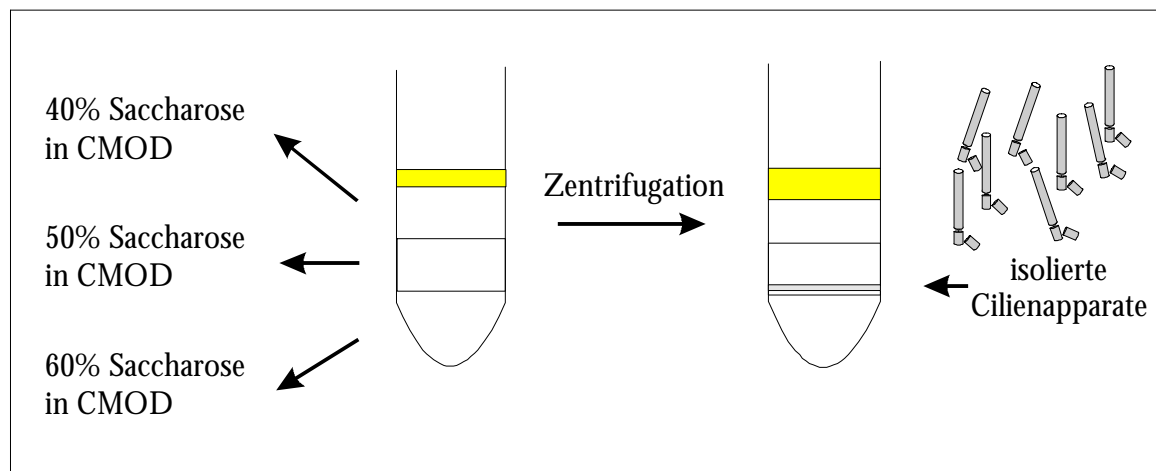


Abb. 5: Isolierung der Cilienapparate

Nach Aufreinigung der Außen- und Innensegmente der Photorezeptorzellen wurden diese pelletiert, in Cytoskelett-Extraktionspuffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Anschließend folgte eine Zentrifugation auf einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten. Die isolierten Cilienapparate befanden sich anschließend an der Phasengrenze 50%/60% Saccharose.

2.2.1.5 Präparation von Photorezeptormembranen isolierter Außensegmente

Die Präparation der Außensegmente der Photorezeptorzellen und die nachfolgenden Membranextraktionen wurden entsprechend Matesic et al. (1992) durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei schwachem Rotlicht und auf Eis. Zunächst wurden 20 isolierte Rinderretinae in 10 ml Puffer A (20 mM MOPS (Fa. Roth), 100 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1 mM DTT (Fa. Roth), pH 7,5) mit 45% Saccharose und 100 μ l Proteaseinhibitor-Mix (Fa. Sigma) aufgenommen und leicht geschüttelt um die Photorezeptorzellen durch Scherkräfte von den übrigen retinalen Schichten abzutrennen. Anschließend wurde die Suspension durch ein 400 μ m Netzchen filtriert und in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen auf 5 ml 45% Saccharose in Puffer A aufgetragen. Nach Überschichten mit 2 ml Puffer A folgte die Zentrifugation in einer Sorvall Ultrazentrifuge (Sorvall RC-5B, Rotor SS-34) bei 4°C für 30 Minuten bei 27.000 g. Die intensiv rote Bande mit isolierten Außensegmenten an der Phasengrenze 45% Saccharose/Puffer A wurde vorsichtig abgenommen, ohne die darunter liegende weiße Bande mitzuführen. Anschließend wurden die Außensegmente nochmals durch Zentrifugation auf 5 ml 38% Saccharose in Puffer A gereinigt (30 Minuten, 4°C , 27.000 g, Sorvall RC-5B, Rotor SS-34) und erneut an der Phasengrenze

Saccharoselösung/Puffer A abgenommen, anschließend die Saccharosekonzentration der Probe mit 25 ml Puffer A verdünnt und die Photorezeptorzell-Außensegmente pelletiert (20 Minuten, 4°C, 45.000 g, Sorvall RC-5B, Rotor SS-34). Das Pellet wurde anschließend in 1 ml Puffer B (10 mM Tris-HCl pH 7,5, mit 50 µM GTP und 25 µg/ml Phalloidin) resuspendiert und mehrmals durch eine Spritze mit einer Kanüle (Durchmesser 0,6 µm) gezogen, um die Außensegmente aufzubrechen und die Disk-Membranen freizulegen. Anschließend folgte eine erneute Pelletierung durch Zentrifugation bei 4°C, 45.000 g für 20 Minuten (Sorvall RC-5B, Rotor SS-34). Das Pellet wurde dann in 1 ml Puffer C (10 mM Tris-HCl pH 7,5 mit 25 µg Phalloidin) resuspendiert, mehrmals durch eine Spritze gezogen, zentrifugiert (4°C, 45.000 g, 20 Minuten, Sorvall RC-5B, Rotor SS-34) und dieser Schritt wiederholt. Das Pellet und der Überstand mit den löslichen Proteinen wurden bei -80°C gelagert.

Anschließend folgte die Hochsalzextraktion der Membranen. Durch Veränderung des pH-Wertes und Zunahme der Ionenkonzentration in drei Extraktionsschritten wurden zuerst locker an die Membran assoziierte periphere Protein, und nachfolgend fester an die Membran gebundene Proteine entfernt. Nach der dritten Hochsalzextraktion sollten in der Präparation nur noch Trans-membranproteine und Proteine mit Lipidanker (z. B. N-Myristoylierung) in der Probe enthalten sein (Matesic et al., 1992). Die Probe mit den Außensegment-Membranen wurde auf Eis aufgetaut, in 10 ml Puffer D (1,8 M KCl in 10 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert und 20 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Suspension mehrmals durch eine Spritze mit einer Kanüle (Durchmesser 0,6 µm) gezogen wurde. Anschließend folgte die Pelletierung bei 4°C, 45.000 g für 40 Minuten (Sorvall RC-5B, Rotor SS-34). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 2 ml Puffer E (4 M Harnstoff, in 10 mM Tris-HCl pH 7,5) resuspendiert, mehrmals durch eine 0,6 µm Kanüle gezogen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer erneuten Pelletierung (140.000 g, 1 Stunde, 4°C, Ultrazentrifuge Beckmann Optima, Rotor RTI 80) folgte als letztes die Alkaliextraktion in Puffer F (0,1 M Na-Carbonat in 10 mM Tris, pH 11,5) für 30 Minuten auf Eis, und die Pelletierung der Membranen bei 140.000 g, für 1 Stunde bei 4°C. Das hellgelbe Pellet wurde dann in 0,5 ml 0,5 M HEPES-Puffer pH 7,5 resuspendiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Während der Präparation abgenommene Überstände wurden aufbewahrt, um nach Bestimmung der Proteinkonzentration in Western Blot Analysen deren Gehalt an löslichen Proteinen anhand von ausgewählten Beispielen zu prüfen. War die Proteinkonzentration zu gering, so wurden die Proteine durch Zugabe von Chloroform/Methanol, Aceton oder alternativ durch Ammoniumsulfat ausgefällt. Nach jedem Schritt der Membranpräparation und Hochsalzextraktion wurden Proben abgenommen und in Western Blot Analysen analysiert. Nachweise erfolgten mit Antikörpern und Antiseren gegen Cytoskelettproteine wie Aktin, Tubulin und Flightless und gegen das integrale Membranprotein Opsin.

2.2.2 Biochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte wurden vorwiegend mit folgenden Extraktionspuffern hergestellt: RIPA-Puffer (50 mM Tris-HCl (Fa. Roth, pH 7,4), 150 mM NaCl (Fa. Roth), 0,1% SDS (Fa. Roth), 2 mM EDTA (Fa. Roth), 1% NP-40 (Fa. Roche), 0,5% Natrium-Deoxycholat (Fa. Roth), 1 mM Natrium-Vanadat (Fa. Sigma), 30 mM Natrium-Pyrophosphat (Fa. Sigma), modifizierter RIPA-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM CaCl₂, 0,5% NP-40, 0,5% Deoxycholinsäure (Fa. Sigma), 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM NaF, 20 mM β -Glycerophosphatase (Fa. Sigma), (pH 7,4)) oder 0,5 M HEPES-Puffer (Fa. Roth) pH 7,4. Bei Proteinextraktion mit modifiziertem RIPA-Puffer wurde dieser auf 100°C erhitzt, zum Gewebe zugegeben und dieses homogenisiert. RIPA-Puffer und 0,5 M HEPES-Puffer wurden kalt zugegeben und das Gewebe im Eisbad homogenisiert. Bei allen Extraktionspuffern wurden Proteaseinhibitoren (Proteaseinhibitor-Mix: 0,42 g/ml Leupeptin (Fa. Sigma), 0,083 g/ml Pepstatin (Fa. Sigma), 0,83 g/ml Aprotinin (Fa. Sigma)) zu einer Endkonzentration von 1 μ g/ml und Prefablock (4-(2-Aminoethyl)-Benzolsulfonyl Fluorid Hydrochlorid, Fa. Roche) zur Endkonzentration von 4 mM zugegeben, um eine Degradation der Proteine durch Proteasen zu vermeiden. Das Homogenisat wurde anschließend in einer Eppendorffzentrifuge (20.000 g, 15 Minuten, 4°C) zentrifugiert und der Überstand abgenommen und mit diesem weitergearbeitet.

2.2.2.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge einer Lösung erfolgte durch Absorbionsmessung bei 260 nm, wobei eine Absorbtion bei OD_{260nm} von 1,0 einer Proteinmenge von 0,75 mg/ml entspricht (Harlow und Lane, 1988), oder mit einem BCA-Assay. Dabei wurde zunächst eine Eichkurve als Referenz zur Ermittlung der genauen Proteinkonzentration erstellt. Eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 0,1 μ g BSA (Fa. Sigma) in 1 ml des entsprechenden Puffers wurde zu verschiedenen Standardkonzentrationen (1 μ g, 2,5 μ g, 5 μ g und 10 μ g BSA in 50 μ l Puffer) verdünnt und bei der Proteinbestimmung in 3facher Ausführung mitgeführt. Zu messende Proben wurden 1:50 verdünnt und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Zugabe von 1 ml Arbeitslösung (50 Volumen Bicininensäure (Fa. Sigma) und 1 Volumen einer 4% CuSO₄-Lösung (Fa. Sigma)) zu den verdünnten Proben und Standardlösungen der Eichkurve wurden diese 30 Minuten bei 60°C im Wärmeblock inkubiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur die Proteinkonzentration anhand der Absorbtion bei 562 nm photometrisch bestimmt.

2.2.2.3 Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die analytische Auftrennung von Proteinextrakten erfolgte in 0,75 mm dicken vertikalen Flachgelen einer "2050 Midget-Elektrophorese-Einheit" der Fa. Pharmacia Biotech und einer "Protean III Mini-Gelelektrophorese-Einheit" der Fa. Biorad unter Verwendung eines

diskontinuierlichen Puffersystems (Sammelgelpuffer pH 6,8, Trenngelpuffer pH 8,8 und Laufpuffer pH 8,3) nach Laemmli (1970). Die Größe der Gelkammer betrug 8 cm x 10 cm x 0,75 mm. Die Proteinextrakte wurden auf ein 8%, 12% oder 15% Polyacrylamidgel aufgetragen und aufgetrennt. Als Molekular-gewichtsstandard wurde die 10 kDa-Proteinleiter der Fa. Gibco BRL verwendet. Die Zusammensetzung der Trenn- und Sammelgele zeigt Tabelle 5. Das Trenngel wurde dann zwischen die zusammengesetzten Elektrophoreseplatten gegossen, mit *A. bidest* überschichtet und für 15 Minuten bei 50°C auspolymerisiert. Anschließend wurde das *A. bidest* vom Trenngel abgegossen, dieses mit dem Sammelgel überschichtet und unter den gleichen Bedingungen auspolymerisiert. Vor der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteinproben 1:2 mit 2fach Laemmli-Puffer versetzt und auf eine Endkonzentration von 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 10% Glycerin, 5% β -Mercaptoethanol, 1 mM EDTA, 0,02% Bromphenolblau eingestellt. Als Elektrodenpuffer wurde verwendet: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,3. Die Elektrophorese wurde bei Raumtemperatur und einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel (2050 Midget-Elektrophorese-Einheit) sowie bei der "Protein III Mini-Gelelektrophorese-Einheit" der Fa. Biorad bei konstant 200 Volt für 1 Stunde durchgeführt.

Stammlösungen	8% Trenngel	12% Trenngel	15% Trenngel	6% Sammelgel
30% Acrylamid	1040 μ l	1616 μ l	2020 μ l	400 μ l
2% Bis	180 μ l	284 μ l	355 μ l	70 μ l
4 x Trenngelpuffer	1000 μ l	1000 μ l	1000 μ l	-
4 x Sammelgelpuffer	-	-	-	500 μ l
<i>A. bidest</i>	1880 μ l	1008 μ l	725 μ l	1030 μ l
Gesamtvolumen	4000 μ l	4000 μ l	4000 μ l	2000 μ l
10% APS	20 μ l	20 μ l	20 μ l	10 μ l
TEMED	3 μ l	3 μ l	3 μ l	1,5 μ l

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele berechnet für ein Gel

2.2.2.4 Western-Blot Analyse

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine in einer "Semi-Dry" Blot-apparatur der Fa. Biorad auf PVDF-Membranen geblottet. Die hydrophobe Membran wurde zunächst durch Schütteln in 100% Methanol benetzbar gemacht, und die ungefärbten Polyacrylamidgelle sowie die Blotmembranen 10 Minuten in Blotpuffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin (Fa. Roth), 68 mM CaCl_2 , 20% Methanol (Fa. Roth) pH 8,3) äquilibriert. Auf die Anodenplatte der Blot-apparatur wurden 3 Lagen in Transferpuffer getränktes Filterpapier gelegt, darauf die PVDF-Membran, dann das Gel und 3 weitere in Transferpuffer getränkte Filterpapiere. Der Proteintransfer wurde bei einer konstanten Stromstärke von 1 mA pro cm^2 Membranfläche für 1-2 Stunden durchgeführt. Die Membran wurde nach erfolgtem Proteintransfer inkubiert, oder bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

Für den Nachweis von Proteinen wurde die Membran zunächst mit 100% Methanol benetzt, kurz in Tween 20 Waschpuffer (0,05% Tween 20 (Fa. Roth), 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl (Fa. Serva), 1 mM CaCl_2) gewaschen, für eine Stunde in Blockierungslösung blockiert (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 5% Skim-Milk (Fa. Difco), 1 mM CaCl_2 , 0,04% NaN_3) und anschließend nochmals 1 Stunde in Boehringer Blockierungspuffer (0,5% Boehringer Blocking Reagenz (Fa. Roche), 150 mM NaCl, 0,04% NaN_3 , pH 7,4) inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Nach 5minütigem Waschen der Membran in Tween 20 Waschpuffer folgte die Inkubation im primärem Antikörper verdünnt in Boehringer Blockierungspuffer über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 10 Minuten in Tween 20 Waschpuffer gewaschen und mit dem entsprechenden sekundären Antikörper Anti-IgG Maus Alkalische Phosphatase (Fa. Sigma, Verdünnung 1:25.000) oder Anti-IgG -Kaninchen Alkalische Phosphatase (Fa. Sigma, Verdünnung 1:20.000) verdünnt in Boehringer Blockierungspuffer für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in Tween 20 Waschpuffer gewaschen, kurz in Äquilibrierungs-lösung (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl_2) inkubiert und dann in die Reaktionslösung (100 μl 3% NBT (Fa. Roth) in 75% Dimethylformamid (Fa. Roth), 75 μl 2% BCIP (Fa. Roth) in 100% Dimethylformamid in 10 ml Äquilibrierungslösung) überführt. Der Nachweis erfolgte unter Lichtabschluß bis zum Sichtbarwerden der Banden. Die Nachweisreaktion wurde mit *A. bidest* abgestoppt und die Membran anschließend getrocknet. Alternativ erfolgte der Nachweis der Proteinbanden auf der Membran durch Verwendung eines „ECL Detection Kits“ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech wobei nach Angaben des Herstellers verfahren wurde.

2.2.2.5 Färbungen

2.2.2.5.1 Coomassiefärbung für SDS-PAGE

Nach der Proteintrennung wurden die Gele 20 Minuten in Färbelösung (50% (v/v) Methanol, 10% Eisessig (v/v), 0,2% Serva Blau (w/v) G, Fa. Roth), und anschließend für mehrere Stunden in Entfärber (10% (v/v) Eisessig, 25% (v/v) Methanol) inkubiert. Die Entfärberlösung wurde mehrmals erneuert bis der Hintergrund farblos war. Zur Aufbewahrung der Gele diente 1% Essigsäure (Fa. Roth). Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler durchgeführt.

2.2.2.5.2 Färbung von PVDF-Membranen

Nachdem Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt und mittels eines "Semi-Dry-Blotters" auf die PVDF-Membran transferiert wurden, konnten die Proteine mit einer Ponceau S-Lösung (0,2% Ponceau S in 3% TCA, Fa. Serva) reversibel angefärbt werden. Dadurch erfolgte

gleichzeitig eine Fixierung der Proteine an die Membran. Die Membran wurde durch mehrmaliges Waschen mit *A. bidest* entfärbt und wie unter 2.2.2.4 beschrieben inkubiert.

2.2.2.6 Immunisierung von Kaninchen

Für die Produktion von polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen wie folgt immunisiert. Das Antigen wurde mit sterilem PBS auf eine Proteinkonzentration von 0,5 mg/ml verdünnt und für die Immunisierung in Adjuvans durch 5minütiges Mischen emulgiert. Für die ersten beiden Immunisierungen, die im Abstand von 14 Tagen erfolgten, wurde komplettes Adjuvans (ABM-ZK, Fa. Linaris), für die letzten beiden Immunisierungen, nach 28 und 56 Tagen, inkomplettes Adjuvans (ABM-N, Fa. Linaris) verwendet. Pro Immunisierung wurden 1 ml Antigen/Adjuvans-Emulsion injiziert. Nach 34 und 62 Tagen erfolgte jeweils eine Testblutung aus der Ohrvene. Das Kaninchen wurde 80 Tage nach der ersten Immunisierung mit Ketamin betäubt und durch Herzpunktion ausgeblutet. Der Immunisierungsverlauf wurde durch Western Blot Analysen mit dem Präimmun-serum und den Sera der 1. und 2. Testblutung überwacht und dokumentiert.

2.2.2.7 Aufreinigung von Antiseren

Die Aufreinigung von Antiseren erfolgte an Protein-A-Agarose-Säulen (Fa. Biorad) oder mit HiTrap-Säulen der Fa. Amersham Pharmacia Biotech nach Angaben des Herstellers.

2.2.2.7.1 Aufreinigung von Antiserums an Protein A Agarose

Das polyklonale Antiserums AX4 wurde an Protein-A-Agarosebeads aufgereinigt. Bei der Immunisierung eines Kaninchens zur Antikörperproduktion werden vor allem Antikörper der Klassen IgG_{2a} und IgG_{2b} gebildet. Diese binden spezifisch an Protein-A, immobilisiert an Agarose-beads. Weitere vorhandene Antikörperklassen wie IgG₃ und IgG₁ werden nur mit einer sehr geringen Affinität gebunden. Nach dem Packen der Säule mit Protein-A-Beads wurde die Antikörperlösung durch Zugabe von 1/10 Volumen 1,0 M Tris-HCl pH 8,0 auf einen pH von 8,0 eingestellt und auf die Säule gegeben (2 ml Volumen). Unter Niedrigsalzbedingungen binden die gesuchten Antikörperklassen aus dem Antiserum mit hoher Affinität an Protein A. Eine Säule mit einem Volumen von 1-2 ml bindet ca. 20-40 mg Protein. Nach der Bindung der IgG's an die Säule wurde diese zweimal mit 10 Säulenvolumen 100 mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Anschließend folgte die Elution der IgG's von der Säule mit 100 mM Glycin pH 3,0 (jeweils 500 µl). Das Eluat wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen, die 50µl 1 M Tris pH 8,0 enthielten, um den pH-Wert zu neutralisieren. Die Mengenbestimmung an Protein bzw. IgG's erfolgte photometrisch durch eine Absorbionsmessung bei 280 nm. Eine Absorbtion von 1 bei OD₂₈₀ entspricht einer Proteinmenge von 0,75 mg/ml (Harlow und Lane, 1988). Die Proben mit den höchsten Proteinkonzentrationen wurden vereinigt, und die Säule mit einer Lösung mit 1 M Harnstoff, 1 M LiCl und 100 mM Glycin (pH 2,5) gewaschen und bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2.7.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Das polyklonale Anti-Flightless Antiserums wurde über Affinitätschromatographie an HiTrap-Säulen am Antigen aufgereinigt. Für die Kopplung des Antigens an die Säule wurden 1-2 mg des Antigens über Nacht gegen 4 l Kopplungspuffer (0,2 M NaHCO₃, 0,5 M NaCl, pH 8,3) dialysiert. Nach der Dialyse ausgefallenes Protein wurde durch Zugabe von Dodecylsulfat-LiCl (0,25% Endkonzentration, Fa. Serva) und 10minütige Inkubation im Ultraschallbad in Lösung gebracht. Zur Kopplung des Antigens wurde die Säule zunächst dreimal mit 2 ml eiskalter 1 mM HCl (Fa. Roth) gewaschen. Anschließend wurde die Liganden-Lösung geladen und die Säule für 30 Minuten bei 25°C inkubiert. Danach wurde die Säule dreimal mit 2 ml Waschpuffer A (0,5 M Ethanolamin (Fa. Serva), 0,5 M NaCl, pH 8,3), dreimal mit 2 ml Waschpuffer B (0,1 M Na-Acetat (Fa. Roth), 0,5 M NaCl, pH 4), und dreimal mit 2 ml Waschpuffer A gewaschen. Nach einer 30minütigen Inkubation der Säule bei 25°C wurde diese nochmals dreimal mit 2 ml Waschpuffer B, dreimal 2 ml Waschpuffer A und mit dreimal 2 ml Waschpuffer B gewaschen. Nach Durchlauf von 2 ml Lagerungspuffer (0,05 M NaHPO₄, 0,1% NaN₃, pH 7) wurde die Säule bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Vor Aufreinigung des Antiserums wurde die mit dem Antigen gekoppelte Säule dreimal mit 2 ml 100 mM Glycin-HCl pH 2,7 (Fa. Roth) und dreimal mit 2 ml 75 mM Tris-HCl pH 8,0 gewaschen. Das Antiserum wurde 1:1 mit 150 mM Tris-HCl pH 8,0 auf eine Endkonzentration von 75 mM Tris-HCl pH 8,0 verdünnt und auf die Säule geladen. Der Durchlauf wurde aufgefangen und nochmals auf die Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Säule mit 75 mM Tris-HCl gewaschen, bis die OD_{280nm} des Durchlaufs kleiner war als 0,01. Die Elution des affinitätsgekoppelten Antikörpers erfolgte mit 100 mM Glycin-HCl pH 2,7 in 1 ml Fraktionen wobei die Elutionsfraktionen sofort durch Zugabe von 100 µl 1 M Tris-HCl pH 8 neutralisiert wurden. Der Verlauf der Antikörper-Elution wurde durch Messung der OD_{280nm} verfolgt. Bei einem Wert kleiner als 0,015 wurde die Elution beendet, die Säule mit 2 ml Lagerungspuffer gewaschen und bei 4°C aufbewahrt. Die einzelnen Fraktionen der Elution wurden zur Lagerung mit 0,1% NaN₃ versetzt und bei 4°C bzw. -80°C aufbewahrt.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 Fällung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren wurden unter Verwendung eines Protokolls nach Sambrook et al. (1989) in Anwesenheit monovalenter Kationen mit Alkohol gefällt. In *A. bidest* oder TE-Puffer gelöste DNA wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M-Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) zunächst mit Salzen angereichert, und anschließend mit zwei Volumina 98%igem-Ethanol bei -80°C für mindestens zwei Stunden oder über Nacht gefällt. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 20.000 g und 4°C zur Pelletierung der DNA. Nach dem Entfernen des Überstandes wurde das

Nuklein-säurepellet mit 70%igem Ethanol nochmals gewaschen, anschließend luftgetrocknet und in *A. bidest* oder TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3.2 Entfernung von Proteinresten aus Nukleinsäure-Lösungen

Für manche Fragestellungen war eine zusätzliche Reinigung der Plasmid-DNA notwendig. Um Proteine und störende Salze zu entfernen, erfolgte die Zugabe von einem Volumen Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (1:1:1). Anschließend wurde die Lösung geschüttelt, zentrifugiert (20 000 g, 4°C), und die obere wässrige Phase mit der DNA abgenommen. Die obere wässrige Phase mit den Nukleinsäuren wurde anschließend in eine neues Reaktionsgefäß überführt, und die DNA gefällt um die organischen Lösungsmittel vollständig zu entfernen.

2.2.3.3 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde durch Messung der Absorbtion bei 260 nm in Quarzküvetten mit einem Spektralphotometer der Fa. Biorad photometrisch bestimmt. Eine OD_{260nm} von 1,0 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger oder 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} gibt den Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung an: für reine DNA liegt es bei 1,8, für reine RNA bei 2,0. Für eine photometrische Messung wurde die DNA bzw. RNA-Lösung 1:400-fach verdünnt. Die Konzentration einer DNA- oder RNA-Lösung wurde dann wie folgt berechnet:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Umrechnungsfaktor} = \text{Nukleinsäurekonzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

2.2.3.4 Auftrennung der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese (nach Sambrook et al., 1989) in einer Flachbett-Elektrophoresekammer der Fa. Amersham Pharmacia Biotech. Die DNA-Fragmente wurden je nach ihrer Größe in 0,75-2% Agarosegelen mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid (Fa. Roth) in analytischem oder präparativem Maßstab aufgetrennt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, pH 7,5) angesetzt, und durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle gelöst. Zur flüssigen Agarose wurde vor dem Gießen des Gels 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden mit 1/6 Auftragepuffer versetzt, und als Eichmarker wurde die 1 kb Plus DNA-Leiter (Fa. Gibco BRL) aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (60 Volt) für 1-2 Stunden durchgeführt. Die Nukleinsäurebanden wurden im Anschluß an den Gellauf auf einem UV-Transilluminator (254 nm) visualisiert, und mit einer Polaroid Sofortbildkamera (Fa. Kodak) dokumentiert.

2.2.3.5 Auftrennung von RNA durch Agarose-Gelelektrophorese

RNA-Moleküle wurden in einem 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt. Zur Herstellung des Gels wurden 500 mg Agarose in 43,5 ml DEPC-behandeltem Wasser und 5 ml 10fach MOPS-Puffer (0,2 M MOPS (Fa. Roth) pH 7, 80 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA, pH 8,0, DEPC-behandelt) aufgekocht und auf 65°C abgekühlt. Nach Zugabe von 2,6 ml 37% Formaldehydlösung (Fa. Roth) wurde das Gel in eine Flachbett-Elektrophoresekammer gegossen. Das Gel wurde über Nacht bei 4°C zur vollständigen Polymerisation aufbewahrt. 1-3 µl der isolierten RNA bzw. mRNA wurden mit 15 µl Probenpuffer (50% Formamid, 6% Formaldehyd, 6% Glycerin, 2 Tropfen einer 0,5% Bromphenolblaulösung in 1fach MOPS) und 1 µl Ethidiumbromidlösung (1µg/µl) versetzt, 15 Minuten bei 65°C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Als Eichmarker wurden 3 µl einer RNA-Leiter (Fa. Gibco BRL) eingesetzt, die vor dem Auftragen wie die Proben behandelt wurde. Die Elektrophorese erfolgte für 2-3 Stunden bei konstant 40 Volt in 1fach MOPS-Puffer.

2.2.3.6 Plasmid-DNA Präparation durch alkalische Lyse

Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte durch "alkalische Lyse". Dabei wurden 2 ml einer Übernachtskultur von einer Kolonie, gewachsen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 30°C, abzentrifugiert (14.000 g, 4°C für 30 Sekunden). Das Bakterienpellet wurde dann anschließend in 100 µl Lösung 1 (50 mM Glucose (Fa. Roth), 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0) resuspendiert und die Bakterienzellen durch Zugabe von 200 µl der frisch angesetzten Lösung 2 (0,2 N NaOH (Fa. Roth), 1% SDS) für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Dabei wurden Proteine und genomische DNA ausgefällt. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 100 µl eiskalter Lösung 3 (2 M Kaliumacetat (Fa. Roth), 5 M Eisessig (Fa. Roth)) und Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Nach der Zentrifugation (14.000 g für 10 Minuten bei 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe von zwei Volumen absolutem Ethanol (Fa. Roth) für 30 Minuten bei -80°C ausgefällt. Durch Zentrifugation (14.000 g, 4°C für 10 Minuten) wurde die ausgefällte DNA pelletiert, zweimal in 500 µl 75%igem Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur 30 Minuten getrocknet und in 20-50 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M EDTA) aufgenommen. Die DNA wurde dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

Plasmid-DNA, die in Sequenzierungsreaktionen eingesetzt wurde, mußte von großer Reinheit sein. Diese wurde mit dem „Qiaprep-spin Plasmid Kit“ (Fa. Qiagen) oder dem Plasmid Isolierungskit der Fa. Roche präpariert. Bei dieser DNA-Präparation handelt es sich ebenfalls um eine alkalische Lyse, mit anschließender Reinigung über eine Säule. Die DNA bindet an die Säule, wird durch mehrere Waschschrte von Salzen und Proteinen gereinigt und anschließend mit

einem geeigneten Volumen an TE-Puffer oder Wasser von der Säule eluiert. Dabei wurde jeweils nach den Angaben der Hersteller verfahren.

2.2.3.7 Isolierung von Gesamt RNA

Ausgangsmaterial für RNA-Präparationen waren verschiedene Gewebe der Ratte: Retina, Testis, Skelett- und Herzmuskel, Milz, Leber und Niere. Die Gewebe wurden nach der Präparation in flüssigem Stickstoff bei ca. -165°C schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. 50-100 mg Gewebe wurden mit 1 ml TrizolTM-Reagenz (Fa. Gibco BRL), einer Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat zur Gesamt-RNA-Isolierung versetzt und mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel) homogenisiert. Nach Freisetzung der RNA aus dem Gewebe wurden die Proben mit 200 μl Chloroform pro 1 ml TrizolTM-Reagenz versetzt, wodurch die RNA in die wässrige obere Phase überführt wurde. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 500 μl Isopropanol pro 1 ml TrizolTM-Reagenz und Inkubation für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach der Zentrifugation (10 Minuten, 12.000 g, 4°C) wurde das Pellet in 75% Ethanol gewaschen, die RNA getrocknet und in 50 μl *A. bidest* mit 0,5 μl RNAGuard (33,6U/ μl , Fa. Gibco BRL) resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt. 1 U RNAGuard inhibiert 5 ng RNase zu 50%.

2.2.3.8 Isolierung von mRNA

mRNA verschiedener Gewebe wurde mit dem „FastTrackTM 2.0 Kit“ Version D der Fa. Invitrogen isoliert. Dabei wurde 1 g frisches oder in flüssigem Stickstoff schockgefrorenes Gewebe in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen (Fa. Greiner) gegeben, 15 ml FastTrackTM Lysis Puffer zugegeben und mit einem Ultra-Turrax (Fa. Janke und Kunkel) homogenisiert. Das Homogenisat wurde 60 Minuten bei 45°C und nach Zugabe von 5 M NaCl zu einer Endkonzentration von 0,5 M wurde die Lösung mehrmals durch eine Spritze mit einer Kanüle (0,18 μm Durchmesser) gedrückt. Anschließend folgte die Zugabe von einer Einheit „oligodT Cellulose“ und der Ansatz wurde zwei Minuten unter Schwenken des Falcon Röhrchens inkubiert. Dann folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 1 Stunde. Durch Zentrifugation (3000 g, 5 Minuten bei Raumtemperatur) wurde die Cellulose mit gebundener mRNA pelletiert und der Überstand verworfen. Die oligodT Cellulose wurde in 20 ml „Binding Buffer“ resuspendiert, erneut zentrifugiert (3000 g, 5 Minuten, RT), nochmals in 10 ml „Binding Buffer“ gewaschen und wieder sedimentiert. Danach wurde die oligodT Cellulose viermal in 10 ml „Low Salt Buffer“ gewaschen um SDS und störende RNA zu entfernen. Nach resuspendieren der oligodT Cellulose in 800 μl „Low Salt Buffer“ wurde die Suspension nach und nach auf eine Säule überführt und zentrifugiert (5000 g, RT). Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 500 μl „Low Salt Buffer“ wurde der Durchlauf aufgefangen und eine photometrische Messung bei $\text{OD}_{260\text{nm}}$ durchgeführt. Vor Elution der mRNA von der oligodT Cellulose wurde die

Säule in ein neues steriles Zentrifugationsröhrchen überführt, 200 ml Elutionspuffer (10 mM Tris HCl pH 7,5) zugegeben, 30 Sekunden zentrifugiert und dies wiederholt. Die mRNA wurde durch Zugabe von 1,5 Volumen Na-Acetat und 2,5 Volumen 100% Ethanol gefällt, die Lösung dann auf Trockeneis gefroren, aufgetaut und erneut zentrifugiert (16.000 g, 15 Minuten, 4°C). Das getrocknete mRNA Pellet wurde in 20-50 µl Elutionspuffer resuspendiert oder bei -80°C gelagert. Die Menge an isolierter mRNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

2.2.3.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

In Agarose befindliche DNA kann zu präparativen Zwecken mit Hilfe von Glasmilch isoliert werden, da DNA unter Hochsalzbedingungen an Glas bindet. Bei Verminderung der Salzkonzentration kann die DNA durch Zugabe von *A. bidest* von der Glasmilch eluiert werden. Alternativ wurde die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel Elutions Kits der Fa. Qiagen aus der Agarose eluiert.

2.2.3.9.1 Glasmilchelution

Nach Auftrennung der DNA in einem präparativen Agarosegel wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mit einer Rasierklinge aus dem Gel ausgeschnitten, entsprechend ihres Gewichtes mit der 2,5-fachen Menge an 6 M NaJ-Lösung (1 g Gel=2,5 ml NaJ) versetzt, und bei 55°C inkubiert bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach Zugabe von 5 µl Glasmilch (Fa. Dianova) für maximal 5 µg zu eluierende DNA wurde der Ansatz mindestens fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, fünf Sekunden zentrifugiert (15.800 g) und das Glasmilchpellet dreimal mit "New-Wash"-Lösung (50% Ethanol, 1 mM Tris-HCl pH 7,4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, Fa. Dianova) gewaschen. Die Elution der DNA von der Glasmilch erfolgte durch Resuspendieren des Pellets in 4-5 µl *A. bidest* und anschließend dreiminütiger Inkubation bei 50°C. Die Glasmilch wurde sedimentiert (30 Sekunden, 15.000 g, RT), und der DNA-haltige Überstand in ein frisches Gefäß überführt. Dieser Vorgang wurde nochmals mit 4-5 µl *A. bidest* wiederholt, die Überstände der beiden Elutionsschritte vereinigt und zur vollständigen Entfernung der Glasmilch nochmals zentrifugiert.

2.2.3.9.2 Gelelution mit dem "QIAquick Gel Extraction Kit"

Alternativ wurde die DNA unter Verwendung des QIAquick Gel Elutions Kits (Fa. Qiagen) aus der Agarose eluiert. Dabei wurde zu Beginn wie bei der Glasmilchelution verfahren. Nach Ausschneiden der DNA-Bande wurde diese in ein Reaktionsgefäß überführt, ihr Gewicht bestimmt und diese mit dem 3-fachen Volumen an Puffer QG versetzt. Durch 10minütige Inkubation bei 55°C löste sich die Agarose auf und nach Zugabe von einem Volumen Isopropanol (2-Propanol, Fa. Roth) wurde die Lösung auf eine Säule geladen und zentrifugiert (30 Sekunden, 15.800 g, 4°C) wobei eine Bindung der DNA an das Säulenmaterial erfolgte. Nach

dem Waschen der Säule mit 500 µl der Puffers QG und 750 µl des Puffers PE wurde die DNA mit 30-50 µl Elutionspuffer (Puffer EB, 10 mM Tris, pH 8,5) von der Säule eluiert und durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 15.800 g in einem neuen Reaktionsgefäß aufgenommen. Daran anschließend folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung in einem 0,8% Agarosegel um die DNA-Ausbeute zu bestimmen.

2.2.3.10 Dephosphorylierung von DNA

Wurde ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym linearisiert war es notwendig, diesen mit einer Alkalischen Phosphatase (Fa. Gibco BRL) zu dephosphorylieren um bei einer Klonierung eine Re-Ligation des Vektors ohne DNA-Insert zu verhindern. In einem 100 µl Ansatz wurden 1 µg linearisierter Vektor mit 20 µl eines 5X Dephosphorylierungspuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂, 50% Glycerin) und 5 µl des Enzyms Alkalische Phosphatase gemischt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Bei Dephosphoylierung von Vektoren mit glatten Enden („blunt ends“) erfolgte eine Inkubation bei 50°C für eine Stunde. Anschließend wurde die Reaktion durch 10minütige Inkubation bei 75°C gestoppt und ein Volumen Phenol (Fa. Roth) zugegeben. Nach Mischen und Zentrifugation (10 Minuten bei 15.800 g, RT) folgte eine Phasentrennung in dem Lösungsgemisch wobei die obere wässrige Phase die dephosphorylierte DNA enthielt. Diese Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen Chloroform (Fa. Roth) versetzt. Nochmaliges Mischen und Zentrifugation (15.800 g, 10 Minuten, RT) führte zu einer Phasentrennung und die obere, wässrige Phase mit DNA wurde erneut in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und drei Volumen absolutem Ethanol wurde die DNA eine Stunde bei -80°C gefällt, zentrifugiert (20 Minuten, 15.800 g, 4°C) und das DNA-Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 25-50 µl TE-Puffer aufgenommen. Danach wurde die Vektor-DNA in einem Ligationsansatz eingesetzt.

2.2.3.11 Modifikation von kohäsiven Enden von DNA-Fragmenten

Waren keine geeigneten Schnittstellen zur Klonierung vorhanden, dann erfolgte eine Klonierung über glatte Enden. Dabei wurden die kohäsive Enden am zu klonierenden DNA-Fragment durch eine T4 Kinase (Fa. Gibco BRL) phosphoryliert und durch das Klenow-Enzym (Fa. Gibco BRL) mit den entsprechenden dNTP's aufgefüllt. Ein Reaktionsansatz von 100 µl enthielt 25 µl DNA (ca. 1 µg), 20 µl eines "Forward exchange Buffer" (350 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 500 mM KCl, 5 mM 2-Mercaptoethanol), 10 µl ATP (10 mM, Gibco BRL), 2 µl dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 1,25 µl T4-Kinase und 2 µl Klenow-Enzym, der Ansatz wurde gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat pH 7,5 und 3 Volumen absolutem Ethanol für 30-60

Minuten in -80°C gefällt. Nach 20minütiger Zentrifugation (15.800 g, 4°C) wurde das DNA-Pellet zweimal mit 75% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 20-30 μl TE-Puffer resuspendiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.3.12 Sequenzspezifische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Für Restriktionsverdau von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen der Firmen Roche Diagnostics, Gibco BRL Life Technologies und AGS verwendet. Bis zu $1\mu\text{g}$ DNA wurde in 10 μl Ansätzen verdaut, präparative Ansätze wurden in 50-200 μl Volumen durchgeführt. Die Menge des eingesetzten Restriktionsenzym richtet sich nach der DNA-Menge und der Aktivität des Enzyms (eine Enzymeinheit (U) ist die Menge an Enzym, die $1\mu\text{g}$ DNA in einer Stunde spaltet). Das Restriktionsenzym wurde in einem 3- bis 5-fachen Überschuß zugegeben. Für einen 10 μl Ansatz wurden ca. 1 μg Plasmid-DNA mit 0,3-0,5 μl Restriktionsenzym (8-10 U/ μl) im vom Hersteller mitgelieferten Puffer bei 37°C für 1-2 Stunden gespalten. Für größere Ansätze wurden die Komponenten entsprechend hochskaliert. Die Vollständigkeit des Verdau wurde durch Auftrennung der cDNA-Fragmente in einem 0,8% oder 1% Agarosegel getestet. Bei einem Doppelverdau mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen konnte der Verdau in einem Ansatz erfolgen, wenn beide Enzyme die gleichen Salzbedingungen im Puffer benötigten. War dies nicht möglich, so erfolgte in einem 50 μl Ansatz zuerst ein Restriktionsverdau mit dem ersten Enzym unter optimalen Pufferbedingungen, dann wurde die Vollständigkeit des Verdau (Linearisierung der Plasmid-DNA) auf einem Agarosegel geprüft und anschließend die DNA durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (Fa. Roth) pH 5,2 und 2,5 Volumen absoluten Ethanol für 30 Minuten bei -80°C gefällt. Nach einer 20minütigen Zentrifugation bei 15.800 g und 4°C wurde das DNA-Pellet zweimal in 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem Probenvolumen von 50 μl mit 5 μl Restriktionspuffer und 3 μl des zweiten Restriktionsenzym (10U/ μl) aufgenommen und nochmals 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

2.2.3.13 Kultivierung von *E. coli* Bakterien

E. coli-Bakterien wurden nach Sambrook et al. (1989) in Flüssigmedien oder auf Agarplatten kultiviert. Die verwendeten Bakterienstämme verfügen über Resistenz gegenüber Antibiotika, so daß die Reinheit der Bakterienstämme durch Zusatz entsprechender Antibiotika zu den Medien gewährleistet wurde (Tab. 6 und 7). Enthielten die Bakterien Plasmide, so richtete sich das zur Selektion verwendete Antibiotikum nach dem Resistenzgen des Plasmids. *E. coli*-Bakterien wurden vor Gebrauch aus Bakterien-Dauerkulturen oder von einer Stammpatte mit Hilfe einer sterilen Impföse auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37°C in einem Inkubator über Nacht kultiviert. Bei Bakterien-Flüssigkulturen wurde eine einzelne Kolonie von einer Bakterien-Stammpatte mit einer sterilen Spitze in ein steriles Kulturröhrchen oder Erlmeyerkolben mit Selektionsmedium übertragen. Die Kultivierung

erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 37°C. Das Wachstum der Bakterienkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm bestimmt. Bakteriendauerkulturen wurden in Form von Glycerinstabs angelegt. Dabei wurde eine einzelne Kolonie von einer Bakterien-Stammplatte in 5 ml Selektionsmedium über Nacht bis zu einer OD₆₀₀ > 1 kultiviert und 800 µl der Kultur zusammen mit 200 µl Glycerin in ein steriles Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C eingefroren und gelagert.

<i>E. coli</i> Stamm	Lieferant	Selektionsmedien	Verwendung
XL1-Blue MRF ⁺	Fa. Stratagene	LB mit 12,5µg/ml Tetracyclin	cDNA-Banken, Transformation
SOLR	Fa. Stratagene	LB mit 50µg/ml Kanamycin	cDNA-Banken
BL21	Fa. APB	LB	GST-Expressionssystem

Tabelle 6: Verwendete *E. coli*-Bakterien und geeignete Selektionsmedien.

Die Bakterien wurden in der Regel in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agarplatten mit zugesetztem Antibiotikum kultiviert.

Vektoren	Lieferant	Amplifikation in.....	Selektionsmedien
pBluescript SK(-)	Fa. Stratagene	XL1-Blue MRF ⁺	LB mit 75µg/ml Amp.
pGEX-KG	-	XL1-Blue MRF ⁺	LB mit 75µg/ml Amp.
pGEX-2T	Fa. Amersham Pharmacia Biotech	BL21	2X YT mit 75µg/ml Amp.
pGEX-1	Fa. Amersham Pharmacia Biotech	BL21	2X YT mit 75µg/ml Amp.
pGEX-3	Fa. Amersham Pharmacia Biotech	BL21	2X YT mit 75µg/ml Amp.
ZAP II-Vektor	Fa. Stratagene	XL1-Blue MRF ⁺	-
ExAssist	Fa. Stratagene	XL1-Blue MRF ⁺	-

Tabelle 7: Klonierungsvektoren und Helferphagen.

Die angegebenen Antibiotika entsprechen den Resistenzgenen der jeweiligen Plasmide. Zur Amplifikation der Vektoren wurden die entsprechenden Bakterien mit den Plasmiden transformiert, oder mit den Bakteriophagen transfiziert. Die Plasmidvektoren tragen Antibiotikaresistenzen und der Zusatz der korrespondierenden Antibiotika zum Kulturmedium ermöglichte die Selektion für transformierte Bakterien. Amp.: Ampicillin.

2.2.3.14 Präparation und Transformation kompetenter *E. coli* XL1 blue MRF⁺ und BL21

E. coli Zellen werden durch Behandlung mit CaCl₂ zur Aufnahme von DNA befähigt (kompetente Zellen). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 15 ml LB-Medium mit 500 µl einer *E. coli* XL1-Kultur angeimpft und bei 37°C im Schüttler bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von ca. 0,6 inkubiert. Nach 10minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterienzellen sedimentiert (1000 g, 4°C, 10 Minuten) und das Bakterienpellet in 5 ml eiskalter steriler 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Nach 30minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut durch Zentrifugation pelletiert, in 1 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und mindestens zwei Stunden auf Eis inkubiert, wobei deren Kompetenz innerhalb der nächsten 24 Stunden um den Faktor 2 zunahm. Bei der Transformation wurden 200 µl kompetente Zellen in vorgekühlte

Reaktionsgefäße überführt, und mit der zu transformierenden DNA versetzt. Bei Transformation von Ligationsansätzen wurden diese zunächst 1:5 in TE-Puffer verdünnt und anschließend die Hälfte davon eingesetzt. Als positive Kontrolle wurden 1 ng ungeschnittener Vektor und als Negativkontrolle *A. bidest* transformiert. Nach 30minütiger Inkubation der Ansätze auf Eis wurden die Proben für exakt 90 Sekunden in einen auf 42°C temperierten Wärmeblock gestellt und anschließend für 1-2 Minuten auf Eis abgekühlt. Der Hitzeschock von 42°C führte dazu, daß die an die Zellwände adsorbierte DNA von der Zelle aufgenommen wurde. Jeder Ansatz wurde anschließend mit 800 µl LB-Medium mit 25 mM Glucose (Fa. Roth) versetzt und 45-60 Minuten in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Während dieser Zeit konnten sich die Zellen regenerieren, und die Ampicillinresistenz exprimieren. Die Transformationsansätze wurden auf LB-Platten mit 75 µg/ml Ampicillin ausplattiert, indem von jedem Ansatz zunächst 100 µl ausplattiert. Der restliche Transformationsansatz wurde bei 2000 g für fünf Minuten zentrifugiert, ein Teil des Überstandes verworfen und das Pellet in geringem Volumen resuspendiert und ausplattiert wurde. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Morgen auf Kolonien geprüft.

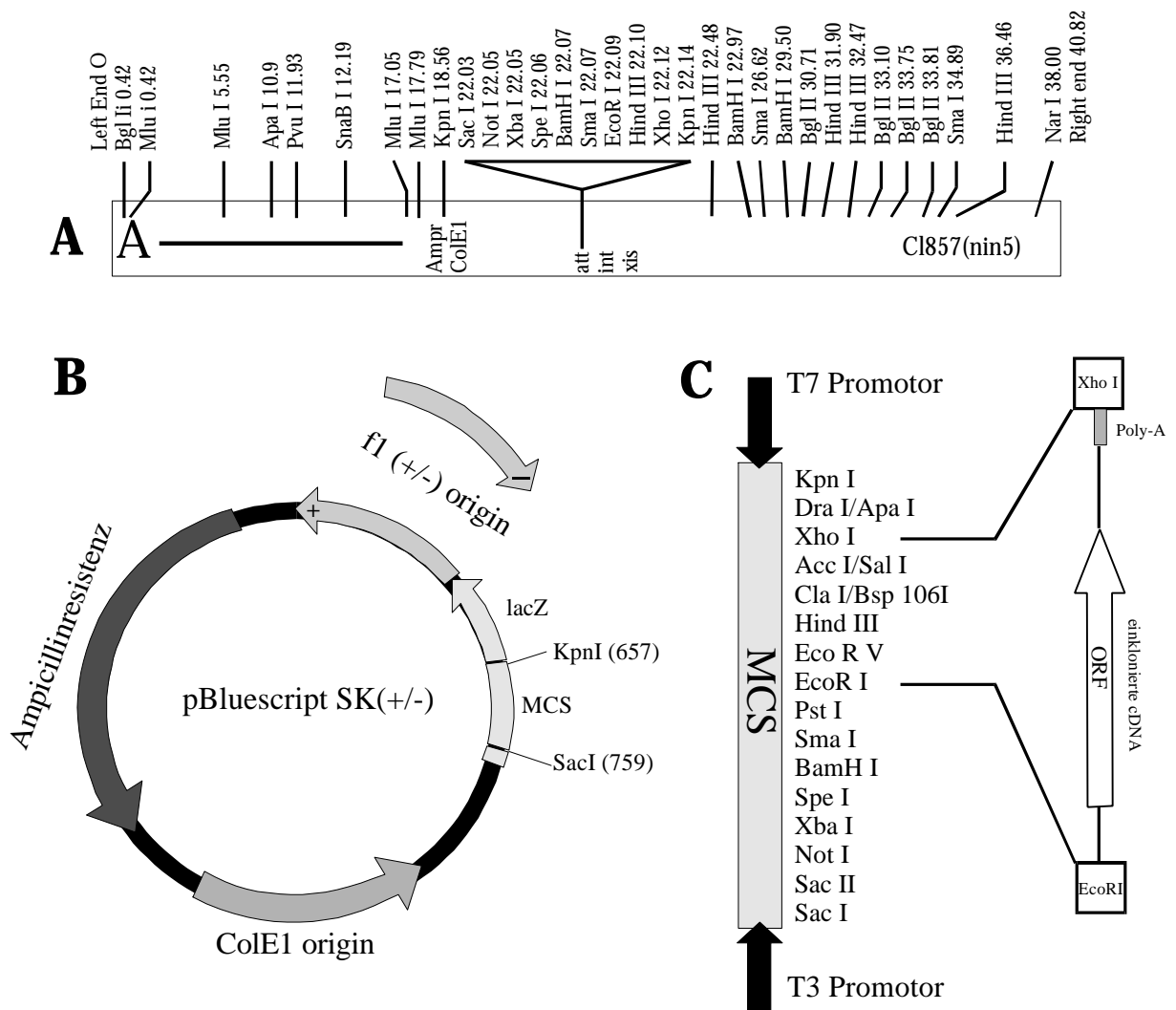
2.2.3.15 Ligation von DNA-Fragmenten

Um ein cDNA-Fragment in einen Vektor zu klonieren, wurden beide Moleküle zuerst mit dem gleichen Restriktionsenzym/en verdaut, um an beiden Molekülen die gleichen Überhänge zu erzeugen. Bei Bedarf wurde der Vektor dephosphoryliert, oder die kohäsiven Enden des cDNA-Inserts modifiziert. Für Ligationsansätze wurde die T4-DNA-Ligase (Fa. Gibco BRL) verwendet und das molare Verhältnis cDNA-Fragment zu Vektor im Ansatz berücksichtigt (2:1 bis 3:1). Für die Ligation von cDNA-Fragmenten und Vektoren mit kohäsiven Enden wurden 100 ng Vektor und die entsprechende Menge an cDNA-Fragment in einem Probenvolumen von 20 µl mit 3 µl 5fach T4-DNA-Ligasepuffer (250 mM Tris-HCl pH 7,6, 50 mM MgCl₂, 5 mM ATP, 5 mM DTT) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl) versetzt und bei RT inkubiert. Bei Klonierungen von cDNA-Inserts mit glatten Enden war ein Enzymmenge von 2-3 µl T4-DNA-Ligase und eine Inkubation bei 14°C für 16 bis 24 Stunden notwendig. Der Ligationsansatz wurde entweder bei -20°C aufbewahrt, oder sofort in *E. coli* transformiert.

2.2.3.16 Durchmusterung von cDNA-Banken

cDNA-Banken sind Genbibliotheken, die aus einer Sammlung von klonierten DNA-Fragmenten in Lambdaphagen-Vektoren (Uni-Zap XR Vektor) bestehen. Die cDNA-Banken sind so konstruiert, daß das Plasmid pBluescript SK(-) in den Lambdaphagen-Vektor integriert ist, und die cDNA-Fragmente wiederum in der multiple Klonierungsstelle (Polylinker) des pBluescript-Plasmid inkloniert sind. Die Plasmidsequenz wird auf der einen Seite von der Replikations-

Initiationssequenz, und auf der anderen Seite von der Replikations-Terminationssequenz des ϕ 1-Phagen flankiert (Abb. 6). In einem einfachen *in vivo* Ansatz kann der pBluescript-Vektor mit cDNA-Insert aus dem λ -ZAP-Klon herausgeschnitten werden. Bei den verwendeten cDNA-Banken handelt es sich um folgende oligodT-geprimte Genbibliotheken: λ Zap II Express cDNA-Bank (Rattenretina cDNA-Bank), λ -Zap II cDNA-Bank (Ratten Testis cDNA-Bank), Mausretina Uni-Zap cDNA-Bank. Die cDNA wurde jeweils in die EcoRI und XhoI-Schnittstellen kloniert und kann *in vivo* im pBluescript Phagemid ausgeschleust werden. Das pBluescript Phagemid verfügt über 21 Klonierungsstellen im Polylinker, dieser ist wiederum von T3 und T7 Promotoren flankiert. Das Phagemid verfügt zusätzlich über ein Bakteriophagen ϕ 1 Startkodon zur Replikation der DNA. Bei der Expressions-cDNA-Bank kann der *lacZ* Promotor zur Expression der Fusionsproteins genutzt werden. cDNA-Expressionsbanken können mit einem Antikörper durchmustert werden (Immunoscreening), oder alternativ mit einer radioaktiv oder digoxigenin-markierten cDNA-Sonde.



vorige Seite:**Abb. 6:** λ -Zap cDNA-Banken

A: Der vom Bakteriophagen Lambda abgeleitete Vektor Uni-ZAP XR Klonierungsvektor enthält in der zentralen Region seines Genoms das linearisierte Plasmid pBluescript SK(-). In den Polylinker des integrierten Plasmids wurde die cDNA inkloniert. **B:** Das Plasmid pBluescript kann *in vivo* durch eine Ausschleusung mit der inklonierten cDNA als ringförmiges Molekül aus dem Uni ZAP XR Vektor isoliert werden. Bei der pBluescript-Variante SK(-) ist das Replikationsorigin des f1-Phagen entgegen dem lacZ-Gen orientiert. **C:** Die cDNA wurde bei Herstellung der cDNA-Banken zwischen die *Xho* I und *Eco*R I Schnittstellen des Polylinkers inkloniert. Die Promotoren T3 bzw. T7 erlauben die *in vitro* Transkription von *sense* bzw. *anti sense*-RNA.

2.2.3.16.1 Immunoscreening

Das aufgereinigte polyklonale AX4-Antiserum wurde in einem Immunoscreening-Ansatz eingesetzt. Zuerst wurde in Western Blot Analysen die Reaktivität des Antiserums mit retinalen Proteinen getestet und die optimale Antikörperkonzentration bestimmt. Das AX4-Antiserum wurde in einer Verdünnung von 1:2500 eingesetzt, wodurch die Antikörper in der Lage sein sollten, 50-100 pg des Antigens zu erkennen, eine Menge die vergleichbar in Plaques und Kolonien vorhanden ist. Vor dem Immunoscreen wurde der aktuelle Titer der Rattenretina oligodT gepimten cDNA Expressionsbank bestimmt. Dabei wurden verschiedene Verdünnungen der cDNA Bank mit 200 μ l *E. coli* XL1 ($OD_{600nm} = 0,8$) in 10 mM $MgSO_4$ auf kleinen NZY-Platten mit 3 ml Top-Agarose auf einem Tariertisch ausplattiert. Das Wachstum der Plaques erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag konnten die Einzelplaques ausgezählt und der Titer bezogen auf die cDNA-Bank berechnet werden.

Beim Immunoscreen wurde 5 ml einer Übernachtskultur von *E. coli* XL1 in LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM $MgSO_4$ für 10 Minuten bei 1000 g abzentrifugiert und in 5 ml 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert, wobei die OD_{600nm} auf 0,6 bis 0,8 eingestellt wurde. Beim Primärscreen erfolgte das Plattieren auf großen Petrischalen (145 mm Durchmesser), und bei der Einzelplaque-isolierung auf kleinen Petrischalen (90 mm Durchmesser). Für die primäre Durchmusterung wurden die Phagen in SM-Puffer (100 mM NaCl, 8 mM $MgSO_4 \times 7 H_2O$, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 0,01% Gelatine) verdünnt, so daß pro Platte ca. 20 000 pfu (plaque forming units) zu erwarten waren. Für das Plattieren auf großen Platten wurden 600 μ l, für kleine Petrischalen 200 μ l Bakteriensuspension mit einer entsprechenden Phagenverdünnung gemischt und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 7,5 ml Top-Agarose für große und 3 ml Top-Agarose für kleine Petrischalen wurden die Bakterien auf bei 37°C vorgewärmte NZY-Platten gegossen. Die Platten wurden anschließend für 4-6 Stunden bei 42°C inkubiert, bis 1-2 mm große Plaques im Bakterien-rasen sichtbar waren.

Nitrocellulosefilter Hybond C (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) wurden in 10 mM IPTG Lösung getränkt, unter der Sterillbank 20 Minuten getrocknet und vorsichtig mit Hilfe von zwei Flachpinzetten auf die Oberfläche der NZY-Platten aufgelegt. Dann folgte eine Inkubation der Platten bei 37°C für 6-8 Stunden, oder über Nacht bei 30°C. Anschließend wurden die

Platten mit aufgelegtem Filter fünf Minuten bei -20°C inkubiert, um den Top-Agar zu härten und die Filter ohne Beschädigung des Top-Agars abzuziehen. Nach dreimaligem 10minütigen Waschen in TBS wurden die Filter zwei Stunden bei Raumtemperatur in TBS mit 3% BSA blockiert. Die Inkubation im AX4-Antiserum erfolgte über Nacht mit einer 1:2500-fachen Verdünnung in TBS mit 3% BSA auf einem Schüttler. Am nächsten Tag wurden die Filter dreimal 10 Minuten in TBS-T (TBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen und in einer 1:2500-fachen Verdünnung eines Alkalische Phosphatase gekoppelten Anti-Kaninchen Antikörpers (Fa. Sigma) in TBS-T für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen der Filter in TBS-T folgte eine kurze Inkubation in Lösung A (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , pH 9,5) und schließlich der Nachweis mit BCIP/NBT (2% BCIP in 70% Dimethylformamid, 3% NBT in 100% Dimethyl-formamid, Fa. Sigma) in Lösung A. Anschließend wurde die Reaktion mit *A. bidest* abgestoppt. Nach Zuordnung der positiven Signale zu Kolonien auf den NZY-Platte wurden diese mit einer sterilen Pipettenspitze aus dem Agar ausgestochen und, in 250 μl SM-Puffer mit 25 μl Chloroform aufgenommen. Die Phagen diffundierten über Nacht bei 4°C aus dem Top-Agar in den SM-Puffer. Anschließend folgte eine Einzelplaqueisolierung entsprechend dem Protokoll der primären Durchmusterung unter Verwendung von kleinen NZY-Platten und eine Einzelkolonie-Ausschleusung, um die Plasmide mit den cDNA-Fragmenten zu isolieren.

2.2.3.16.2 Durchmusterung einer cDNA-Bank mit einer DIG-markierten cDNA-Sonde

Alternativ wurden cDNA-Banken mit DIG-11-dUTP-markierten cDNA-Sonden durchgemustert, die an die DNA von Phagenplaques, die auf Hybond N-Membranen transferiert wurde, hybridisieren (Fa. Amersham Pharmacia Biotech). Zur Herstellung von DIG-markierten cDNA-Sonden wurde das Digoxigenin-Markierungssystem der Fa. Roche verwendet. Ausgangsmaterial waren 300 ng eines durch Restriktionsverdau isolierten cDNA-Inserts, das in einem Gesamtvolumen von 20 μl eingesetzt wurde. Um einzelsträngige DNA zu erhalten, wurde die cDNA zunächst 10 Minuten bei 95°C denaturiert, auf Trockeneis abgekühlt und 2 μl 10fach Hexanukleotidgemisch (62,5 $\text{OD}_{260\text{nm}}$ U/ml random Hexanukleotid, 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 , 1 mM DTE, 2 mg/ml Rinderserumalbumin, pH 7,2), 2 μl 10fach dNTP-Markierungsgemisch (1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 0,65 mM dTTP, 0,35 mM DIG-11-dUTP, pH 7,5) und 1 μl Klenow-Enzym (2 U/ μl) zugegeben und die Reaktion für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Zur Fällung der DNA wurden 2 μl 200 mM EDTA (pH 8,2), 2 μl 4 M LiCl und 60 μl Ethanol (99,8%, Fa. Roth) zugegeben und für 30 Minuten bei -80°C inkubiert. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 15.800 g wurde das Pellet getrocknet und in 50 μl TE-Puffer aufgenommen. Die Sonde wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

Die Effektivität der Sonde wurde getestet, indem verschiedene Verdünnungen dieser und einer im Kit vorhandenen DIG-markierten Kontroll-DNA hergestellt wurden. Jeweils 1 µl der Proben wurde auf einen Abschnitt Nylon-Membran (Hybond N, Fa. Amersham Pharmacia Biotech) aufgedotet, getrocknet und durch UV-Bestrahlung (0,45 J/cm²) die Sonden-DNA an die Membran gebunden. Nach einem kurzen Waschen in 1X Maleinsäurepuffer folgte eine Blockierung der Membran in 1facher Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer für 30 Minuten und Inkubation in einer 1:5000-fachen Verdünnung des Anti-DIG alkalische Phosphatasegekoppelten Antikörpers für 30 Minuten. Nach dreimaligem Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween 20 wurde die Membran in Alk-Phos Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl) gewaschen und durch Reaktion von 2% NBT in 70% Dimethylformamid (Nitroblau-Tetrazoliumsalz, Fa. Roth) und 3% BCIP in 100% Dimethylformamid (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat, Fa. Roth) entstand ein dunkler Niederschlag, anhand dessen die optimale Sondenkonzentration bestimmt werden konnte.

Die Durchmusterung der cDNA-Bank erfolgte zunächst wie beim Immunoscreen beschrieben (2.3.3.16.1). Wenn die Plaques eine Größe von ca. 1-2 mm hatten wurden die Platten eine Stunde bei 4°C gekühlt und Filterabzüge durch die Auflage von Hybond N-Membranen hergestellt. Dabei wurden die Membranen luftblasenfrei für 7 Minuten auf die Platten aufgelegt und die Phagen an die Membran adsorbiert. Nach dem Trocknen der Membranen wurden diese fünf Minuten in Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl), jeweils zwei und drei Minuten in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris-HCl pH 7,4, 1,5 M NaCl) neutralisiert und anschließend 30 Sekunden in 2X SSC (300 mM NaCl, 30 mM Na-Citrat, pH 7,4) gespült. Die Membranen wurde anschließend 30 Minuten getrocknet und die DNA durch UV-Bestrahlung (0,45 J/cm²) an die Membran gebunden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Membranen in Folie eingeschweißt und mit den Platten bei 4°C aufbewahrt.

Nach Prähybridisierung der Membranen in 5fach SSC, 1% Blockierungslösung (Fa. Boehringer), 0,02% SDS, 0,1% N-Laurylsarcosinat (Fa. Sigma) für 2 Stunden bei 68°C, folgte die Hybridisierung in der Sondenlösung über Nacht bei 68°C. Am nächsten Tag wurden die Membranen zunächst zweimal für 5 Minuten in 2fach SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur, dann zweimal 20 Minuten in 0,2fach SSC, 0,1% SDS bei 68°C unter Schütteln inkubiert. Nachdem die Membranen für 2-3 Minuten in Maleinsäurepuffer (150 mM NaCl, 100 mM Maleinsäure, pH 7,5) äquilibriert wurden, folgte eine Inkubation in 1% Blockierungslösung in Maleinsäurepuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Die Bindung der sekundären Anti-DIG alkalische Phosphatase gekoppelten Antikörper (Fa. Roche) erfolgte für 60 Minuten (1:20 000 in Blockierungslösung verdünnt). Nach dreimaligem 10minütigem Waschen in Maleinsäurepuffer mit 0,3% Tween 20 wurden die Membranen zwei Minuten in Alk-Phos Puffer (100 mM Tris-HCl pH 9,5, 100 mM NaCl) äquilibriert bevor sie für weitere fünf

Minuten in einem lumineszierenden Phosphatase Substrat (CDP^{Star}, Fa. Roche, 1:100 in Alk-Phos Puffer verdünnt) im Dunkeln inkubiert wurden. Die feuchten Membranen wurden eingeschweißt, in eine Autoradiographiekassette eingeklebt und ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT AR) aufgelegt. Nach einer Expositionszeit von 2-60 Sekunden wurden die Röntgenfilme entwickelt. Durch Vergleich der Fluorogramme mit den Phagen-Platten konnten positive Plaques identifiziert werden. Diese wurden dann mit einer sterilen Pipettenspitze aus der Top-Agarose ausgestochen und in 500 µl SM-Puffer mit 25 µl Chloroform aufgenommen. Die Phagen diffundierten über Nacht bei 4°C aus dem Agar in das Medium. Nach der primären Durchmusterung folgte auch hier eine Einzelplaqueisolierung und Ausschleusung der positiven Klone.

2.2.3.17 In vivo Ausschleusung von cDNA Klonen

λ-Zap cDNA-Genbibliotheken können relativ einfach durch Plaque-Lift-Screens und Isolierung der Plasmid-DNA analysiert werden. Eine im Phagenvektor λ-Zap klonierte cDNA-Sequenz kann durch die Helferphage *fl* zusammen mit einer flankierenden Phagemidvektorsequenz *in vivo* herausgeschnitten werden. Bei der *in vivo* Einzelkolonie-Ausschleusung wird die rekombinierte DNA in den λ-Phagen zusammen mit dem Helferphagen und wachsenden *E. coli*-Zellen gemischt. Die Phagen und Helferphagen befallen die *E. coli*-Zellen und vermehren sich in diesen. Ein Enzym des Helferphagen *fl* erkennt zwei Domänen (Initiator und Terminator), welche das Phagemid begrenzen. Das Phagemid und die enthaltene cDNA wird aus dem λ-Zap-Vektor herausgeschnitten, das Phagemid anschließend zirkularisiert und in den Helferphagen *fl* verpackt und von der Zelle sezerniert. Die in Helferphagen verpackten Moleküle befallen *E. coli*-Zellen und in Gegenwart geeigneter Antibiotika wachsen Bakterienkolonien, aus denen die rekombinierte DNA als Plasmid isoliert werden kann.

Zuerst erfolgte bei der Ausschleusung eine Ko-Infektion von *E. coli* XL1 mit dem durch Plaque-Hybridisierung isolierten Phagenklon und dem „ExAssist“-Helferphagen (Fa. Stratagene). Jeweils eine Übernachtskultur von *E. coli* XL1 MRF⁺ und SOLR, gewachsen in LB-Medium mit 0,2% Maltose und 10 mM MgSO₄ bei 30°C, wurden sedimentiert (1500 g, 4°C für 10 Minuten), in 5 ml 10 mM MgSO₄ resuspendiert und eine OD_{600nm} von etwa 0,8 eingestellt. Jeweils 200 µl *E. coli* XL1 MRF⁺ wurden mit 100 µl der Phagensuspension in SM-Puffer und 2 µl Helferphage gemischt, und anschließend 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2 ml LB-Medium wurden die Ansätze 4 Stunden bei 37°C geschüttelt. Nach 20minütiger Denaturierung der Proben bei 60-70°C wurden die Bakterien sedimentiert (20 Minuten, 1500 g, 4°C) und der Überstand mit dem ausgeschleusten pBluescript SK(-)-Phagemid abgenommen. 1 und 10 µl dieses Überstandes wurden mit 200 µl *E. coli* SOLR-Zellen gemischt, 15 Minuten bei 37°C inkubiert und 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit 75 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über

Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Von jeder Platte wurden anschließend 5 Kolonien gepickt, eine Übernachtskultur in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin (0,1 mg/ml) angesetzt und aus 2 ml dieser Kultur die Plasmid-DNA isoliert. Durch einen Restriktionsverdau mit entsprechenden Enzymen konnte die Größe des cDNA Inserts im Plasmid bestimmt werden.

2.2.3.18 Sequenzierung der isolierter Klone

Aus cDNA-Banken isolierte Klone wurden unter Verwendung des „Thermosequense Cycle Sequencing Kits“ der Fa. Amersham Pharmacia Biotech nach Anleitung des Herstellers sequenziert. Grundlage der Sequenzierungsreaktion ist die Kettenabbruchmethode nach Sanger et al. (1977). Diese Methode beinhaltet die *in vitro* Synthese eines DNA-Stranges, bei der manuellen Sequenzierung in Anwesenheit von [$\alpha^{35}\text{S}$]ATP durch eine DNA-Polymerase mit einzelsträngiger DNA als Matrize. Als Sequenzierungsprimer wurden T3-, T7- und M13-Primer verwendet, diese hybridisieren mit Vektorsequenzen unmittelbar vor dem 5'- oder hinter dem 3'-Ende der multiplen Klonierungsstelle (MCS, engl.: „multiple cloning side“). Bei der automatischen Sequenzierung wurden Cy5-markierte vektorspezifische Primer verwendet. Die Synthese beginnt an der Stelle, an welcher ein Oligonukleotidprimer an die Matrize bindet. Ab diesem Primer erfolgt eine Verlängerung des Stranges durch die DNA-Polymerase bis zum Abbruch der Synthesereaktion durch Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP's), welchem die 3'-Hydroxylgruppe fehlt, die für eine Verlängerung des DNA-Stranges notwendig ist. Da jeder Reaktionsansatz nur eines der vier möglichen ddNTP's enthält, kann nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Bandenmuster des erhaltenen Autoradiogramms die Basensequenz abgelesen werden. Die zu sequenzierende Plasmid-DNA wurde mit einem Plasmid-Isolierungskit der Firmen Qiagen oder Fa. Roche isoliert und in 50 μl *A. bidest* aufgenommen.

2.2.3.18.1 Manuelle Sequenzierung mit dem "Thermosequense cycle Sequencing Kit"

Die Sequenzierungsreaktion erfolgte in zwei Schritten: zuerst wurde die DNA radioaktiv markiert, und in einem zweiten Schritt nach dem gleichen Prinzip wie bei der Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) ein Didesoxynukleotid (ddNTP) eingebaut, das zum Kettenabbruch führt. Für die erste Reaktion (Markierung der DNA) wurden 300 ng einer doppelsträngigen Plasmid-DNA in einem Volumen von 2 μl *A. bidest* mit 0,15 pMol Primern, 2 μl Reaktionspuffer (260 mM Tris-HCl pH 9,5, 65 mM MgCl_2), 1 μl 3 μM 7-deaza-dGTP, 1 μl 3 μM dCTP, 0,5 μl [$\alpha^{35}\text{S}$]ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 1000 Ci/mM) und 2 μl Thermosequense in einem Gesamtvolumen von 17,5 μl gemischt. Die Ansätze wurden mit Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet und in einem Thermocycler der Fa. Perkin Elmer für 60 Zyklen mit 15 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 30 Sekunden bei 72°C (Verlängerung) pro Zyklus inkubiert. Anschließend wurde von jeder Probe je 3,5 μl auf 4 verschiedene Reaktionsgefäße verteilt und mit je 4 μl eines der vier Terminationsgemische (je 150 μM aller dNTP's, 1,5 μM je eines ddNTP's, 50 mM NaCl)

vereinigt. Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und im Thermocycler für 50 Zyklen mit 30 Sekunden bei 95°C und 90 Sekunden bei 72°C pro Zyklus inkubiert. Anschließend wurde jede Probe mit 4 µl Stopplösung gemischt und bis zur Auftrennung in einem Polyacrylamidgel bei -20°C gelagert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einer vertikalen Sequenzierapparatur der Fa. Gibco BRL Life Technologies. Dazu wurden Glasplatten mit einer Größe von 60 x 19,5 cm benutzt, die Dicke der Abstandhalter zwischen den Platten betrug 0,4 mm. Zur besseren Ablösung der Gele nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten mit Dichlormethylsilan (Fa. Gibco BRL) silanisiert. Zur Herstellung von 6% Gelen wurden 35 g Harnstoff in einem 70 ml Ansatz mit 10,5 ml 40% Acrylamid /Bisacrylamid (19:1), 7 ml 10fach TBE-Puffer (900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0) und 24 ml *A. bidest* durch kurzes Erwärmen gelöst und sterilfiltriert. Nach Entgasen der Lösung wurden 280 µl 10% APS (Fa. Roth) und 35 µl TEMED (Fa. Roth) zugegeben und das Gel mit Hilfe einer Spritze luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen. Das Gel polymerisierte bei Raumtemperatur über Nacht aus. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei konstant 75 Watt mit 1fach TBE als Laufpuffer. Nach Vorlauf des Gels für 45 Minuten, wurden die Sequenzierproben für zwei Minuten bei 90°C denaturiert, und pro Spur 3 µl Probe aufgetragen. Die Laufzeit des Gels variierte zwischen 3-8 Stunden, in Abhängigkeit von der Sequenzbestimmung in Nähe oder weiterer Entfernung von der Primerbindungsstelle. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 15 Minuten in 10% Essigsäure mit 12% Methanol fixiert, mit *A. bidest* gewässert und anschließend auf Filterpapier bei 80°C auf einem Vakuumtrockner (Fa. Biometra) getrocknet. Danach wurde das Gel in eine Autoradiographiekassette geklebt, und ein Röntgenfilm (Kodak X-OMAT-AR, Fa. Sigma) für 24-72 Stunden aufgelegt. Der Film wurde 1 Minute in Kodak LX 24 Entwickler geschwenkt und anschließend 5 Minuten in Tetenal-Fixierer fixiert, gewässert und getrocknet.

2.2.3.18.2 Automatische Sequenzierung

Die Sequenzierungsreaktion wurde ebenfalls mit dem "Thermosequenase Cycle Sequencing Kit" der Fa. Amersham Pharmacia Biotech unter Verwendung Cy5 markierten Primern T3 und M13 durchgeführt. In einer Sequenzierungsreaktion wurden 1 µg DNA eingesetzt und diese mit 5 pmol des entsprechenden Primers, 2 µl 10fach Thermosequenasepuffer und 2 µl Thermosequenase gemischt und mit *A. bidest* auf ein Endvolumen von 17 µl aufgefüllt. Pro Reaktionsansatz wurden vier PCR-Reaktionsgefäße beschriftet und 4 µl des entsprechenden ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddTTP oder ddCTP) hineinpipettiert. Anschließend wurden 4 µl des angesetzten Mastermixes (Thermosequenase, Primer und DNA) zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt, und mit Mineralöl (Fa. Sigma) überschichtet. Danach folgten 60 Cycles mit

30 Sekunden bei 95°C (Denaturierung), 30 Sekunden bei 57°C (Anlagerung der Primer an die DNA-Probe) und eine Verlängerung der Primer für 90 Sekunden bei 72°C. Nach Abschluß der 60 Zyklen wurde 4 µl StoppLösung (5 mg/ml Dextranblau in 100% deionisiertem Formamid) zugegeben und die Proben wurden bei -20°C bis zum Gellauf im Dunkeln aufbewahrt, oder auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen.

Vor dem Gießen des Polyacrylamidgels wurden die beiden Glasplatten des Sequenzierers und die Glas-Abstandhalter mit unvergälltem Ethanol gereinigt. Für eine bessere Bindung des Gels an die Glasplatten beim Gellauf wurden die oberen 5 cm beider Platten Bindsilan (Fa. Amersham Pharmacia Biotrend) behandelt. Anschließend wurden die 0,5 mm dicken Glasabstandhalter auf die Vorderplatte aufgelegt, kurz angeedrückt und schließlich die hintere Platte in die entsprechenden Ausparungen gelegt. Nach Klammern der beiden Platten wurde das Gel gegossen. Meist erfolgte die Auftrennung der Proben mit einem Hydrolink-Longranger Gel, das längere Läufe und lesbare Sequenzen bis zu 1200 Basenpaaren zuläßt. Zur Herstellung eines 0,5 mm Hydrolink-Longranger Gels wurden 21,7 g Harnstoff (Fa. Fluka) in 6,6 ml einer 50% Acrylamid/Bisacrylamid-Mischung (19:1) (Fa. FMC Biotrend, Rockland Maine, USA), 9 ml 10fach TBE-Puffer (1 M Tris, 0,83 M Borsäure (Fa. Roth), 10 mM EDTA, pH 8,0) und 10 ml *A. bidest* durch Erwärmen in der Mikrowelle gelöst. Die Mischung wurde anschließend auf ein Endvolumen von 60 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und entgast. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurden 300 µl 10% APS (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) und 30 µl TEMED (Fa. Amersham Pharmacia Biotech) zugegeben. Das Gel wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Alternativ erfolgte eine Auftrennung der Sequenzierproben in einem Acrylamid-Gel, das nur bis zu 500 Basenpaare auftrennt. Dabei wurden 25,2 g Harnstoff in 12 ml 30% Acrylamid (19:1) und 3,6 ml 10fach TBE durch Erwärmen gelöst und mit *A. bidest* auf ein Endvolumen von 60 ml aufgefüllt. Anschließend wurde diese Lösung sterilfiltriert, entgast und vor dem Gießen des Gels 53 µl TEMED und 210 µl 10% APS zugegeben. Das Gel polymerisierte gleichfalls für 3 Stunden bei Raumtemperatur.

Das Gel wurde in die Sequenzierapparatur eingehängt und an den Wasserkreislauf angeschlossen, um die Platten mit dem Gel auf 55°C zu temperieren. Die Proben wurden für 2-3 Minuten bei 85°C denaturiert, auf Eis gestellt und 3-4 µl von jedem Ansätze auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Der Gellauf erfolgte beim Hydrolink-Longranger Gel entsprechend dem Protokoll bei 1500 V, 60 mA und 25 Watt bei 55°C für die Dauer von 1000 Minuten wobei die Probenmessung in einem Intervall von 2 Sekunden stattfand. Als Laufpuffer wurde 0,5fach TBE verwendet. Die Laufbedingungen für das Acrylamid-Gel waren 50°C, 1500 V, 38 mA, 34 W 500 Minuten, Probenmessung in einem Intervall von zwei Sekunden. Als Laufpuffer wurde 0,6fach TBE verwendet.

2.2.3.19 Sequenzanalysen

Die Nukleotid-Sequenzen der isolierten Klone wurden in einem Homologievergleich mit FASTA (Pearson und Lipman, 1988) und BLAST (Altschul et al., 1997) analysiert. Anschließend wurden mit dem Programm PCGene die offenen Leserahmen bestimmt und die Nukleinsäuresequenzen in Aminosäuresequenzen übersetzt, die mit Analyseprogrammen bei ExPASy (Swiss Institute of Bioinformatics) sowie FASTA, BLAST und BLITZ untersucht wurden. Multiple Homologie-vergleiche wurden mit dem Programm ClustalW (Thompson et al., 1994) durchgeführt. Die physiochemischen Eigenschaften der ermittelten Aminosäuresequenzen wurden mit „ProtParam“ analysiert und spezifische Sequenzmotive und Proteindomänen mit „Scan Prosite“ „ProfileScan“, „WWW PESTfind Analysis“ identifiziert, sowie Sekundärstrukturanalysen mit dem PSA „Protein Analysis Server“ durchgeführt. Eine Auflistung der verwendeten Programme und Internetadressen sind in Tabelle 8 dargestellt.

Analyse	Internetadresse
Datenbankrecherchen	http://www.nlm.nih.gov
BLAST	
Restriktionsanalyse	FASTA http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/ http://hornet.bio.uci.edu/~hjm/projects/tacg/tacg2.form.html
Homologievergleiche	http://W3.toulouse.inra.fr/ EMBL http://www.ebi.ac.uk/ebi_home.html ClustalW http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/ PSORT II http://psort.nibb.ac.jp:8800 PFAM http://pfam.wustl.edu
Sekundärstrukturanalyse	http://www.cmpharm.ucsf.edu/~nomi/nnpredict.html PROFILE SCAN http://www.isrec.isb-sib.ch/software/PFSCAN_form.html SCAN PROSITE http://www.expasy.ch/tools/scnpsit1.html , PROTPARAM http://www.expasy.ch/tools/protparam.html PSA http://bmerc-www.bu.edu/psa/request.html ExPASy http://www.expasy.ch/tools/dna.html coiled coil Regionen http://www.ch.embnet.org/ PAIRCOIL http://nightingale.lcs.mit.edu MULTICOIL: http://nightingale.lcs.mit.edu

Tab. 8: Internetadressen zur DNA-und Proteinanalytik

2.2.3.20 Dot-Blot Analyse

Die isolierte Klone wurden vor der Sequenzierung zunächst in einer Dot Blot Analyse selektioniert. Dazu wurde von Klonen mit Homologien zu bereits bekannten Genen, die cDNA-Inserts präpariert und digoxigeninmarkierte Sonden hergestellt und diese als Sondenmix eingesetzt. Für die Dot-Blot Analysen wurde die Minipräp-DNA der Klone 1:10 in TE-Puffer verdünnt, bei 95°C denaturiert (10 Minuten), und jeweils 1 µl auf eine Hybond N Membran gedotet. Nach dem Antrocknen wurde die DNA durch UV-Licht (0,45 J/cm²) an die Membran

gebunden und die Membran für zwei Stunden bei 68°C in 5fach SSC, 1% Blockierungslösung, 0,02% SDS, 0,1% N-Laurylsarcosinat prähybridisiert. Die Hybridisierung in Sondenlösung erfolgte über Nacht bei 68°C und am nächsten Tag wurde die Membran wie bei Durchmusterung einer cDNA-Bank (siehe 2.2.3.16) beschrieben weiterbearbeitet und eine Detektion mit CDP^{Star} durchgeführt.

2.2.3.21 Herstellung Digoxigenin-markierter cRNA Sonden

Zur Herstellung von cRNA-Sonden wurde im Bluescript SK(-) Vektor klonierte cDNA als Matrize eingesetzt. Von dem inklonierten Genfragment wurde ein DNA-Strang mit der T3-, der andere Strang mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert. Je nach Klonierung des DNA-Fragments wird "sense"- bzw. "antisense"-RNA transkribiert. Die *flightless*-Fragmente waren so in den pBluescript-Vektor kloniert, daß das 5'-Ende des kodierenden Stranges nahe dem T3-Promotor und das 3'-Ende dem T7-Promotor benachbart lag. Zur Herstellung von "antisense"-cRNA wurde die T7-RNA Polymerase verwendet. Vor der Transkription wurde der Vektor mit einem Restriktionsenzym linearisiert, das einen 5'-Überhang erzeugt und dem gewünschten Promotor gegenüberliegt, so daß die Transkripte keine Vektorsequenzen enthalten. Für den Restriktions-verdau wurde in einem 50 µl Ansatz 4 µg der Plasmid-DNA mit 1 µl EcoRI (10 U/µl), 5 µl vom Hersteller mitgelieferten 10fach Restriktionspuffer und der entsprechenden Menge an *A. bidest* versetzt und zwei bis drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Verdau zur Entfernung der Proteine mit Phenol-Chloroform (1 Volumen eines 1:1 Gemisches aus Phenol und Chloroform) versetzt, gemischt und zentrifugiert (5 Minuten bei 15.800 g). Die obere Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und durch Zugabe von 0,1 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 120 µl absolutem Ethanol die DNA für 30 Minuten bei -80°C gefällt und anschließend pelletiert (20 Minuten, 15.800 g, 4°C). Das Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen, getrocknet und in einer Endkonzentration von 200 ng/µl DNA in DEPC behandeltem *A. bidest* aufgenommen.

Für die Transkription wurde 1 µg der linearisierten Plasmid-DNA mit 2,5 µl 10fach Transkriptionspuffer (400 mM Tris-HCl pH 8, 60 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin, Fa. Roche), 2,5 µl 10fach RNA-Markierungsgemisch (10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-11-UTP, pH 7,5) 1 µl 0,75 M DTT, 1 µl RNAGuard (33,6 U/µl), Fa. Pharmacia), 1 µl T7-RNA-Polymerase (1:5 in Transkriptionspuffer verdünnt, 10 U/µl Fa. Gibco BRL) und 12 µl *A. bidest* versetzt und 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 2,5 µl 0,2 M EDTA, 3,1 µl 4 M LiCl und 94 µl absolutem Ethanol wurde die transkribierte cRNA für 30 Minuten bei -80°C gefällt und durch Zentrifugation sedimentiert (15.800 g, 20 Minuten, 4°C). Das cRNA-Pellet wurde in 75% Ethanol gewaschen, getrocknet

und in 100 µl DEPC-behandeltem *A. bidest* aufgenommen. Zur Überprüfung des Transkriptes wurden 5 µl cRNA auf ein 1% Formaldehyd-Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt.

2.2.3.22 Northern Blot Analyse

Die Gelelektrophorese zur Auftrennung von RNA erfolgte wie unter 2.2.3.5 beschrieben. Vor dem Transfer der RNA aus dem Gel auf eine Nylon-Membran (Hybond N⁺, Fa. Amersham) wurde das Gel zunächst zweimal 10 Minuten in DEPC behandeltem *A. bidest*, danach zweimal 20 Minuten in DEPC behandeltem 20fach SSC (3 M Na Cl, 300 mM Na-Citrat, pH 7,0) gewaschen. Der Transfer der RNA auf die Membran wurde unter Druck in einem Posi-Blot (Fa. Stratagene) durchgeführt. Dazu wurden in die Blot-Apparatur drei in 20fach SSC befeuchtete Filterpapiere gelegt, auf die eine Hybond N⁺ Membran plaziert wurde. Das Gel wurde auf die Membran gelegt und mit einem in 20fach SSC tropfnass getränkten Schwamm bedeckt. Nachdem die Apparatur mit einem Deckel verschlossen wurde, erfolgte der Transfer für 1,5 Stunden bei 60 mm Hg. Durch Bestrahlung der Membran mit UV-Licht (0,45 J/cm²) wurde die RNA an die Nylonmembran gebunden. Anschließend folgte die Hybridisierung oder die Membran wurde bei -80°C aufbewahrt.

Zunächst wurde die Membran in 5fach SSC, 40% Formamid, 3,5% Blockierungsreagenz, 0,02% SDS, 0,1% N-Laurylsarcosinat für 2,5 Stunden bei 68°C unter Schütteln prähybridisiert. Für die Hybridisierung wurden 3 µl Sonde (ca. 300 ng RNA) mit 3 ml Prähybridisierungslösung versetzt und 10 Minuten bei 95°C hitzedenaturiert. Die Blot-Membran wurde über Nacht bei 68°C unter Schütteln in der Hybridisierungslösung inkubiert. Danach wurde die Membran zweimal 10 Minuten in 2fach SSC, 0,1% SDS bei Raumtemperatur und 2 mal 20 Minuten in 0,1fach SSC, 0,1% SDS bei 68°C auf dem Schüttler gewaschen. Der immunologische Nachweis erfolgte wie unter 2.2.3.16.1 beschrieben mit dem Antikörper-Konjugat Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase und dem Chemilumineszenz-Substrat CDP^{Star}. Die Membran wurde in eine Plastikfolie eingeschweißt, in eine Autoradiographiekassette eingeklebt und ein Röntgenfilm aufgelegt. Die Exposition des Filmes erfolgte je nach Stärke der Signale für 50 Sekunden bis 30 Minuten.

2.2.3.23 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen mit *E. coli* BL21

Proteinexpression, Isolierung und Aufreinigung von rekombinant exprimierten Proteinen wurde mit dem Glutathion S-Transferase (GST) "Gene Fusion Expressionssystem" der Fa. Amersham Pharmacia Biotech durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein integriertes System, das Expression, Aufreinigung und Nachweis des in *E. coli* BL21 synthetisierten Fusionsproteins ermöglicht. Hauptkomponenten sind pGEX Plasmid-Vektoren, GSH-Sepharose zur Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat, und Anti-GST-Antikörper zur

Detektion des Fusions-proteins. Durch Verdau mit einer Protease kann das exprimierte Protein vom GST abgetrennt und isoliert werden. Als Expressionssystem wurde *E. coli* BL21 gewählt, der mit den verschiedenen pGEX Plasmid-Vektoren transformiert wurde. Die Transformanten erhielten durch das pGEX Plasmid Ampicillinresistenz und konnten selektiv herangezogen werden. Der pGEX-Plasmid-Vektor enthält das zu exprimierende Genfragment unter Kontrolle eines starken Promotors mit zwei *lac*-Operator Sequenzen. Durch Zugabe von IPTG wird der *lac*-Repressor inaktiviert und der Promotor des pGEX Plasmid-Vektors zur Transkription freigegeben. Die exprimierten Genfragmente verfügen am N-terminalen Ende über GST (Glutathion S-Transferase) von *Schistosoma japonicum*, über dessen Bindung an GSH, immobilisiert an Sepharose 4B, konnte das exprimierte Protein nach der Extraktion aus den Bakterien aufgereinigt werden. Nach der Aufreinigung konnte das Fusionsprotein durch Zugabe von reduziertem Glutathione von der Sepharose 4B eluiert werden, oder es erfolgte ein Verdau mit der Thrombin-Protease (Fa. Amersham Pharmacia Biotech).

Zunächst wurden das zu exprimierende cDNA-Fragment in den entsprechenden pGEX-Plasmid-Vektor ligiert und unter Verwendung der CaCl_2 -Methode zunächst in *E. coli* XL1 transformiert. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Wachstum auf LB-Platten mit 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin. Von den Platten wurden Kolonien für eine Übernachtskultur in LB mit 75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ampicillin gepickt und die Plasmid-DNA präpariert. In einem Restriktionsverdau (10 μl -Ansatz) wurde der Vektor linearisiert und anhand der Größe festgestellt, ob die Ligation der cDNA-Fragmente in die pGEX Vektoren erfolgreich war. Anschließend wurde der pGEX-Plasmid-Vektor mit einkloniertem cDNA-Fragment in *E. coli* BL21 transformiert. Von diesen Klonen wurde zunächst eine Proteinexpression in kleinem Maßstab durchgeführt. Dies erfolgte indem 5 ml 2X YTA-Medium mit 500 μl einer Übernachtskultur der Klone angeimpft und bei 37°C inkubiert wurde, bis eine $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,6-0,8 erreicht war. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 0,1 mM induziert. Nach einem weiteren Wachstum bei 37°C wurden 1,5 ml der Kulturen in Reaktionsgefäße überführt, und 5 Sekunden bei 15.800 g, 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 300 μl gekühltem PBS (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 , pH 7,3) resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung lysiert. Durch eine 5minütige Zentrifugation bei 15.800 g konnten die Bakterienreste pelletiert werden, und der Überstand enthielt das Fusionsprotein. Anschließend wurden 20 μl Sepharose 4B in PBS zum Überstand zugegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und durch Zentrifugation (5 Sekunden bei 15.800 g) wurde die Sepharose mit gebundenem Fusionsprotein sedimentiert, der Überstand abgenommen und das Pellet dreimal mit 500 μl PBS gewaschen. Durch Zugabe von 10 μl Glutathion Elutionspuffer (1mg/ml reduziertem Glutathion in PBS, Fa. Pharmacia) und fünfminütiger Inkubation bei RT wurde das Fusionsprotein eluiert und die Sepharose anschließend sedimentiert (5 Sekunden, 15

800 g). Der Überstand mit dem Fusionsprotein wurde abgenommen, 10 µl davon im gleichen Volumen 2fach Laemmli-Puffer (125 mM Tris-HCl Fa. Roth), 4% SDS (Fa. Merck) 20% Glycerin (Fa. Serva), 10% β-Mercaptoethanol (Fa. Roth), 2 mM EDTA (Fa. Roth), 0,04% Bromphenolblau (Fa. Roth), 0,08% NaN₃ (Fa. Serva), pH 6,8) aufgenommen und in einem SDS-PAGE aufgetrennt.

Die Proteinexpression wurde anschließend in großem Maßstab durchgeführt, indem 11 2X YTA-Medium mit 5 ml Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C inkubiert wurden bis eine OD_{600nm} von 0,6 bis 0,8 erreicht war. Die Expression wurde durch Zugabe von 100 mM IPTG zu einer Endkonzentration von 0,5 mM induziert. Nach 4stündigem Wachstum im Inkubationsschüttler bei 37°C wurden die Bakterien 10 Minuten bei 4000 g sedimentiert, und bei -80°C gefroren. Das Pellet von 1l Kultur wurde in 50 ml PBS resuspendiert und 0,1 Volumen Lysozym (10 mg/ml Lysozym in 25 mM Tris-HCl pH 8,0, Fa. Sigma) zugegeben zur Lyse der Zellwände und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung wurden die Zellen aufgebrochen und das Bakterienlysat zentrifugiert (10 Minuten bei 15.800 g), und die Bakterienreste abgetrennt. Der Überstand mit dem Fusionsprotein wurde in ein neues Gefäß überführt. Die Aufreinigung des Fusionsproteins aus dem Bakterienlysat erfolgte indem für jeweils 50 ml Bakterienlysat 1,33 ml Sepharose 4B in eine Säule gegeben und dreimal mit 10 ml PBS gewaschen wurde. Das Bakterienlysat wurde dann über die Säule gegeben und die Säule dreimal mit 10 Säulenvolumen PBS gewaschen. Danach wurde pro 1 ml Säulenvolumen 50 µl Thrombin-Protease (1u/µl, Fa. Pharmacia Biotech) in 950 µl PBS aufgenommen, auf die Säule gegeben und vier Stunden bei RT inkubiert. Alternativ wurde das Fusionsprotein von der Sepharose 4B durch Zugabe von 1 ml Glutathion Elutionspuffer pro 1 ml Säulenvolumen und Inkubation (10 Minuten bei RT) mit GST eluiert. Nachfolgend wurde die Menge an exprimiertem Protein im Eluat durch einen BCA-Assay ermittelt.

2.2.4 Lichtmikroskopie

2.2.4.1 Fixierung der Gewebe

Die Gewebe wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben präpariert und für 1-3 Stunden in 3% Paraformaldehyd (Fa. Merck) in Phosphatpuffer (0,2 M NaH₂PO₄ x 1 H₂O, 0,2 M Na₂HPO₄ x 2 H₂O, pH 7,4) fixiert, um das Gewebe zu stabilisieren. Anschließend wurden die Präparate mehrmals in Phosphatpuffer gewaschen, und mit Saccharoselösung (10% und 25% in 0,1 M Phosphatpuffer, Fa. Serva) infiltriert. Dabei wurden die Präparate sechsmal für jeweils 10 Minuten in 10% Saccharoselösung, danach dreimal für 10 Minuten in 25% Saccharoselösung gewaschen bevor sie über Nacht mit 25% Saccharoselösung bei 4°C infiltriert wurden. Am nächsten Tag wurden die Präparate zum Schneiden eingefroren. Alternativ wurden die Gewebe ohne vorherige Fixierung wie nachfolgend beschrieben eingebettet.

2.2.4.2 Einbettung und Schneiden der Präparate

Fixierte und unfixierte Gewebe wurden in Blöckchen aus gekochter Leber eingebettet, mit Tissue-Tek™ (Fa. Miles Laboratories Inc. USA) überschichtet, und ausgerichtet. Zur Erhöhung der Stabilität wurden die Leberblöckchen mit Probe anschließend mit Tissue-Tek auf einem Korkscheibchen befestigt, das Präparat nochmals mit Tissue-Tek überschichtet und in LN₂-gekühltem schmelzendem Isopentan (Fa. Fluka) bei -165°C eingefroren. Die Präparate wurden entweder sofort in einem Kryostaten (Fa. Microm Laborgeräte, Walldorf) geschnitten oder bis zur weiteren Bearbeitung in Falcon-Röhrchen (Greiner) mit 5 ml Isopentan bei -80°C aufbewahrt. Von den Präparaten wurden 8-10 µm dicke Schnitte bei -25 bis -30°C angefertigt, diese auf mit 0,01% Poly-L-Lysin (Fa. Sigma) beschichteten Deckgläschen aufgenommen und in kleine Petrischalen gegeben. Isolierte Cilienapparate von Photorezeptoren oder isolierte Photorezeptorzellen wurden direkt auf Poly-L-Lysin beschichtete Deckgläschen absedimentiert und mit 3% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer für 10 Minuten fixiert. Alternativ wurden diese in 100% Methanol bei -20°C für 10 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Präparate kurz in PBS gewaschen um das Fixans zu entfernen und wie folgt beschrieben inkubiert.

2.2.4.3 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Proteine können in Geweben *in situ* mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Dabei wird der Gewebeschnitt im ersten Schritt mit einem gegen das zu detektierende Protein gerichteten Antikörper inkubiert. Dieser bindet an eines oder mehrere Epitope des Antigens. Im zweiten Schritt wird der Bindungsort des primären Antikörpers durch einen fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper sichtbar gemacht. In der vorliegenden Arbeit wurden fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper verwendet, die entweder mit Rhodamin oder Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt waren. Zuerst wurden die Gewebeschnitte in kleinen Petrischalen in 40 µl 0,01% Tween 20 (Fa. Roth) in PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Zugänglichkeit der Gewebe für die Antikörper zu verbessern und die Oberflächenspannung herabzusetzen. Anschließend wurden die Schnitte von fixierten Präparaten in 40 µl NH₄Cl in PBS (50 mM NH₄Cl in 0,1M PBS, pH 7,2) inkubiert, um freie Aminogruppen abzusättigen. Die Blockierung erfolgte in 30 µl Blockierungslösung (0,1% Ovalbumin (Fa. Roth), 0,5% Fischgelatine (Fa. Sigma) in 0,1 M PBS, pH 7,4) für 30 Minuten. Schließlich folgte über Nacht bei 4°C eine Inkubation in 20 µl einer Antikörperlösung, verdünnt in Blockierungslösung. Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal in PBS gewaschen, und in 20 µl des entsprechenden sekundären Antikörpers (in Blockierungs-lösung verdünnt), Anti-Maus FITC-gekoppelt, Anti-Ziege Rhodamin-gekoppelt, oder Anti-Kaninchen Rhodamin-gekoppelt bei Raumtemperatur im Dunkeln für 1-2 Stunden inkubiert. Danach wurden die Schnitte erneut

dreimal 10 Minuten in PBS gewaschen, kurz in destilliertes Wasser getaucht, mit einem Filterpapier das Wasser vorsichtig entfernt und in Mowiol (4.88, Fa. Hoechst) luftblasenfrei eingedeckelt. In der Regel wurden Doppelmarkierungen mit zwei verschiedenen Antikörpern und Dreifachmarkierungen zusätzlich mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, Endkonzentration 1 µg/µl, Fa. Sigma) zur Lokalisation der Zellkerne durchgeführt. Als Kontrollen wurden Schnitte nur mit den primären oder sekundären Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Präparate mit einem Zeiss Axiovert 35 Photomikroskop oder einem Leica Fluoreszenzmikroskop analysiert. Der Rhodamin-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde mit Grünlicht (550 nm) angeregt und zeigte eine rote Fluoreszenz (650 nm), der Fluorescein-Isothiocyanat- (FITC) gekoppelte Antikörper wurde mit Blaulicht (492 nm) angeregt und zeigte ein grünes Fluoreszenzlicht (520 nm). Für die Dokumentation wurde ein Schwarzweißfilm (T-Max 100 und T-Max 400 der Fa. Kodak, bei 400 bzw. 800 ASA belichtet) oder ein Farbdiafilm (Fuji Sensia 100, Fa. Fuji, Belichtung bei 100 ASA) verwendet. Alternativ erfolgt eine Analyse und Dokumentation der Präparate mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop TCSNT der Fa. Leica.

2.2.5 Ultrastrukturelle Lokalisation von Proteinen

2.2.5.1 Fixierung

Die Gewebe wurden (wie unter 2.2.1.1 beschrieben) präpariert und in 3% Paraformaldehyd (Fa. Roth) oder einem Gemisch von 2% Glutaraldehyd (Fa. Roth) und 4% Paraformaldehyd in Phosphatpuffer (pH7,4) 1 Stunde bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2 mal 100%, p.a. Fa. Roth) für 10 Minuten bei Raumtemperatur entwässert.

2.2.5.2 Einbettung der Präparate in LR-White

Nach Entwässerung wurden die Gewebe für jeweils 1 Stunde in 30%-, 50%- und 70%-ethanolischer LR-White-Lösung (Härtegrad: "hard" Fa. Mikrotechnik EM, München) infiltriert und anschließend in 100%igem Einbettungsmedium über Nacht inkubiert. Die Aushärtung erfolgte in Gelatinekapseln (Fa. Plano, Marburg-Cappel) bei 4°C unter UV-Licht für 2-3 Tage.

2.2.5.3 Immunogoldmarkierung

Für die Immunogold-Markierung wurden von den Präparaten in LR-White Ultradünnschnitte an einem Ultramikrotom (Ultracut S, Fa. Reichert) mit einem Diamantmesser (Fa. Diatom) angefertigt. Die Schnittdicke konnte durch die Interferenzfarben der Schnitte beurteilt werden, sie lagen im Bereich von grauen (30 nm) bis silbergrauen Schnitten (ca. 60 nm). Die Schnitte wurden auf mit Formvar (Fa. Sigma) befilmte Nickel-Netzchen transferiert, und wie folgt

inkubiert (Wolfrum et al., 1998; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Zunächst wurden die Netzchen auf Tropfen von 0,01% Tween 20 (Fa. Roth) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7,2) 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend folgte eine Absättigung der freien Aldehydgruppen durch 50 mM NH_4Cl in PBS (pH 7,2) für 30 Minuten bei RT. Die Lösung wurde durch intensives Waschen mit M PBS entfernt, gefolgt von einer Inkubation in Blockierungslösung (0,5% Fischgelatine (Fa. Sigma), 0,1% Ovalbumin (Fa. Sigma) in PBS, pH 7,2) für 1 Stunde bei RT. Nach diesem Blockierungsschritt folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper, verdünnt in Blockierungslösung für eine Dauer von 72 Stunden in einer feuchten Kammer bei 4°C. Anschließend wurden nichtgebundene Antikörper durch Waschen mit PBS (pH 7,2, sechsmal fünf Minuten bei RT) entfernt, und die Präparate in "IgG-Goldpuffer" (0,1% Ovalbumin, 0,5% Fischgelatine, 0,5% NaCl, 0,01 5 Tween 20 in 10 mM Phosphatpuffer pH 7,2) bei RT für 15 Minuten inkubiert. Im Anschluß daran folgte für zwei Stunden bei RT die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (z. B Ziege Anti-Kaninchen, Fa. Nanoprobes), der mit 1 nm oder 10 nm Goldpartikeln markiert war, verdünnt in IgG-Goldpuffer. Die Präparate wurden dann mehrmals in PBS (pH 7,2) gewaschen. Die Stabilisierung der Antikörper an das Gewebe erfolgte durch Behandlung der Präparate mit 2,5% Glutaraldehyd in PBS (pH 7,2) für 7 Minuten bei RT. Die Fixierungslösung wurde durch mehrmaliges Waschen (sechsmal für 2 min.) mit PBS (pH 7,2) entfernt. Nach dem Trocknen der Präparate folgte eine Silberverstärkung nach Danscher (1981).

2.2.5.4 Silberverstärkung nach Danscher (1981)

Durch eine chemische Reaktion katalysieren Goldpartikel die Reaktion von Silber durch Hydrochinon. Dadurch werden die Goldkörnchen von metallischem Silber umgeben. Der Entwickler besteht aus folgenden Komponenten: 50% *Gummi arabicum* als Schutzkolloid, Citratpuffer (pH 3,6), 75 mM Hydrochinon als Reaktionsmittel und 5,5 mM Silberlactat. Die Lösung wurde unter Rotlicht gemischt und die Präparate auf einem Tropfen des Entwicklers für 20 bis 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Ultradünnschnitte intensiv mit *A. bidest* gewaschen.

2.2.5.5 Schnittkontrastierung

Direkt nach Immunogoldmarkierung oder der Silberverstärkung wurden die Schnitte für 5 Minuten in 2% Uranylacetat in 50% Ethanol und für 5 Minuten auf einem Tropfen Bleicitrat nachkontrastiert. Anschließend wurden die Präparate in *A. bidest* gewaschen und in der geöffneten Netzchen-Box über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und im Elektronenmikroskop EM900 analysiert.

3 Ergebnisse

Forschungsarbeiten der letzten Jahre haben aufgezeigt, daß das ciliäre Cytoskelett von Sinneszellen essentiell für die Funktion einer gesunden Rezeptorzelle ist (Weil et al., 1995; Liu et al., 1999a; Tai et al., 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Hong et al., 2000; Marszalek et al., 2000). Daher stehen Cytoskelettproteine, und damit assoziierte Proteine bei der funktionellen Analyse von Sinneszellen zunehmend im Mittelpunkt aktueller Forschungsansätze (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Allerdings konzentrieren sich nur wenige Arbeiten auf die Aufklärung der molekularen Zusammensetzung des ciliären Cytoskeletts des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen. Dieses modifizierte Cilium ist aber die einzige direkte cytoplasmatische Brücke zwischen dem metabolisch aktiven Innensegment und dem lichtsensitiven Außensegment. Desweiteren trennt das Verbindungscilium die biochemisch, funktionell und morphologisch unterschiedlichen Kompartimente des Innen- und Außensegments der Photorezeptorzellen (z. B. Horst et al., 1990). Es wird angenommen, daß der polarisierte Transport von Proteinen und Membranmaterial vom Innenglied in das Außenglied, unter anderem intrazellulär durch das Kompartiment des Verbindungscilium erfolgt. Neueste Arbeiten zeigen zudem eine Beteiligung von Motorproteinen an diesen Transportprozessen (Muresan et al., 1997; Tai et al., 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Darüberhinaus wird eine Mitwirkung von Proteinen des Verbindungsciliums an der Morphogenese der Disk-Membranen des Außensegments, und eine Funktion des Verbindungsciliums als Diffusionsbarriere diskutiert (Fleischmann, 1981; Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989; Besharse und Horst, 1990; Chaitin und Coelho, 1992; Williams et al., 1992; Muresan und Besharse, 1994). An diesen Funktionen des Verbindungsciliums dürften die molekularen Strukturkomponenten des ciliären Cytoskeletts maßgeblich beteiligt sein.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen aber nur wenige Informationen über die molekulare Zusammensetzung des Verbindungsciliums vor. Primäres Ziel dieser Dissertation war daher die Entwicklung einer Strategie, um bisher unbekannte molekulare Proteinkomponenten des Verbindungsciliums zu identifizieren. Die angewandte biochemisch-molekularbiologische Strategie ist schematisch in Abbildung 7 dargestellt. Zunächst wurden Photorezeptorzellen aus Rinderretinae aufgereinigt, und nachfolgend deren Cilienapparate isoliert. Anschließend wurden die Cilienapparate zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt. Dieses Antiserum sollte dann Antikörper enthalten, die spezifisch gegen die verschiedenen molekularen Komponenten des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen gerichtet sind. Das polyklonale Antiserum (AX4) wurde anschließend zur Durchmusterung einer Rattenretina cDNA-

Expressions-Bank eingesetzt. Die cDNA-Sequenzen der isolierten Klone wurden durch Sequenzierung bestimmt und in Homologievergleichen analysiert.

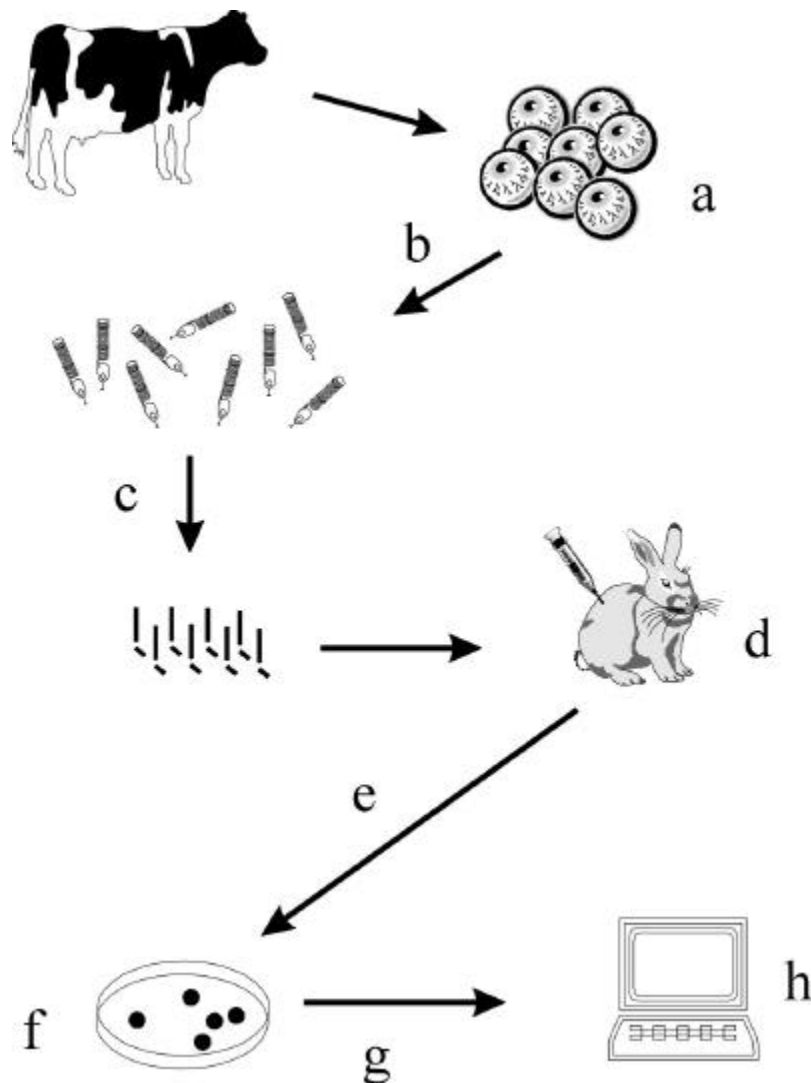


Abb. 7: Biochemisch-molekularbiologische Strategie zur Isolierung von Klonen, deren cDNA-Inserts für Proteinkomponenten des Verbindungsciliums kodieren

Zuerst wurden die Retinae aus Rinderäugen isoliert (**a**) und anschließend Photorezeptorzellen (OS, OS-IS) durch Saccharose-Dichtegradienten daraus isoliert, und angereichert (**b**). Durch Detergenzextraktion wurden die Cilienapparate isoliert (**c**), und zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt (**d**). Das polyklonale Antiserum wurde an Protein-A-Agarose aufgereinigt (**e**), und anschließend in einem Immunoscreen zur Durchmusterung einer retinalen oligodT-geprägten Expressions-cDNA-Bank der Ratte eingesetzt (**f**). Die 3'- und 5'-terminalen cDNA-Sequenzen der isolierten Klone wurden durch Sequenzierung bestimmt (**g**), und die cDNA-Sequenzen analysiert (**h**).

3.1 Präparation der Cilienapparate

3.1.1 Aufreinigung der Photorezeptorzellen und Isolierung der Cilienapparate

Die Isolierung der Photorezeptorzellen aus Rinderretinae und nachfolgende Extraktion der Cilienapparate erfolgte durch Anwendung eines Protokolls, das durch Kombination der Protokolle von Papermaster et al. (1974), Fleischmann et al. (1980), Pagh-Roehl und Burnside, (1995) entwickelt wurde.

Zunächst wurden die Photorezeptorzellen durch leichtes Schütteln der Retinae in HERT-Puffer von den übrigen Zellschichten der Retina abgetrennt. Die Photorezeptorzellen brechen am Verbindungscilium oder oberhalb des Myoids ab (Abb. 8A). Die Präparationen enthielten daher Außensegmente von Photorezeptorzellen mit Cilienapparat (OS: „outer segment“, konventionelle internationale Abkürzung), kürzere OS-Fragmente, sowie OS mit Cilienapparat und einem Teil des Innensegments (OS-IS; IS: „inner segment“). Diese Suspension wurde filtriert (Probe Nr. 1), und die OS/OS-IS durch drei Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugationen von den übrigen neuronalen Zellen der Retina abgetrennt und angereichert (Proben 2-4). Außensegmente von Photorezeptorzellen weisen aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes eine geringere Dichte und Sedimentationskonstante gegenüber den übrigen retinalen Zellen im Saccharosegradienten auf, wodurch eine quantitative Abtrennung dieser möglich ist (Zimmerman und Godchaux III, 1982; Molday, 1998).

Die Qualität der Aufreinigung wurde nach der Filtration (Probe 1) und den drei Zentrifugationsschritten (Probe 2 bis 4) lichtmikroskopisch geprüft und dokumentiert (Abb. 8 A). Von jeder Probe (1 bis 4) wurden jeweils 4 Präparate hergestellt, und anschließend die OS/OS-IS und übrigen retinalen Zellen eines Ausschnittes (0,8 mm x 0,48 mm) ausgezählt. Dabei wurde deutlich, daß bei einem gleichbleibenden Probenvolumen pro Präparat die Zahl an OS/IS-OS weitgehend konstant blieb, wohingegen die Zahl der übrigen retinalen Zellen stetig abnahm und die Reinheit der Probe somit zunahm (Abb. 8 B).

Anschließend wurden die OS/OS-IS durch Verringerung der Saccharosekonzentration pelletiert, und das Cytoskelett der Cilienapparate durch Detergenzextraktion isoliert. Da das Cytoskelett der Cilienapparate bei Detergenzbehandlung mit Triton X-100 stabil ist, wurden durch die Extraktion Membranen, Membranproteine sowie Proteine, die nicht fest mit dem Cytoskelett verbunden sind entfernt (Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Durch Zentrifugation des Extraktes auf einem diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten wurden die Cilienapparate nahe der 50%/60%-Phasengrenze angereichert, und von den übrigen Bestandteilen abgetrennt (Fleischmann et al., 1980). Um diese spezifische Anreicherung zu prüfen, wurde der Saccharose-Dichtegradient von oben beginnend in 1 ml Fraktionen abgenommen, dies resultierte in 20-25 Fraktionen.

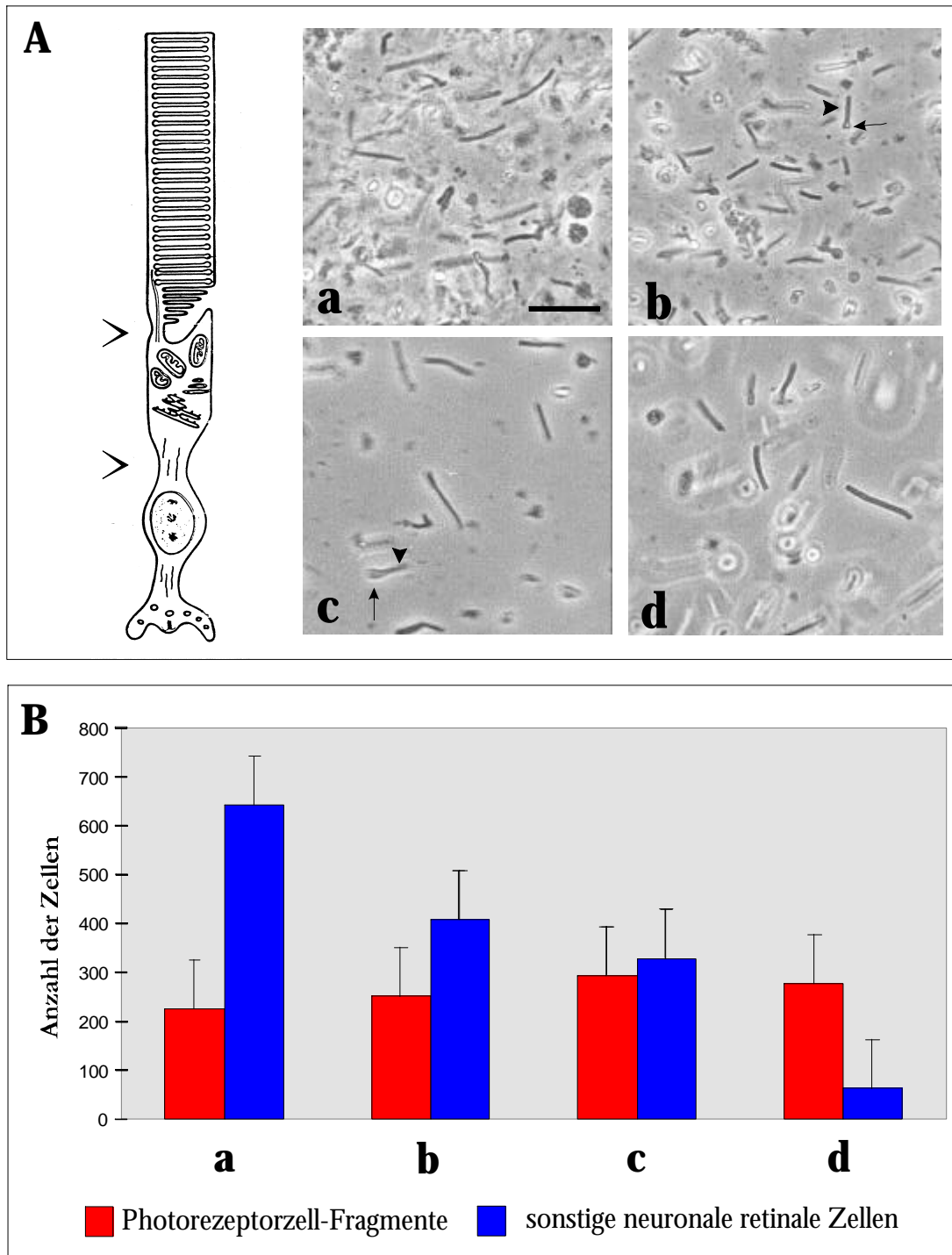


Abb. 8: Zunahme der Reinheit der Proben 1-4 während der Photorezeptorzell-Aufreinigung

(A): **a** Probe Nr. 1 nach Abtrennung der OS/OS-IS und Filtration durch ein 400 µm Netzchen. **b:** Probe Nr. 2, entnommen nach Reinigung durch Zentrifugation auf einem 50%igen Saccharosekissen. **c:** Probe Nr. 3, nach Zentrifugation auf einem kontinuierlichen 50-25% Saccharose-Dichtegradienten. **d:** Probe Nr. 4, nach Reinigung durch Zentrifugation auf einem 50%igen Saccharosekissen. Die schwarze Pfeilspitze weist auf das Außensegment einer Photorezeptorzelle (OS), der schwarze Pfeil auf das Innensegment (IS). Beim Homogenisieren der Retina wurden Außensegmente (OS) mit Verbindungscilium, OS-Fragmente oder OS-IS, Außensegmente mit Cilienapparat und einem Teil des Innensegments (IS) abgetrennt. Der Balken entspricht 40 µm. Am Schema der Stäbchen-Photorezeptorzelle sind die „Soll-Bruchstellen“ am Verbindungscilium und oberhalb des Myoids eingezeichnet. Das Photorezeptorschema wurde aus Molday (1998) entnommen. **(B):** Die Proben 1 bis 4 wurden bezüglich der Zahl an Photorezeptorzell-Außensegmenten und sonstigen retinalen Zellen ausgezählt. Dazu wurden jeweils 10 µl der Proben eingedeckt, und pro Probe vier Präparate hergestellt, im Lichtmikroskop analysiert und dokumentiert. Anschließend konnten die Photos der Präparate zur Auszählung herangezogen werden. Roter Balken: ausgezählte Photorezeptorzell-Fragmente (OS/OS-IS); blauer Balken: ausgezählte sonstige retinale Zellen. a bis d: siehe (A), Proben 1-4.

3.1.2 Identifikation der Cilienapparate

Anschließend wurde in Western Blot Analysen und indirekten Immunfluoreszenzmarkierungen geprüft, in welchen der 20 bis 25 Fraktionen der Gradientenzentrifugation die Anreicherung der Cilienapparate stattfand. Dabei dienten Antikörper gegen das ciliäre Protein Centrin als molekulare Marker zum Nachweis der Cilienapparate. Centrin ist im Cilienapparat einer Photorezeptorzelle spezifisch in den Centriolen des Basalkörper-Centriolen-Komplexes und im Verbindungscilium angereichert (Wolfrum, 1995; Liu et al., 1997).

Zuerst wurden die Proteinkonzentrationen der 20 bis 25 Fraktionen der Gradientenzentrifugation in einem BCA-Assay bestimmt (Abb. 9). Das Diagramm zeigt, daß zunächst ein Anstieg der Proteinkonzentration stattfand (Fraktionen 4-7), gefolgt von einer Abnahme bis zur Fraktion 11. Nachfolgende Proben weisen sehr niedrige Proteinkonzentrationen auf. Nur in den Fraktionen 15 bis 17 erfolgte nochmals ein geringer Anstieg. Diese Fraktionen wurden nahe der 50%/60%-Saccharose-Phasengrenze entnommen und enthalten nach Fleischmann et al. (1980) die isolierten Cilienapparate. Dies wurde durch Western Blot Analysen und indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen bestätigt.

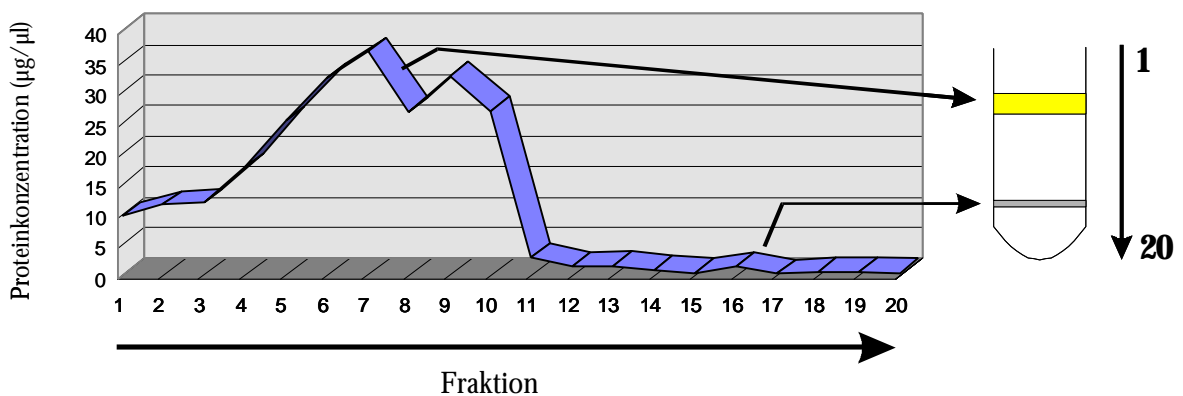


Abb. 9: Graphische Darstellung der Proteinkonzentrationen in den Fraktionen 1 bis 20 der Aufreinigung Nr. 4

Die Proteinkonzentrationen der Fraktionen 1 bis 20 der Dichtegradienten-Zentrifugation nach der Cytoskelettextraktion wurden durch einen BCA-Assay bestimmt. Die Fraktionen 15 bis 17 enthalten Anteile des Dichtegradienten an der Phasengrenze 50%/60 % Saccharose. In diesen Fraktionen war ein geringer Anstieg der Proteinkonzentration zu erkennen. Im Immunfluoreszenz-Assay konnte in diesen Fraktionen eine Anreicherung an isolierten Cilienapparaten nachgewiesen werden, so daß der Anstieg der Proteinkonzentration auf die Anreicherung der Cilienapparate zurückzuführen ist.

Mit dem monoklonalen Anti-Centrin Antikörper (mAb Centrin Klon 20H5) wurde in Western Blot Analysen in fast allen Fraktionen Centrin als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa nachgewiesen (Abb. 10). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen von Paoletti et al. (1996) und Laoukili et al. (1999), Centrin liegt in eukaryotischen Zellen auch in löslicher Form vor. In den Fraktionen 3 bis 5 und 15 bis 17 wurde eine Anreicherung von Centrin detektiert. Die Fraktionen 15 bis 17 wurden an der 50%/60%-Saccharose-Phasengrenze des Saccharose-Dichtegradienten entnommen und enthalten die isolierten Cilienapparate (Abb. 10). Die Immunmarkierung der Fraktionen 3 bis 5 zeigte zudem, daß die Anreicherung von Centrin in diesen Fraktionen auf eine Sedimentation von Centrosomen zurückzuführen ist.

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde eine weitere Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin als molekularer Cilienmarker durchgeführt. Tubulinmoleküle von Verbindungscilien werden unter anderem durch Acetylierung post-translational modifiziert und stabilisiert (Sale et al., 1987; Arikawa und Williams, 1989). Acetyliertes α -Tubulin wurde jedoch in allen Fraktionen ohne spezifische Anreicherung nachgewiesen. Ursache hierfür war im Cytoskelettextraktionspuffer enthaltenes Taxol. Diese Substanz bewirkt eine vermehrte Acetylierung von nichtciliärem Tubulin (Wilson und Forer, 1997). Dadurch war es nicht möglich, anhand von acetyliertem α -Tubulin spezifisch die Cilienapparate zu identifizieren (Abb. 11).

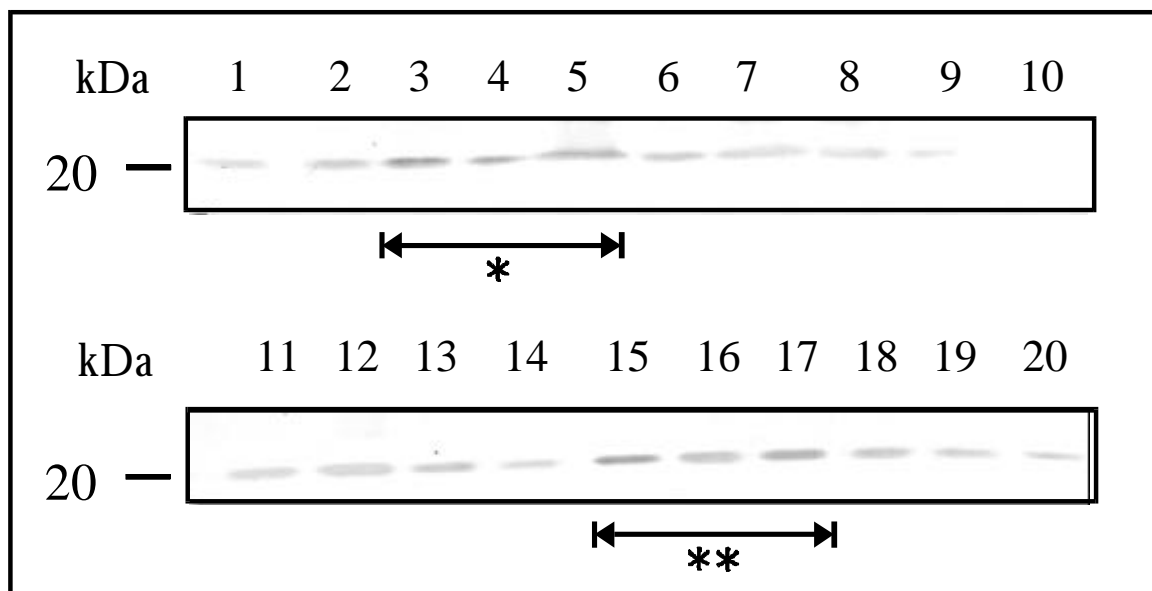


Abb. 10: Western Blot Analyse zur Identifikation der Cilienapparate mit dem molekularen Markerprotein Centrin

Jeweils 20 μ g Protein der Fraktionen 1-20 wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit dem monoklonalen Anti-Centrin Antikörper 20H5 wurde das Protein Centrin in fast allen Fraktionen bei einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa nachgewiesen. In den Fraktionen 3 bis 5 (*) und 15 bis 17 (**) wurde Centrin in höherer Konzentration detektiert. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

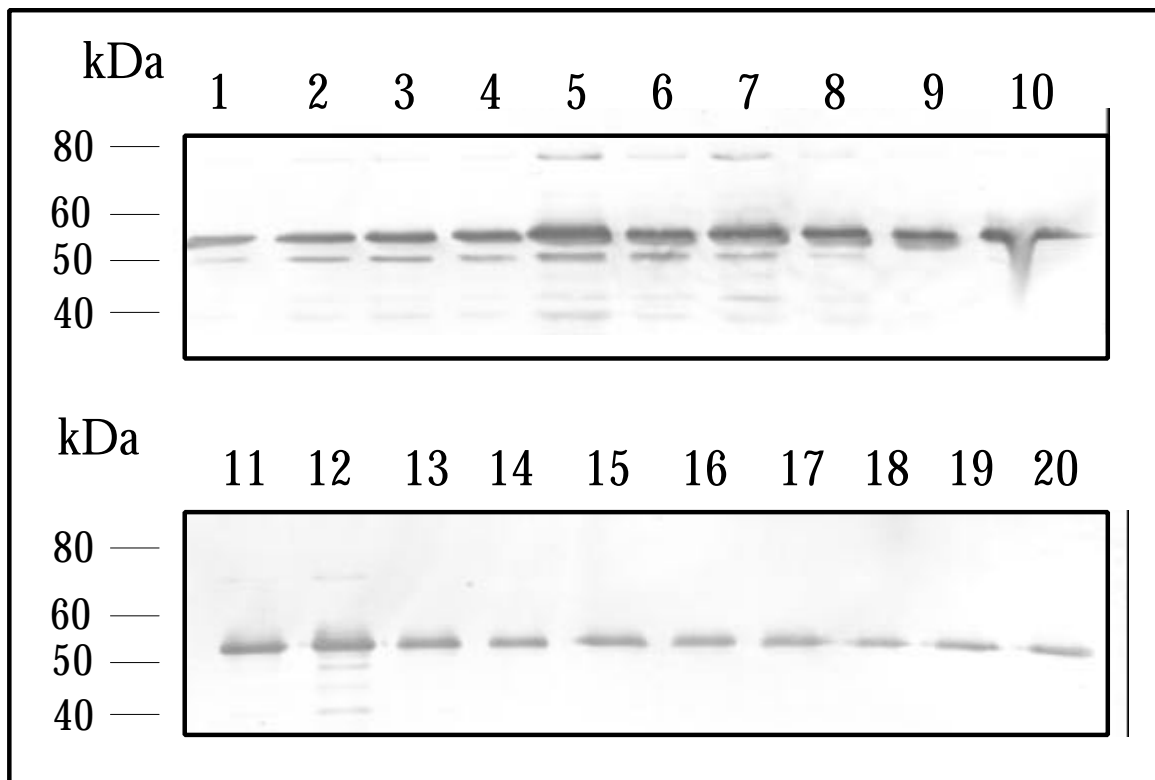


Abb. 11: Western Blot Analyse mit einem Antikörper gegen acetyliertes α -Tubulin

Acetyliertes α -Tubulin wurde in allen Fraktionen nachgewiesen. Neben einer prominenten α -Tubulin-Bande bei 54 kDa kommt bei den Fraktionen 1 bis 8 noch eine darunterliegende schwächere Bande bei ca. 51 kDa hinzu. In den Fraktionen 2 bis 9 ist zusätzlich eine höhermolekulare Proteinbande bei ca. 90 kDa zu sehen, vermutlich Tubulin-Dimere. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

Das Ergebnis des Immunofluoreszenz-Assays bestätigte den Befund der Western Blot Analysen. In diesem Experiment wurden Proben der 20 Fraktionen der Gradientenzentrifugation auf Deckgläschen absedimentiert. Zudem wurden die Photorezeptorzellen einer Rattenretina auf ein Deckgläschen übertragen. Anschließend folgte eine Immunofluoreszenzmarkierung mit dem monoklonalen Anti-Centrin Antikörper (mAb Klon 20H5). Der Anti-Centrin Antikörper reagiert spezifisch mit dem Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplex des Cilienapparates von Photorezeptorzellen (Abb. 12c, Wolfrum, 1995; Wolfrum und Salisbury, 1998). Die Centriole des Cilienapparates erscheint dabei als „punktförmige“ Markierung, das Verbindungscilium mit Basalkörper als „strichförmige“ Markierung (Abb. 12c). Anhand dieser spezifischen Reaktion konnte die Anreicherung der Cilienapparate in den Fraktionen 15 bis 17 visualisiert und verifiziert werden (Abb. 12b).

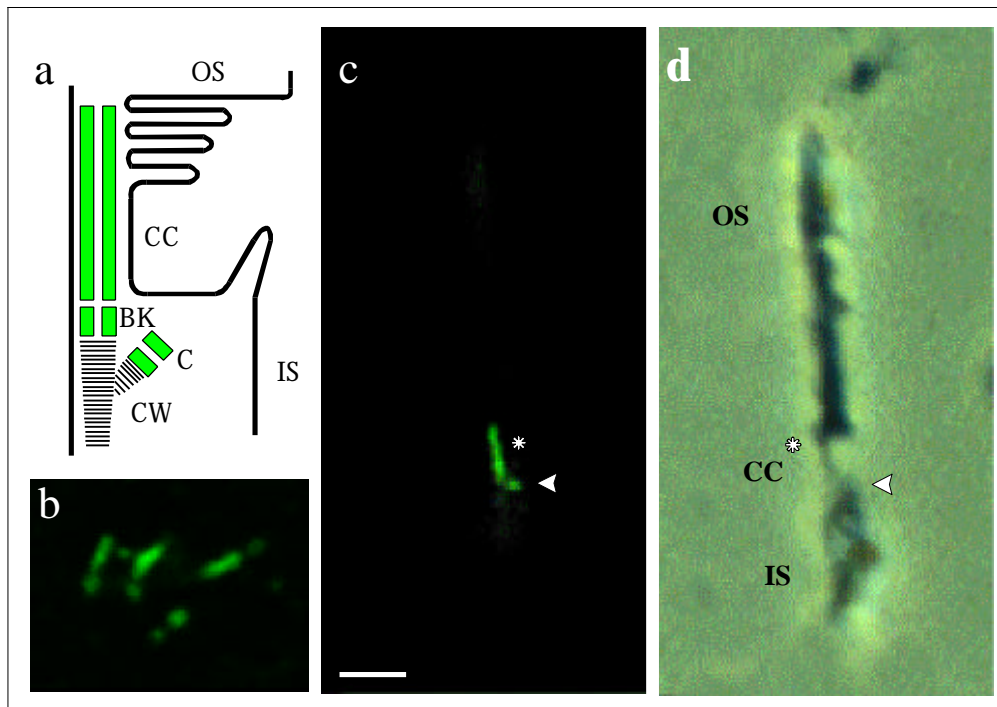


Abb. 12: Immunofluoreszenzmikroskopische Lokalisation von Centrin

a: Schematische Darstellung des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle. **b:** Indirekte Immunofluoreszenzmarkierung von isolierten Cilienapparaten mit dem Anti-Centrin Antikörper (Klon 20H5). Das Verbindungscilium mit Basalkörper und die Centriole sind immunmarkiert. **c:** Indirekte Immunmarkierung des Verbindungsciliums mit Basalkörper (weißer Stern) und der Centriole (weiße Pfeilspitze) einer isolierten Photorezeptorzelle der Ratte. **d:** Korrespondierendes Phasenkontrastbild. BK: Basalkörper; OS: Außensegment einer Photorezeptorzelle; CC: Verbindungscilium; CW: Cilienwurzel; C: Centriole, IS: Innensegment einer Photorezeptorzelle; **b:** Maßstrich: 8 μm .; **c** und **d:** Maßstrich 6 μm

3.1.3 Western Blot Analyse von isolierten Cilienapparaten mit Antiseren gegen

Cytoskelettproteine und photorezeptorspezifische Proteine

Bei diesem Experiment wurde die Proteinzusammensetzung der isolierten Cilienapparate mit Antikörpern gegen photorezeptorspezifische Proteine und Cytoskelettproteine analysiert (Abb. 13). Wie erwartet konnten Antikörper gegen α -Tubulin, acetyliertes α -Tubulin und γ -Tubulin diese Proteine bei ihren entsprechenden Molekulargewichten detektieren (ca. 52 kDa, 55 kDa und 50 kDa, Abb. 13). Das Cytoskelettprotein Aktin wurde bei einem Molekulargewicht von 42 kDa detektiert, welches dem Molekulargewicht von allen bisher beschriebenen Aktinisoformen entspricht (Vandekerckhove, 1999). Das unkonventionelle Motorprotein Myosin VIIa als Proteinbande von ca. 220 kDa nachgewiesen. Aber auch Calcium-Bindungsproteine wie Calmodulin oder Centrin liegen mit dem Cilienapparat assoziiert vor. Überdies wurden die photorezeptorspezifischen Proteine Opsin und Arrestin in der Fraktion mit isolierten Cilien nachgewiesen. Diese Proteine werden intrazellulär durch das Verbindungsciliums transportiert und dürften dabei in Assoziation mit dem Cytoskelett des Ciliums vorliegen (Philip et al., 1987; Brann und Cohen, 1988; Whelan und McGinnis, 1988; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000).

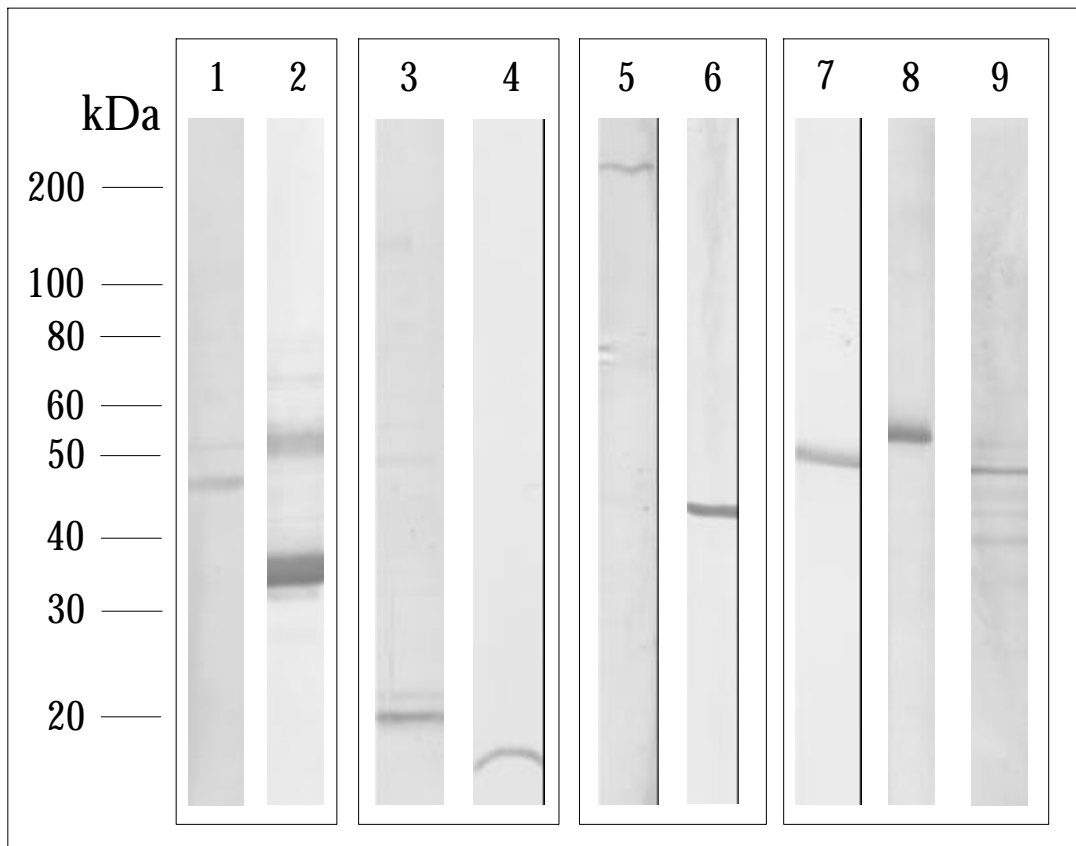


Abb. 13: Primäre Charakterisierung der Proteinzusammensetzung isolierter Cilienapparate

Jeweils 20 µg Protein isolierter Cilienapparate wurden in einem 8-20% Gradientengel in einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran gebロットet. Folgende Proteine wurden nachgewiesen: die photorezeptorspezifischen Proteine Arrestin (1) bei ca. 46 kDa und Stäbchen-Opsin (2) bei 38 kDa. Die Calcium-Bindungsproteine Centrin (3) bei 20 kDa und Calmodulin bei 18 kDa (4). Myosin VIIa (5) bei ca. 220 kDa und Aktin (6) bei 42 kDa, Tubuline: nicht-acetyliertes α -Tubulin bei ca. 50 kDa (7), acetyliertes α -Tubulin bei ca. 55 kDa (8) und γ -Tubulin (9) bei ca. 50 kDa; kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

Ein SDS-PAGE mit aufgetrennten Proteinen von Photorezeptorzell-Fragmenten (Spur 1) und isolierten Cilienapparaten (Spur 2) wurde mit Coomassie angefärbt, um die Proteinbanden beider Proben zu visualisieren (Abb. 14). Die Probe mit den isolierten Cilienapparaten weist weniger Proteinbanden auf. Diese enthält Cytoskelettproteine und mit dem Cytoskelett der Cilienapparate assoziierte Proteine. Lösliche Proteine und Membranproteine wurden durch die Detergenzextraktion und nachfolgende Dichte-Gradientenzentrifugation abgetrennt (Fleischmann et al., 1980; Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Stäbchen-Opsin ist auch in dieser Probe enthalten und dürfte im Verbindungscilium in Assoziation mit Myosin VIIa vorliegen (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Der Vergleich beider Proben zeigt, daß bei der Isolierung der Cilienapparate gleichzeitig eine Anreicherung von ciliären Proteinen von Photorezeptorzellen erfolgt. Dadurch können Proteine mit einem geringen Expressionsniveau, wie Centrin oder Myosin VIIa, in der Cilienfraktion besser identifiziert werden, als in Proteinextrakten isolierter Retinae.

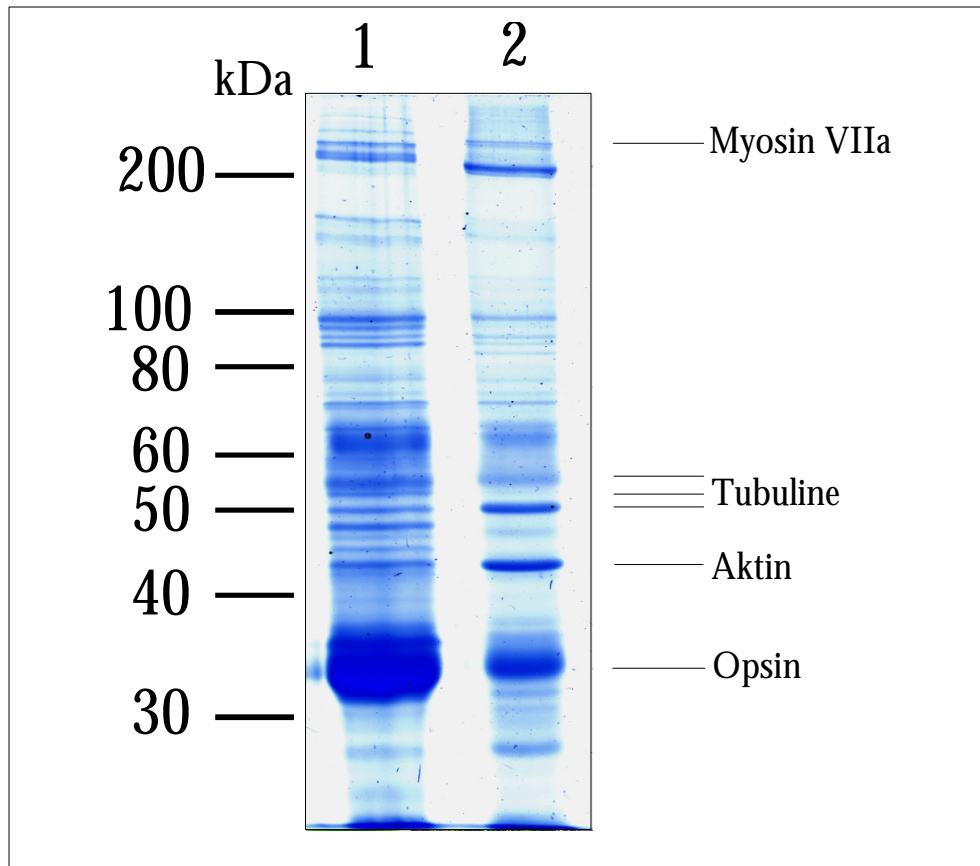


Abb. 14: SDS-PAGE isolierter Photorezeptorzellen und Cilienapparate

Auftrennung isolierter Photorezeptorzell-Fragmente (Spur **1**) und Cilienapparate (Spur **2**) von Rinderretinae in einem 12% Polyacrylamidgel und nachfolgende Coomassiefärbung der Proteine. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

3.1.4 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Das in der vorliegenden Arbeit vorgestellte modifizierte Protokoll wurde erfolgreich zur Präparation von Außensegmenten und Isolierung der Cilienapparate eingesetzt. Die Cilienapparate wurden durch Western Blot Analysen und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung mit dem gut charakterisierten monoklonalen Anti-Centrin Antikörper eindeutig identifiziert (Baron et al., 1992; Wolfrum, 1995). Insgesamt wurden Photorezeptorzell-Fragmente von ca. 800 Rinderretinae präpariert und ca. 5-6 mg isolierte Cilienapparate gewonnen. Zudem wurden in Western Blot Analysen die Proteine der Cilienapparate primär analysiert, wobei wie erwartet bereits bekannte Cytoskelettproteine identifiziert werden konnten. Darüberhinaus zeigt die Coomassiefärbung aufgetrennter Cilienproteine zahlreiche weitere Proteinbanden (Abb. 14). Cilienapparate von Photorezeptorzellen dürften aus wesentlich mehr Proteinkomponenten aufgebaut sein, als bisher bekannt sind. Die Cilienpräparation wurde anschließend zur Herstellung des polyklonalen Antiserums AX4 eingesetzt. Das AX4-Antiserum sollte dann Antikörper gegen die verschiedenen Proteinkomponenten des Verbindungsciliums enthalten, unter anderem auch gegen Cytoskelettproteine und Proteine, die mit Cytoskelettkomponenten interagieren.

3.2 Herstellung und Charakterisierung des AX4-Antiserums

Zur Herstellung des polyklonalen AX4-Antiserums wurde ein Kaninchen mit jeweils 0,25 mg der isolierten Cilienapparate immunisiert. Die primäre Immunisierung und der erste Boost nach 14 Tagen erfolgte mit komplettem Adjuvanz, der zweite und dritte Boost mit inkomplettem Adjuvanz nach 28 und 56 Tagen. Nach 34 Tagen wurde die erste Testblutung, nach 62 Tagen die zweite Testblutung entnommen. Das Kaninchen wurde 80 Tage nach der primären Immunisierung durch Herzpunktion ausgeblutet.

Die Sera der Testblutungen und der Endblutung wurden im Vergleich zum Präimmunsersum in Western Blot Analysen auf ihre Reaktivität mit retinalen Proteinen getestet. Dadurch wurde festgestellt, ob eine immunologische Kreuzreaktivität des Präimmunsersums mit retinalen Proteinen vorliegt. Geprüft wurde dies anhand der Reaktivität der Sera mit Proteinen der verschiedenen Fraktionen der Aufreinigung der Photorezeptorzellen (Probe 1 bis 4) und der Cilienfraktion (Abb. 15).

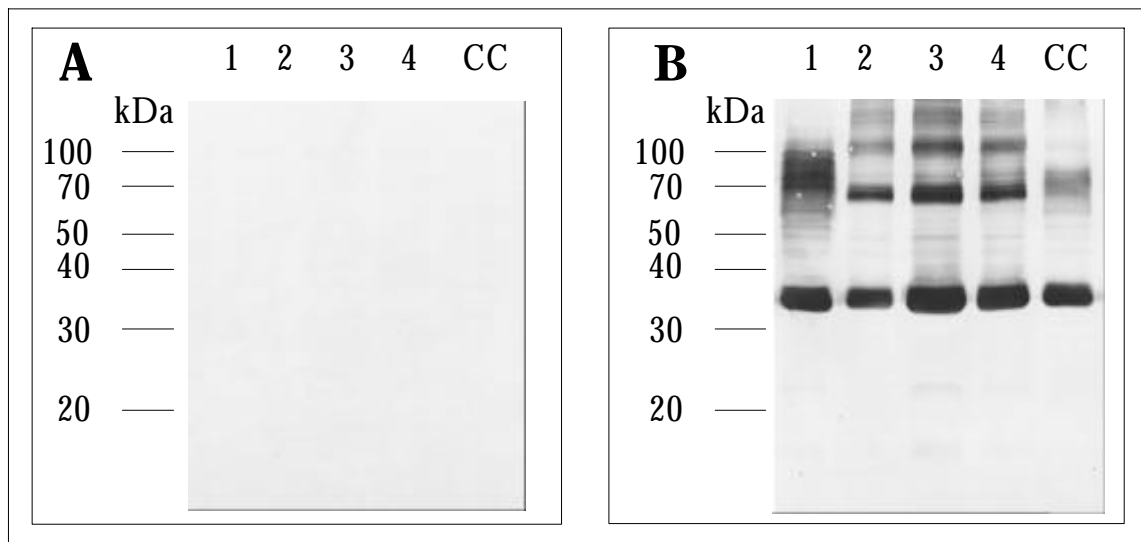


Abb. 15: Analyse des Immunisierungsverlaufs bei Herstellung des polyklonalen AX4-Antiserums. 20 µg Protein der Proben 1 bis 4 der Aufreinigung der OS/OS-IS und isolierte Cilienapparate wurden in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. **(A):** Inkubation im Präimmunsersum, **(B):** Inkubation im Serum der ersten Testblutung. Beim Präimmunsersum erfolgte keine Reaktion mit retinalen Proteinen, beim Serum der ersten Testblutung hingegen ist eine deutliche Immunreaktion sichtbar. 1-4: Proben 1 bis 4 der Aufreinigung der Außensegmente der Photorezeptorzellen mit zunehmender Reinheit (OS/OS-IS); CC: isolierte Cilienapparate von Photorezeptorzellen. kDa: Molekulargewicht

Jeweils eine Blotmembran wurde im Präimmunsersum und im Serum der ersten Testblutung inkubiert. Abbildung 15a zeigt, daß das Präimmunsersum keine Antikörper enthält, die mit Proteinen von Photorezeptoren der Rinderretinae kreuzreagieren. Die retinalen Proteine werden aber durch Antikörper im Serum der ersten Testblutung detektiert, da das Kaninchen durch die aktive Immunisierung Antikörper gegen die verschiedenen Proteine der Cilienfraktion erzeugt hat (Abb. 15b). Entsprechend der Erwartung stieg die Reaktivität des Serums der zweiten Testblutung und der Endblutung an. Abbildung 16 zeigt, daß einzelne mit dem AX4-Antiserum

detektierte Banden identifiziert werden konnten. Das AX4-Antiserum wurde anschließend an Protein-A-Agarose gereinigt, um den Hintergrund durch unspezifische Bindungen zu verringern. Alle weiteren Experimente wurden mit dem gereinigten AX4-Antiserum durchgeführt.

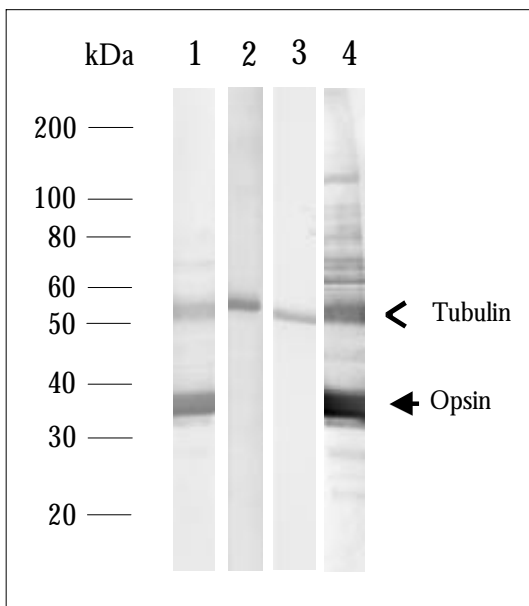


Abb. 16: Reaktivität des AX4 Antiserums mit molekularen Proteinkomponenten der Cilienapparate

Die Blotstreifen wurden in folgenden Antiseren inkubiert: **1:** Stäbchen-Opisin, **2:** acetyliertes α -Tubulin, **3:** nicht-acetyliertes α -Tubulin, **4:** AX4-Antiserum. Das AX4-Antiserum enthält unter anderem Antikörper gegen Stäbchen-Opisin (schwarzer Pfeil), und möglicherweise auch gegen Tubulin (offene Pfeilspitze). kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

Darüberhinaus wurde die Reaktivität des gereinigten AX4-Antiserums an Kryostatschnitten durch die Retina einer Ratte geprüft. Dabei wurde gleichzeitig eine Doppelmarkierung mit dem monoklonalen Anti-Centrin Antikörper (mAb Klon 20H5) durchgeführt. Centrin ist in den Zellen der neuronalen Retina von Vertebraten in prinzipiell zwei verschiedenen Domänen lokalisiert (Abb. 17 a). Einerseits reagieren die Antikörper gegen Centrin spezifisch mit Epitopen im Verbindungscilium. Dies resultiert in einer „strichförmigen“ und „punktförmigen“ Markierung. Dabei handelt es sich um das Verbindungscilium mit Basalkörper und zugehöriger Centriole. Andererseits sind in den Zellen der proximalen neuronalen Retina paarig angeordnete „punktförmige“ Markierungen zu sehen. Dabei handelt es sich um die beiden Centriolen der Centrosome von Bipolarzellen, Horizontalzellen und Amakrinzellen. Die Antikörper des AX4-Antiserum reagieren mit Epitopen zwischen den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen (Abb. 17b). Aufgrund der durchgeführten Doppelmarkierung kann die AX4-Immunmarkierung den Verbindungscilien und Basalkörper-Centriolen-Komplexe der Cilienapparate der Photorezeptorzellen zugeordnet werden.

Die Western Blot Analysen und indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen mit dem AX4-Antiserum zeigen, daß das polyklonale Antiserum vermehrt Antikörper enthält, die gegen Struktur-komponenten des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen gerichtet sind. Daher sollte es möglich sein, in einem Immunoscreening-Ansatz Klone zu isolieren, die für Proteine kodieren, welche am Aufbau des Cytosketts des Verbindungsciliums beteiligt sind.

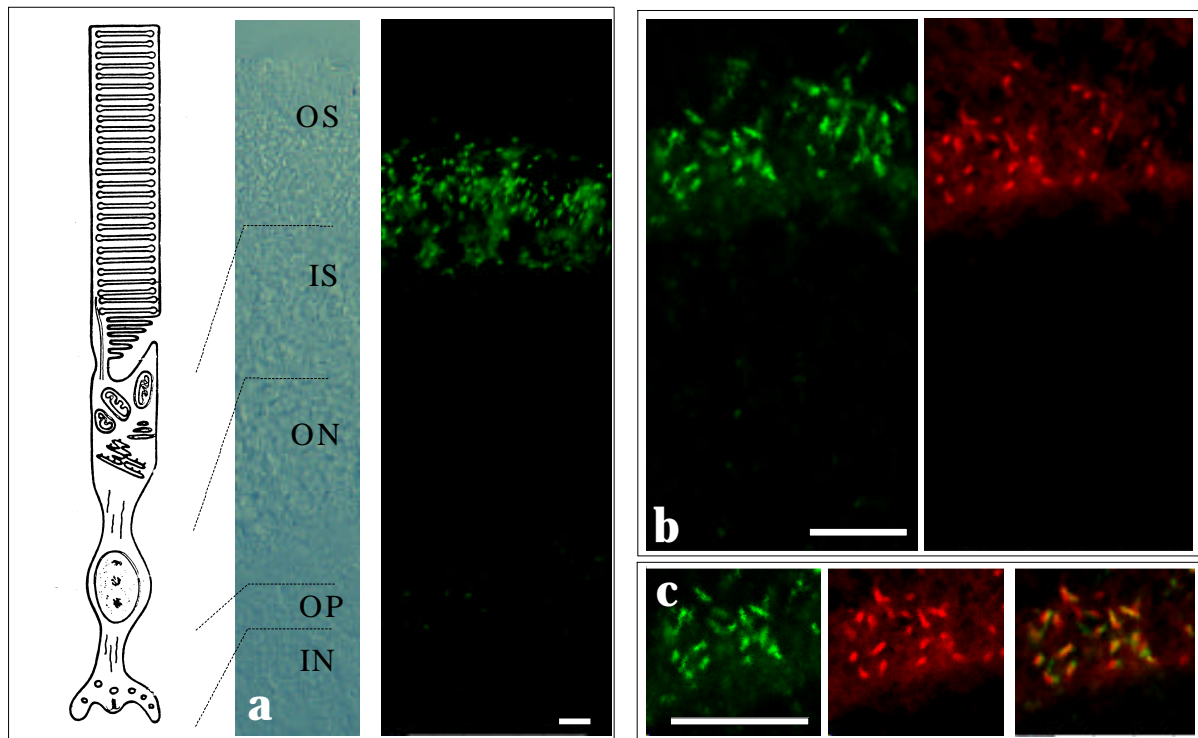


Abb. 17: Doppel-Immunofluoreszenz von AX4 und Centrin in der Rattenretina.

(a): differentieller Interferenzkontrast und Anti-Centrin Immunofluoreszenz-Markierung der Verbindungscilien und des Basalkörper-Centriolen-Komplexes von Photorezeptoren einer Rattenretina. (b): indirekte Anti-Centrin und Anti-AX4 Immunofluoreszenz-Markierung der Verbindungscilien und des Basalkörper-Centriolen-Komplexes des Cilienapparates der Photorezeptorzellen c): Details von b, sowie Übereinanderlagerung der Centrin- und AX4-Immunmarkierung. Die Doppelmarkierung zeigt, daß die Antikörper des AX4 Antiserums mit Proteinen des Cilienapparates reagieren. Zudem erfolgt in geringem Ausmaß eine Reaktion mit Proteinen im Außensegment der Photorezeptorzellen. OS: Außensegment der Photorezeptorzellen, IS Innensegment der Photorezeptorzellen. ON: äußere nukleäre Schicht; OP: äußere plexiforme Schicht, IN: innere nukleäre Schicht, Maßstrich: 6 μm .

3.3 Immunoscreen und primäre Analyse der isolierten cDNA-Klone

3.3.1 Durchmusterung der retinalen cDNA-Bank mit dem AX4-Antiserum und partielle Sequenzierung der Klone

In vorangegangenen Experimenten wurde die Reaktivität des AX4-Antiserum in Western Blot Analysen und indirekten Immunofluoreszenz-Markierungen getestet. Das polyklonale AX4-Antiserum reagiert mit Proteinen im Cilienapparat einer Photorezeptorzelle.

Zunächst wurde der aktuelle Titer der Rattenretina cDNA-Expressionsbank bestimmt. Dann wurden 12 NZY-Platten mit ca. 2×10^4 pfu (plaque forming units) plattiert und von jeder Platte ein Filterabzug hergestellt. Die Filter wurden gewaschen, blockiert und im AX4-Antiserum inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch alkalische Phosphatase gekoppelte sekundäre Antikörper, die wiederum durch eine Reaktion von BCIP/NBT sichtbar gemacht wurden. Die positiven Signale auf den Filtern konnten entsprechenden Plaques auf den NZY-Platten zugeordnet, und anschließend isoliert werden. Beispielhafte Filterabzüge sind in Abbildung 18 dargestellt.

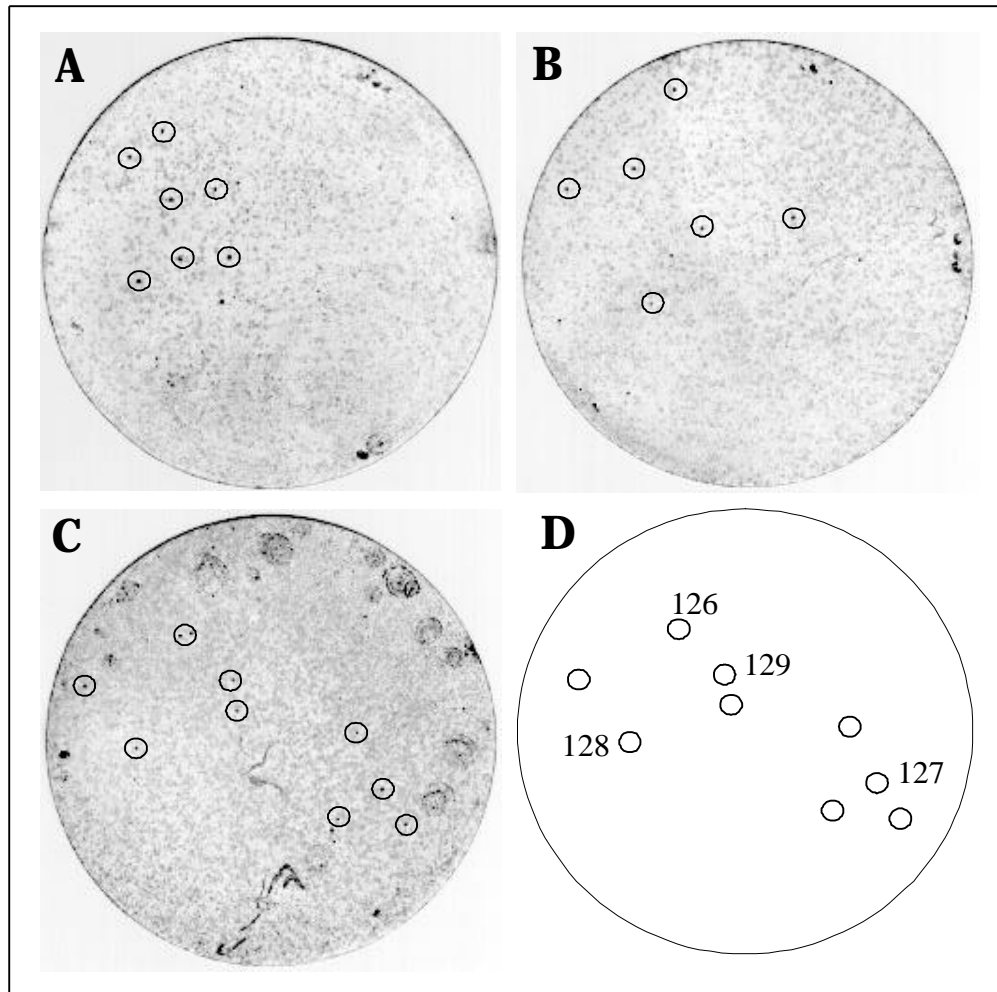


Abb. 18: Filterabzüge des Immunoscreens der zweiten Einzelplaqueisolierung

A, B und **C**: Auf den Membranen 4 (**A**), 5 (**B**) und 8 (**C**) befinden sich positive Signale, die sich vom Hintergrund hervorheben (umrahmt). Die positiven Signale konnten korrespondierenden Plaques auf den jeweiligen NZY-Platten zugeordnet werden. Die Phagenplaques wurden aus dem Agar isoliert und eine Einzelkolonie-Ausselektion durchgeführt. **D**: zeigt nochmals die Markierungen von Membran Nr. 8 (**C**), wobei den einzelnen Plaques die Nummern der gepickten Klone zugeordnet wurden.

Bei der primären Durchmusterung der cDNA-Bank wurden ca. 240.000 pfu getestet. Dabei reagierten Antikörper des AX4 Antiserums mit den Expressionsprodukten von 284 Phagenplaques. Diese wurden aus dem Agar ausgestochen und zunächst 20 dieser primär isolierten Plaques einer sekundären Durchmusterung unterzogen und Einzelplaques isoliert. Diese Klone wurden ausgeschleust und die 5'- und 3'-terminalen Nukleotidsequenzen der cDNA-Inserts bestimmt. Die Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte durch Homologievergleiche mit den Nukleotid-Sequenzdatenbanken der EMBL-Gendatenbank unter Verwendung des Programms FASTA (Pearson und Lipman, 1988) und der Sequenzdatenbank von NCBI mit dem Programm BLAST (Altschul et al., 1997).

Um die Größe der cDNA-Inserts der isolierten Klone zu bestimmen, wurden durch Restriktionsverdauung mit den Enzymen EcoRI und XhoI die cDNA-Inserts aus dem Vektor pBluescript SK(-) isoliert. Durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauung konnten die

Größen der cDNA-Inserts durch einen Vergleich mit einer ebenfalls aufgetragenen DNA-Leiter ermittelt werden (Abb. 19). Die Analyse ergab, daß die cDNA-Inserts der Klone eine Größe von 0,3 bis maximal 3,6 kb, durchschnittlich jedoch von ca. 1,2 kb aufwiesen (Tab. 9).

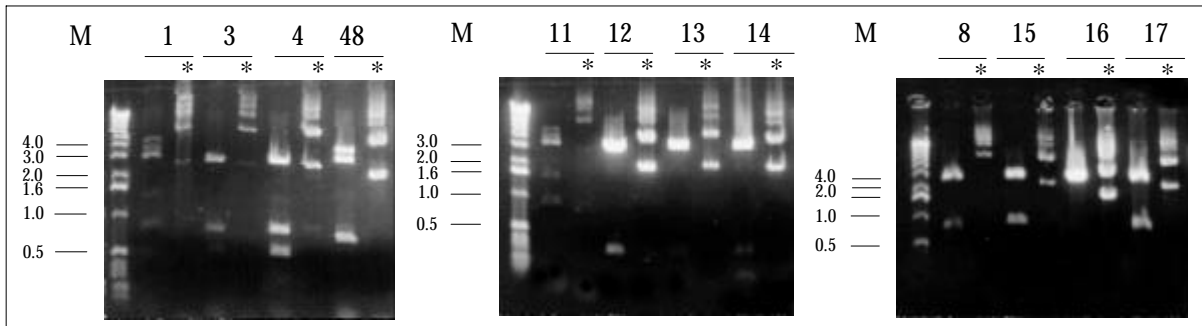


Abb. 19: Bestimmung der Insertgröße der isolierten cDNA-Klone

Die Klone wurden in der Reihenfolge ihrer Isolierung durchnummeriert. Zur Größenbestimmung des cDNA-Inserts wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI verdaut. Beim Verdau entstand ein Fragment von 3 kb (Vektor pBluescript SK(-)), und die Banden der cDNA-Inserts. Bei den Klonen Nr. 1, 3, 4, 48, 8, und 16 ist ein cDNA-Insert von mehr als 200 bp enthalten, diese Klone wurden sequenziert. Die Spuren verdauter DNA ist in der Abbildung mit * gekennzeichnet. Beim Vorhandensein interner Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme EcoRI oder XhoI entstanden mehr als zwei Fragmente (Klon Nr. 4). M: Marker in Kilobasen.

Bei der ersten Einzelplaque-Isolierung und Ausschleubung wurden 84 Klone (Klone AS1 bis AS84) isoliert und davon zunächst 20 Klone ausgewählt und sequenziert (Tab. 9). Wie erwartet befanden sich unter diesen Klonen bereits Duplikate. Da die Klone aus einer unidirektionalen oligo(dT)-geprimten cDNA Bank isoliert wurden, kodieren sie für das gleiche Gen und haben identische 3'-terminale cDNA-Sequenzen. Dennoch unterscheiden sich diese am 5'-Ende aufgrund der unterschiedlichen Größe der cDNA-Inserts (z. B die Arrestin- und Stäbchen-Opsin-Klone). Um zu verhindern, daß vorhandene Klone die für bereits bekannte Gene kodieren, erneut sequenziert werden, wurden die cDNA-Inserts dieser Klone zur Herstellung von DIG-markierten cDNA-Sonden eingesetzt. Diese Sonden wurden dann als „Mix“ in einer Dot Blot Analyse verwendet, um die nächsten 20 Klone auf Duplikate hin zu testen (Abb. 20). Anschließend wurden nur negativ-getestete Klone sequenziert. Waren darunter erneut Klone mit Homologien zu bereits bekannten Genen, so wurden von diesen Klonen ebenfalls DIG-markierte cDNA-Sonden hergestellt und diese dem Sondenmix hinzugefügt.

Insgesamt wurden drei Einzelplaque-Isolierungen durchgeführt, wobei jeweils 20 bis 30 der primär isolierten Plaques bearbeitet wurden. Dies resultierte in 257 Klonen, die sequenziert und in Datenbankrecherchen analysiert wurden. Die Ergebnisse der Homologievergleiche sind in Tabelle 9 dargestellt.

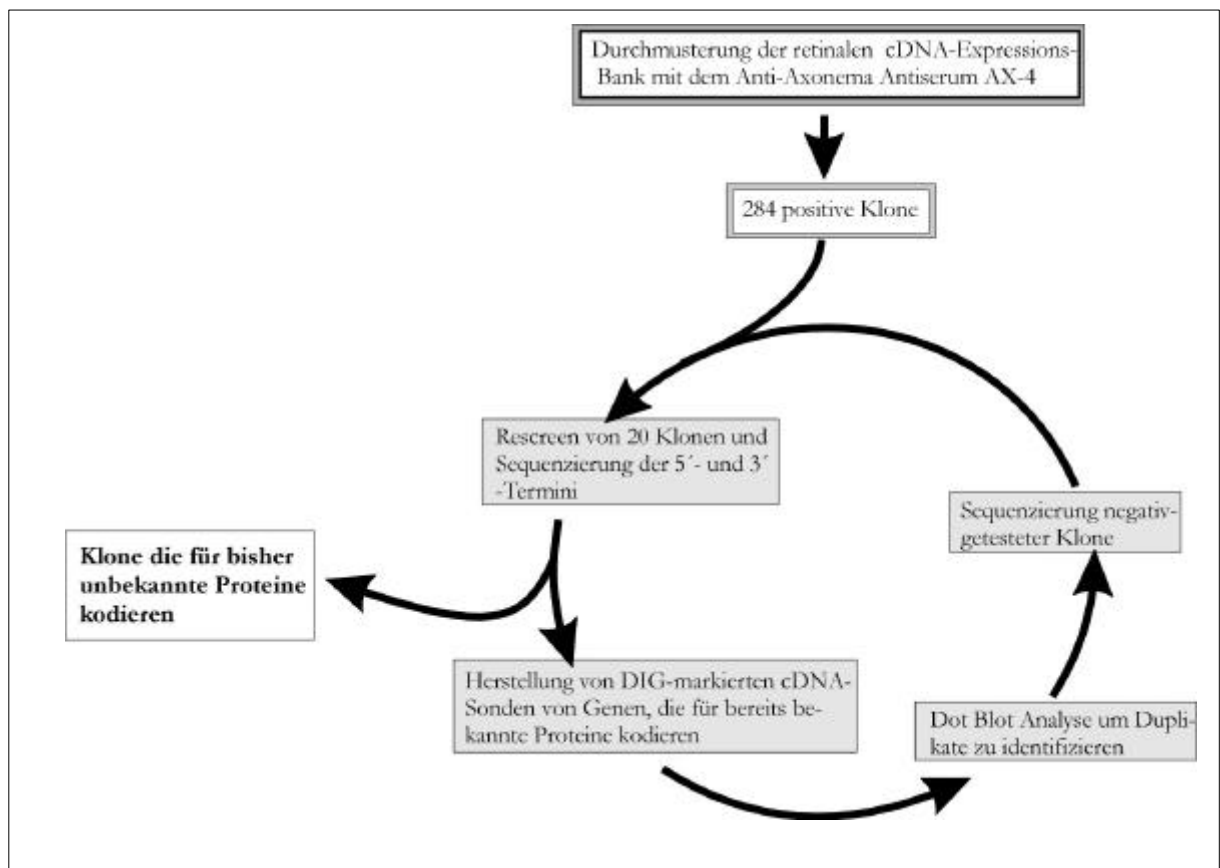


Abb. 20: Schematische Darstellung der Analyse von cDNA-Klone

Zunächst wurden 20 Klone einem Sekundärscreen unterzogen und Einzelplaques isoliert. Nach Präparation der Plasmid-DNA wurden die 5'- und 3'-Termini der Klone sequenziert, und durch Homologievergleiche mit in Gendatenbanken vorhandenen Sequenzen analysiert. Klone, die für bereits bekannte Proteine kodieren wurden aussortiert, die cDNA-Inserts isoliert und DIG-markierte cDNA-Sonden hergestellt. In einer Dot-Blot Analyse wurden die nächsten 20-30 Klone auf Duplikate hin analysiert, und anschließend nur negativ getestete Klone sequenziert.

Tab. 9: cDNA-Klone isoliert im Immunoscreen einer retinalen Expressions-cDNA-Bank der Ratte mit dem Anti-Axonema Antiserum AX-4

Klone	Repräsentation in der cDNA Bank	Größe (kb)	Identität zu:	Genbank Accession	% Identität	Sequenziert (bp)	„overlap“ (bp)	Organismus
Klone, die für Fragmente photorezeptorspezifische Proteine kodieren								
AS1, AS4, AS5, AS8	0,0016	1,4, 1,5,	Arrestin/S-antigen	X51781	92	775	380	<i>R. norvegicus</i>
AS15, AS32, AS33, AS35, AS36, AS39, AS47, AS54, AS60	0,0066	0,9 bis 1,7	Stäbchen-Opisin (Rhodopsin)	RN22180	95	284	280	<i>R. norvegicus</i>
AS56, AS88, AS99	0,00125	1,2 bis 1,6	Stäbchen cGMP-regulierter Kationenkanal	U93851	97	701	696	<i>R. norvegicus</i>
AS62	0,00083	1,0	Kalziumkanal (Gehirn)	X67655	66	547	112	<i>O. cuniculus</i>
AS103, AS115	0,00083	1,2	cGMP-regulierter Kationenkanal	U76220	91	600	398	<i>R. norvegicus</i>
AS185	0,00041	1,0	Stäbchen-Transducin	X63449	70	380	311	<i>H. sapiens</i>
AS204	0,00041	0,9	„proton pump polypeptide mRNA“	RATPRPU	90	588	545	<i>R. norvegicus</i>
Klone, die für Teilbereiche cytoskeletaler Proteine oder Proteinen, die mit dem Cytoskelett assoziiert vorliegen kodieren								
AS11	0,00041	2,3	Centrin 3	NM 007684	96	428		
AS85, AS100	0,00083	0,8	ss-RNA-Bindungs Protein	F25451_2	98	781	400	<i>H. sapiens</i>
AS97	0,00041	1,6	HSP90	S45392	94	818	814	<i>R. norvegicus</i>
AS118	0,00041	0,4	Microtubuli-Bindungsprotein EB2	U51204	86	284	269	<i>M. musculus</i>
AS42, AS128	0,00041	1,0, 1,2	Humanes Homolog von <i>Drosophila</i> flightless I	U01182	86	1200	1188	<i>H. sapiens</i>
AS129	0,00041	0,3	Humanes Dynamitin	U50733	78	291	156	<i>H. sapiens</i>
AS189	0,00041	0,8	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 4 (MAP4)	M72414	89	376	336	<i>M. musculus</i>
AS206	0,00041	0,9	cytoplasmisches Dynein Intermediärkette 2C	RNU39046	97	624	70	<i>H. sapiens</i>
Klone mit Homologien zu EST's								
AS37	0,00041	0,8	vh92g03.r1 Knowles solter mouse	MM1311253	57	685	147	<i>M. musculus</i>
AS38	0,00041	1,6	vo69d07.r1 Barstedt mouse	Aa615385	85	817	318	<i>M. musculus</i>
AS48	0,00041	0,3	<i>Rattus norvegicus</i> cDNA EST clone	AI030636	98	300	298	<i>R. norvegicus</i>
AS50	0,00041	1,2	vi29g10.r1 Barstedt mouse	MM1313496	83	1194	604	<i>M. musculus</i>
AS58	0,0041	0,7	zv10d11.r1 soares mouse NhmPuSI	HS1224549	95	650	346	<i>M. musculus</i>
AS61	0,00041	1,5	vt52h03.r1 Barstedt mouse	Aa711009	80	750	423	<i>M. musculus</i>
AS86	0,00041	2,7	Ko mouse embryo cDNA clone	MM1276673	98	706	185	<i>M. musculus</i>
AS87	0,00041	0,8	yr92a05.s1 cDNA	HS656221	71	594	188	<i>H. sapiens</i>
AS92	0,00041	1,2	EST cDNA clone	T84255	52	438	172	<i>H. sapiens</i>
AS94	0,00041	1,5	Human EST clone	X92219	43	290	222	<i>H. sapiens</i>
AS125	0,00041	1,8	mouse EST cDNA clone	MM1260536	40	998	245	<i>M. musculus</i>
AS142	0,00041	3,1	vf1e03.r1 soares mouse Nb	Aa420167	85	780	499	<i>M. musculus</i>
AS200	0,00041	1,0	Human mRNA KIAA0266 Gen	D87455	68	998	125	<i>H. sapiens</i>
AS201	0,00041	0,7	PPEF-1	AF023456	97	755	273	<i>H. sapiens</i>
AS208	0,00041	1,7	Aa964506 UI-R-CO-gv-e-11-O-UI.sl UI-R	AA964506	99	338	273	<i>R. norvegicus</i>
AS210	0,00041	0,9	mx02a05.r1 Soares mouse NM	Aa244510	78	391	390	<i>M. musculus</i>
AS213	0,00041	1,5	vk72h12.sl Knowles Solter mouse EST	Aa547107	76	432	357	

Klone, die für bereits bekannte Proteine kodieren

AS93	0,00041	1,1	Ubiquitin		90	401	214	<i>R. norvegicus</i>
AS55	0,00041	1,2	cytosolische Aspartat Aminotransferase	RNCASPAT	97	599	580	<i>R. norvegicus</i>
AS89	0,00041	0,5	Calcineurin-B ähnlich	C06646	97	460	233	<i>R. norvegicus</i>
AS90	0,00041	1,5	Ornithin Decarboxylase	D10706	94	764	541	<i>R. norvegicus</i>
AS91, AS120, AS180	0,00041	1,6-1,7	Cytochrom C Oxidase Untereinheit I	M27315	98	394	387	<i>R. norvegicus</i>
AS93	0,00041	1,1	Serin Palmytoyl Transferase	X95642	92	342	277	<i>M. musculus</i>
AS95	0,00041	3,2	Rezeptor für hyaluron-vermittelten Transport	U87983	92	953	820	<i>R. norvegicus</i>
AS116	0,00041	3,6	Phosphorybosyl Pyrophosphatase (PAP4)	D84434	75	897	653	<i>R. norvegicus</i>
AS181, AS216	0,00083	1,4-1,6	Thioredoxin Reduktase	RNU73525	95	513	490	<i>R. norvegicus</i>

Klone ohne Homologien zu in Datenbanken vorhandenen cDNA-Sequenzen

AS12, AS21, AS31, AS44, A52 AS65, AS78, AS80, AS81, AS83, AAS95; AS96, AS98, AS101, AS102, AS107, AS109, AS110, AS112; AS113, AS114, AS117; AS119, AS120, AS121, AS122, AS123, AS124, AS126, AS127, AS130; AS133, AS134, AS185, AS188, AS 191, AS196, AS202, AS204, AS208, AS 210, AS213, AS231, AS233, AS234, AS235, AS237, AS238, AS239, AS312,

nicht sequenzierte Klone (Dot-Blot Ergebnis positiv)

AS2, AS3, AS6, AS26; AS40; AS42, AS43; AS65, AS66, AS73, AS75, AS78, AS80, AS130, AS132, AS136, AS138, 144, AS146, AS148, AS150, AS152, AS154, AS156, AS158, AS160, AS162, AS164, AS166, AS168, AS170, AS172, AS174, AS176, AS178, AS203, AS207,

3.3.2 Analyse der isolierten Klone

Bei Durchmusterung der Rattenretina cDNA-Expressionsbank mit dem AX4-Antiserum wurden Klone isoliert, die folgenden Gruppen zugeordnet werden können (siehe auch Tab. 9):

1. Klone, die für Fragmente von photorezeptorspezifischen Proteinen kodieren (Arrestin, Stäbchen-Op sin, Transducin, cGMP-regulierte Kationenkanäle, Abb. 21)
2. Klone, die für Fragmente von bereits bekannten Proteinen kodieren (Cytochrom C Oxidase, Thioredoxin Reduktase, u. a. Abb. 21)
3. Klone mit Homologien zu EST's¹ („expressed sequence tags“)
4. Klone, die keine Homologien zu in Datenbanken vorhandenen Sequenzen aufweisen, und nicht identifiziert werden konnten. Diese Klone werden regelmäßig erneut Datenbankrecherchen unterzogen, da ständig neue Sequenzeinträge erfolgen (Stand der Analysen: November 2000).
5. Klone, die für Fragmente von Cytoskelettproteinen, oder mit dem Cytoskelett assoziierte Proteine kodieren

Die Analyse der isolierten Klone zeigt, daß Phagenklone, deren cDNA-Inserts für Fragmente von Proteinen der Signaltransduktionskaskade kodieren, in der retinalen cDNA-Bank wie erwartet überrepräsentiert sind. Unter den ca. 240.000 durchmusterten Klonen befanden sich trotz Dot-Blot Analyse 10 Klone, die für Stäbchen-Op sin kodierten. Da das Außensegment der Photorezeptorzellen ständig erneuert wird, unterliegt auch das Membranprotein Op sin einer hohen Umsatzrate. Dementsprechend hoch ist auch die Zahl an Op sin-mRNA in der mRNA-Präparation, die zur Herstellung der cDNA-Bank eingesetzt wurde. Stäbchen-Op sin ist mit einem Proteinanteil von ca. 85% das prominenteste Protein in Außensegmenten von Photorezeptorzellen (Fleischmann et al., 1980; Fleischmann, 1981; Molday, 1998). Überdies weisen die Western Blot Analysen der Cytoskelettfraktion von isolierten Cilienapparaten darauf hin, daß Stäbchen-Op sin mit dem Cytoskelett des Verbindungsciliums assoziiert vorliegen dürfte (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000).

Demgegenüber waren Klone, die für Cytoskelettproteine kodieren, nur zu 0,0033% unter den isolierten Klonen vertreten. Cytoskelettproteine unterliegen vergleichend zu Proteinen der Signaltransduktionskaskade einer geringen Umsatzrate. Berücksichtigt man den Titer, so wurde

¹ EST's: „Expressed sequence tags“ sind Klone, die aus cDNA-Banken isoliert, und meist im Rahmen von Genom Sequenzierungsprojekten sequenziert werden. Eine cDNA-Bank wird hergestellt, indem aus einem Gewebe die mRNA-isoliert, und in cDNA umgeschrieben wird. Diese cDNA-Fragmente werden dann in z. B. Phagenvektoren kloniert und amplifiziert. Da die cDNA-Bank ausgehend von mRNA hergestellt wurde, wird davon ausgegangen, das enthaltene Klone für Proteine oder Proteinfragmente kodieren, und diese werden daraufhin als „expressed sequence tags“ (exprimierte Sequenzfragmente) bezeichnet. Die Sequenzen dieser Klone werden in Gendatenbanken zur Verfügung gestellt und auf Homologien zu bekannten Genen hin analysiert. Im Zuge des Human und Maus Genom Sequenzierungsprojektes stehen zahlreiche dieser EST-Sequenzen in Gendatenbanken zur Verfügung, wobei diese oftmals keine Homologien zu bekannten Genen aufweisen, und die Natur des von ihnen kodierten Proteinfragments unbekannt ist (Marra et al., 1998).

die Expressions-cDNA-Bank insgesamt einmal durchmustert. Tabelle 10 zeigt in einer Übersicht die berechneten prozentualen Anteile der verschiedenen Klone in der Rattenretina cDNA-Bank.

Im Immunoscreen isolierte Klone	Anzahl	prozentualer Anteil bezogen auf die Gesamtzahl der durchmusterten Klone
bekannte photorezeptorspezifische Proteine	23	0,0095%
bekannte nicht-photorezeptorspezifische Proteine	34	0,0141%
bisher unbekannte Cytoskelettproteine des Cilienapparates	8	0,0033%
Homologien zu EST's	18	0,0075%
keine Homologien zu bekannten Genen in der Datenbank	33	0,0133%

Tab. 10: Analyse der prozentualen Anteile der isolierten Klone in der retinalen Expressions-cDNA-Bank der Ratte

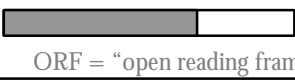









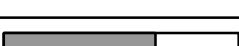

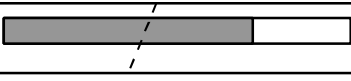

Klon AS1 mit 98% Identität zu Ratten Retina S-Antigen (Arrestin) (X51781)	1,4 kb	
Klon AS15 mit 95% Identität zu Ratten Retina Opsin (RN22180)	1,0 kb	
Klon AS56 mit 97% Identität zu Ratten Retina cGMP-regulierter Kationenkanal (U93851)	1,5 kb	
Klon AS62 mit 66% Identität zu einem Ratten Kalziumkanal (Gehirn, X67655)	1,0 kb	
Klon AS185 mit 70% Identität zu H. sapiens Stäbchen-Transducin (X63449)	1,0 kb	
Klon AS204 mit 90% Identität zu Ratten "proton pump polypeptide" (RATPRPU)	0,9 kb	
Klon AS55 mit 97% Identität zu Ratten cytosolischer Aspartat Aminotransferase (RNCASPAT)	1,2 kb	
Klon AS89 mit 97% Identität zu Ratten Calcineurin B (C06646)	0,5 kb	
Klon AS90 mit 94% Identität zu Ratten Ornithin Decarboxylase (D10706)	1,2 kb	
Klon AS91 mit 98% Identität zu Ratten Cytochrom C Oxidase Untereinheit I (M27315)	1,6 kb	
Klon AS93 mit 92% Identität zu Maus Serin Palmytoyl Transferase (X95642)	1,1 kb	
Klon AS95 mit 92% Identität zu Ratten Rezeptor für hyaluron-vermittelten Transport (U87983)	3,2 kb	
Klon AS116 mit 75% Identität zu Ratten Phosphoribosyl Pyrophosphatase (PAP4, D84434)	3,6 kb	
Klon AS181 mit 99% Identität zu Ratten Thioredoxin Reduktase (RNU73525)	1,4 kb	

Abb 21: Isolierte Klone, die für bereits bekannte Proteine kodieren

Dargestellt sind die Homologien und Größe der cDNA-Inserts, der potentielle Leserahmen ist in grau eingezeichnet.









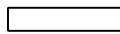
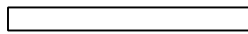
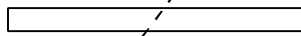
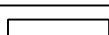





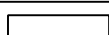
Von Klonen, die nur Homologien zu EST's oder keine Identitäten zu in Datenbanken vorhandenen Sequenzen aufwiesen, wurden die potentiellen Leserahmen bestimmt (ORF 1 bis 3; ORF engl.: "open reading frame"). Anschließend wurden mit den partiellen Proteinsequenzen die Proteinsequenzdatenbanken bei NCBI und EMBL (SWISSPROT) durchsucht. Darüberhinaus wurden die Aminosäuresequenzen mit dem Programm PROSITE im Programmpaket PCGene auf mögliche Proteinmotive hin untersucht. Diese Analyse ergab, daß z. B. Klon AS85 für ein Fragment eines ss-RNA-bindenden Proteins („ss“ = single strand) kodiert (Abb. 22).

Darüberhinaus konnten mehrere Klone identifiziert werden, die für Fragmente bisher unbekannter Proteine kodieren, die am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums beteiligt sein dürften (Abb. 22). Bei diesen Klonen handelte es sich um:

1. Klone, die für C-terminale Aminosäurebereiche von Mikrotubuli-Bindungsproteinen kodieren: Klon AS118 ist homolog zum C-Terminus des Maus APC-Bindungsproteins EB2 (end binding protein 2) und Klon AS189 kodiert für den Teilbereich des mikrotubuli-assoziierten Proteins 4 (MAP4).
2. Die Klone AS42 und AS128 kodieren für Fragmente eines Aktinbindungs-Proteins, homolog zu *D. melanogaster Flightless I*.
3. Klon AS129 mit Homologie zu Dynamitin, Proteinkomponente des Dynactin-Komplexes, und Klon 206 kodiert für die Intermediärkette 2C von cytoplasmatischem Dynein
4. Klone mit Homologien zu einem RNA-Bindungsprotein (Klon AS 85, AS100) und HSP90 (Klon AS97)
5. Klon AS11 kodiert für einen Teilbereich von Ratten Centrin 3.

Durch Anwendung eines kombinierten biochemisch-molekularbiologischen Ansatzes konnten bisher acht verschiedene Klone isoliert und identifiziert werden, die für Proteine kodieren, welche am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums beteiligt sein könnten: AS11, AS42/AS128, AS85/AS100, AS97, AS118, AS129, AS189, AS206. Die Antikörper des polyklonalen AX4-Antiserums reagierten im Immunoscreen mit den Expressionsprodukten dieser Klone. Dieser Ansatz stellt somit eine lohnende Alternative zu Methoden wie z. B. differentielle Hybridisierung, Durchmusterung von Subtraktionsbibliotheken, oder die kontinuierlichen Sequenzierung von Klonen aus cDNA-Banken dar, um bisher unbekannte Proteinkomponenten spezifischer Zellen oder Strukturen zu identifizieren und zu isolieren (z. B. Swanson et al., 1997; Soto-Prior et al., 1997). Insgesamt wurden 206 der 257 isolierten Klone sequenziert. Dieser Ansatz birgt die Möglichkeit, daß weitere bisher unbearbeitete primär isolierte Klone für Proteine kodieren, die am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums

beteiligt sind. Klone, die bisher nicht identifiziert werden konnten, werden regelmäßig mit BLAST bei NCBI analysiert (Stand der Analysen: November 2000).

Klon AS85 mit 98% Identität auf Proteinebene zum humanen ss-RNA-Bindeprotein F25451_2	0,8 kb		ORF = "open reading frame"
Klon AS93 mit ~90 % Identität zu Ratten Ubiquitin	1,1 kb		
Klon AS97 mit 94% Identität zu Ratten HSP90 (S45392)	1,6 kb		
Klon AS118 mit 86% Identität zu Maus mikrotubuli/APC-Bindeprotein EB2 (U51204)	0,4 kb		
Klon AS28 mit 86% Identität zu Drosophila Fli I (U00182)	1,2 kb		
Klon AS129 mit 78% Identität zu Human Dynamin (U50733)	0,3 kb		
Klon AS189 mit 89% Identität zu Maus MAP4 (mikrotubuli-assoziiertes Protein 4, M72414)	0,8 kb		
Klon AS206 mit 97% Identität zu human cytopl. Dynein Intermediärkette (RNU39046)	1,0 kb		
Klon AS142 mit 85 % Identität zum humanen EST vf1e03.r1 (Aa420167)	1,0 kb		
Klon AS125 mit 40% Identität zum Maus EST-Klon (MM1260536)	1,8 kb		
Klon AS86 mit 98% Identität zum Maus EST-Klon MM1276673	2,7 kb		
Klon AS37 mit 57% Identität zum Maus EST-Klon MM1311253	0,8 kb		
Klon AS38 mit 85% Identität zum Maus EST-Klon Aa615385	1,6 kb		
Klon AS48 mit 98% Identität zum Ratten EST-Klon AI030636	0,3 kb		
Klon AS50 mit 83% Identität zum Maus EST-Klon MM1313496	1,2 kb		
Klon AS58 mit 85% Identität zum humanen EST-Klon HS1224549	0,7 kb		
Klon AS61 mit 85% Identität zum Maus EST-Klon Aa71009	1,5 kb		
Klon AS87 mit 71% Identität zum humanen EST-Klon HS656221	0,8 kb		

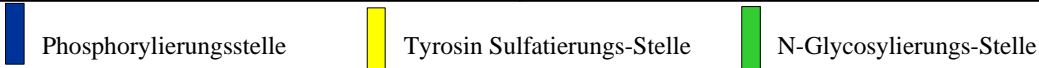


Abb. 22: Auswahl von isolierten cDNA-Klonen mit Homologien zu Genen, die potentiell für Protein-Komponenten des Verbindungsciliums kodieren

Dargestellt ist eine Auswahl von Klonen mit ihren potentiellen Leserahmen und Proteinmotiven. Ausgehend von diesen Klonen wurde eine weitere Auswahl getroffen. Die Leserahmen sind in grau eingezeichnet, die identifizierten Proteinmotive farbig hinterlegt.

3.4 Charakterisierung ausgewählter Klone

Unter den Klonen, die für bisher unbekannte Proteinkomponenten des Verbindungsciliums kodieren, wurde eine Auswahl getroffen. Analysen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, daß neben dem axonemalen Mikrotubuli-Cytoskelett und damit assoziierten Proteinen, das Aktin-Cytoskelett und aktin-assoziierte Proteine im Verbindungscilium funktionell von Bedeutung sind.

Daher wurde Klon AS128 zur Bearbeitung ausgewählt (Klon AS42 wurde erst 10/2000 als Flightless-Klon identifiziert). Dieser Klon kodiert für ein Fragment des Aktin-Bindungsproteins Flightless. Zudem wurde Klon AS118 in Ansätzen analysiert und wird zunächst vorgestellt.

3.4.2 APC-Bindungsprotein Rn EB2

3.4.2.1 Klon AS118 kodiert für Rn EB2

Klon AS118 enthält ein cDNA-Insert von 284 bp. Der Homologievergleich mit BLAST ergab eine Sequenzidentität von 83% zum 3'-Ende des Maus APC-Bindungsproteins EB2 (APC: "adenomatous polyposis coli"-Protein, Genbank MMU51204, EB2: „end binding protein 2“). Mm *EB2* ist ein Vertreter der EB/RP-Familie. Diese Gene dieser Familie kodieren für Proteine, die mit Mikrotubuli assoziiert vorliegen können, und an den C-Terminus des APC-Proteins (oder dessen Homologe) binden (Su et al., 1995; Berrueta et al., 1998; Morrison et al., 1998). Weitere Proteine dieser Familie (EB1) interagieren unter anderem mit Komponenten des Dynactinkomplexes, der mit dem Motorprotein cytoplasmatisches Dynein assoziiert vorliegen kann, sowie mit einer Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein (Berrueta et al., 1999). Zunächst sollte die vollständige kodierende Sequenz des Ratten Retina EB2-Homologs kloniert werden. Dazu wurde das 284 bp cDNA-Insert von Klons AS118 zur Herstellung einer DIG-markierten cDNA-Sonde verwendet, und diese zur Durchmusterung der Rattenretina cDNA-Bank eingesetzt. Bei der primären Durchmusterung wurden ca. 20.000 pfu analysiert, und 16 positive Phagenplaques gepickt. Nach der Einzelplaqueisolierung, Ausschleusung und Selektion durch Dot-Blot Analyse wurden positive Klone sequenziert, und zwei Klone mit Homologien zu Mm *EB2* identifiziert: Klon AS433 und Klon AS426.

3.4.2.2 Klonierung der kodierenden Sequenz von Ratten EB2

Sequenzierung und Homologievergleich der Nukleinsäuresequenzen der Klone AS433 und AS426 ergab folgendes Ergebnis: Klon AS433 umfaßt 871 bp, kodiert für ein 3'-terminales cDNA-Fragment von Ratten *EB2* (83% Identität zu Maus *EB2* ab Position 636), und weist überwiegend nichtkodierende cDNA-Sequenzabschnitte hinter dem Stopkodon auf. Klon AS426 hingegen enthält ein cDNA-Insert von ca. 1,5 kb und ist zu Maus *EB2* ab Position 72 homolog. Klon AS426 kodiert für ein Protein von 199 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von 22521 Da. Das Startkodon (ATG) fehlt. Aber ein im Leserahmen 3 liegendes Stopkodon ist vorhanden (Position 601-603 (TGA)) und entspricht dem Stopkodon von Maus *EB2*. Durch Kombination der Nukleinsäuresequenzen beider Klone ergab sich folgende cDNA-Sequenz von Rn *EB2* (Abb. 23):

MmEB2	CACTTGAGGAAGGTCAAGTTCCAGGCCAAACTAGAACACGAGTACATCCACAACCTCAAGGTGCTG	66
MmEB2	GCAAGCAGCTTTCAAGAAGATGGGTGTTGA-CAAAATCATTCCTCGTAGAGAAGTTAGTGAAAGGAA	131
RnEB2	CCGTCTAGACTAGTGGTCCCAGGCTGCAGGATTCGGCACGAG-----GTGAAAGGAA	52
MmEB2	AATTCCAAGATAAATTTGAGTTTATACAGTGGTTTAAAGAAATTCCTTTGACGCAAACATATGATGGAA	197
RnEB2	AATTCCAAGATAAATTTGAGTTTATTCAGTGGTTTAAAGAAATTCCTTTGACGCAAACATATGATGGAA	118
MmEB2	AGGATTACAACCCTCTGCTGGCGCGGCAGGGCCAGGACGTAGCACCACCTCCTAACCCAGGTGATC	263
RnEB2	AGGATTACAACCCTCTGCTGGCGCGGCAGGGCCAGGACGTAGCACCACCTCCTAACCCAGGTGATC	184
MmEB2	AGATCTTCAACAAATCCAAGAAACTCATTTGGCACAGCAGTTCCTCGAGGACGTCCCCACAGGCC	329
RnEB2	AGATCTTCAACAAATCCAAGAAACTCATTTGGCACAGCAGTTCCTCGAGGACGTCCCCACAGGCC	250
MmEB2	CCAAGAACATGCAGACCTCTGGACGACTCAGCAACGTGGCTCCGCCCTGCATCCTCCGGAAGAATC	395
RnEB2	CCAAGAACATGCAGAACCTCTGGCCGACTCAGTAACGTAGCTCCACCCTGCATCCTCCGGAAGAATC	316
MmEB2	CCCCCTCAGCCCAGAACGGTGGCCATGAGGCTGACGCCAGATCCTCGAGCTTAACCAGCAGCTGC	461
RnEB2	CCCCCTCAGCCCAGAACGGTGGCCATGAGGCTGATGCCAGATCCTTGAACCTCAACCAGCAGCTGC	382
MmEB2	TGGACTTGAAGCTGACCGTAGACGGGCTTGAGAAAGAACGAGATTTCTATTTTCAGCAAATTCGCAG	527
RnEB2	TGGACTTGAAGCTGACCGTAGATGGGCTTGAGAAAGAACGGGATTTCTATTTTCAGCAAATTCGCAG	448
MmEB2	ACATCGAGCTGATCTGCCAGGAACATGAGAGCGAGAACAGCCCCGTGCATCTCGGGCATCATTGGCA	593
RnEB2	ACATCGAGCTGATCTGCCAGGAACATGAAAGTGAGAACAGCCCCGTGCATCTCGGGCATCATTGGCA	514
MmEB2	TTCTCTATGCCACGGAGGAGGGATTTGCACCCCCCTGAGGATGATGAGATTGAAGAACACCAACAGG	659
RnEB2	TTCTCTATGCCACGGAGGAGGGATTTGCACCCCCCTGAGGATGATGAGATTGAAGAACACCAACAGG	580
MmEB2	AAGACCAGGACGAGTACTGAGGGACGCGCCAGCCCTGGCTGACCACAGCTTCCCAGCCACCTCCA	725
RnEB2	AAGACCAGGACGAGTACTGAGGGACGAGCCAGCCCTGGCTGACTGCGGCTTCCATGCCACCCCGA	646
MmEB2	CTCTGCCACCCCAACTATGCCACCCCAATTATAGTCCTTTCCCTTTTCAGCCAGTCAGCCAGCTG	791
RnEB2	CTCTGCCACCCCA-----CATTATAGTCCTTTCCCTTTTCAGCCAGTCAGCCAGCTG	697
MmEB2	GGTGCTTTGTGTGTCAGTGCCACAGCAITAGGGAGCCGACGAGTGGGGTTTCAGGGTGGTGGGGGAGG	857
RnEB2	GGTACTTTGTGTGTCAGTGCCACAGCAITAGGGAGCCGGGCGAGTGGGGCTCGGGGCGGGGAATTGGG	763
MmEB2	CTTGGGCAGGT-----GAGAGGACGAGGCCCTGTCTGGGTCCCCGAGTGGCACTGGCCCA	913
RnEB2	GTTGGGGAGGTTTGGGCAGGTGAGAGGATGAGGCCCTCTCTGGGTCCCCAAGTGGCACTGGCCCA	829
MmEB2	GGGGACGTCCAGGACCCCTGTCCACTCCCCACTCCTATTTATTTCCGTTGTCTCTATGCTGTGTTG	979
RnEB2	GGG-ACGTCCAGGACCCCTGTCCACTCCCC--TCCTATTTATTTCCGTTGTCTCCATGCTGTGTTG	893
MmEB2	GCCAACACTTTCCAGGGTGCCGCTGTACCCACAAGCCAGCCACCTGCTCCCAGCCAGCCAGCAGC	1045
RnEB2	GCCAACACTTTCCAGGGTGCCACTGTACCCACAAGCCAGCCACCTGCTCCCAGCCAGCCAGCAGC	959
MmEB2	TGTATATTTGACAAAGTCATTTGGTATATTTTTACTTACTGGATTGCCCTTGCACTTTACCTGTTCT	1111
RnEB2	TGGATATTTGACAAAGTCATTTGGTATATTTTTACTTACTGGATTGCCCTTGCACTTTACCTGTTCT	1025
MmEB2	TTTCCAGGGCTGACAGCAGGGCTTGGGGTAGTCTTTCTGGCTTGGCTCCCCCTCCCTAGAGCCGAG	1177
RnEB2	TTTCCAGGGCTCACAGCAGGGCTTGGGGCAGTCTTTCTGGCATGGCTCCCCCTCCCTAGAGCCGAG	1091
MmEB2	ACTGGGACAGGACTCACCCATTTCTTATTTATTTTGTCTTTTGTACTTCTCTCTCAGTAGATGAGGGA	1243
RnEB2	ACTGGGGCAGGACTCACCAATTTCTTATTTATTTTGTCTTTTGTACTTCTCTCCAGTAGTTGAGGGA	1157
MmEB2	AAGGCTGATATGAGGAAAGGGGAAGGGAAGCTGAGGAGGCAGTGTCTTGGGTCCAGGGAGCATGCG	1309
RnEB2	AAGGCTGCATGAGG-AGGGGGAAGGGAAGCTGAGGAGGCAGTGTGTGGGTCCAGGGA-----	1215
MmEB2	AGAGTAGACATGACCTCCAGGCACTGGGCTCCCCACCAAG-CCCCTGCCTCAGCACCACACCCA	1374
RnEB2	---GTAGACATGACCTCCAGGCACTGGGCTCCCCAACCAGGGCCCCCTGCCTCAGCACTGAAACCCA	1278
MmEB2	GCACTGCCCCAGGCTTCCTAGCCANTCCCTCCTGCAGCCTAGTTAGACCACACAGANTTTGCCTGG	1440
RnEB2	GCACTCCCCAGGCTTCC-ATCCACTCCCTCCTGCAGCCTGGTTATACCACACAGACTCTGCCTGG	1343
MmEB2	CCCCCATTTGTCTGTTTGTCCCC-CATTTTNTCAC--CCCCACCTTTGCCCTTG--GGCAACCAGC	1501
RnEB2	CCCCCATTTGTCTGTTTGTCCCCAAATTTCTCCACCTCCCCACCTTTGCCCTTGCTCCACCAGC	1409
MmEB2	CTGCATATNTGTTTCAGTTTTATTTAAATAAAATTTGTGTGGCA	1545
RnEB2	GTGCACATGCGTTCACTTTTATTTAAATAAAATGTGTGTGG--	1451

Abb. 23: Nukleinsäuresequenz von Ratten *EB2* im Vergleich zu Maus *EB2*

A.: ClustalW-Homologievergleich der cDNA-Sequenz von *M. musculus EB2* mit der Nukleinsäuresequenz von Ratten *EB2*. Die cDNA-Sequenz von Ratten *EB2* konnte anhand der Kombination der cDNA-Sequenzen der Klone AS433 und AS426 erstellt werden. Identische Sequenzabschnitte sind hellgrau hinterlegt, das Stopkodon ist (TGA) ist unterstrichen.

3.4.2.3 Sequenzanalyse von Rn EB2p

Die Aminosäuresequenz von Rn EB2p liegt fast vollständig vor (Abb. 24). Im ClustalW-Homologievergleich weist Rn EB2p eine Identität von 95% zu Mm EB2p auf (Tab. 11). Am N-Terminus liegt ein hoher Konservierungsgrad vor, im mittleren Bereich hingegen treten starke Variationen in der Aminosäuresequenz auf (Abb. 25). Wie erwartet ist der Konservierungsgrad zwischen Mm EB2p und Rn EB2p (EB2-Subfamilie) höher als zwischen den einzelnen Mitgliedern der EB/RP-Proteinfamilie (EB1-, EB2-, EB3- und RP-Proteine). Zur Verdeutlichung wurde der Homologievergleich als Kladogramm (mit Hs MAPRE3 „gerootet“) dargestellt (Abb. 26).

Zur Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen Rn EB2 wäre der mittlere Abschnitt des Proteins am besten geeignet, so daß die Antikörper des Antiserums in der Lage sein müßte, spezifisch zwischen Rn EB1p und Rn EB2p zu differenzieren.

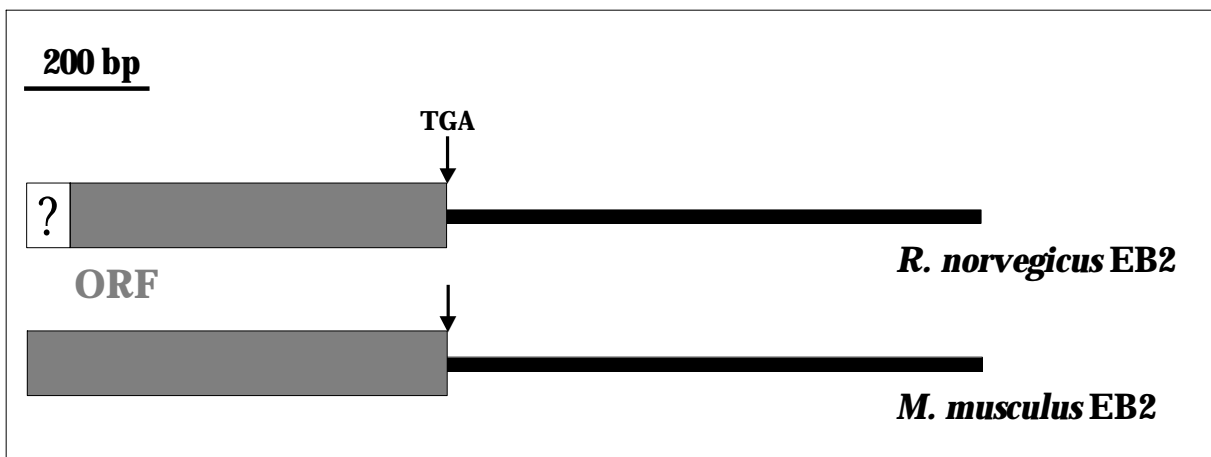


Abb. 24: Schematische Darstellung des kodierenden Bereichs von Rn EB2 vergleichend zu Mm EB2p

Am 5'-Terminus liegt die Rn EB2-cDNA-Sequenz vermutlich noch unvollständig vor. Eingezeichnet ist der Leserahmen (ORF) und das Stopkodon (TGA). Das Fragezeichen steht für den bisher unbekannt N-terminalen Bereich von Rn EB2p.

	RnEB1	RnEB2	MmEB1	MmEB2	HsEB1	HsEB3	HsMAPRE1	HsMAPRE3
RnEB1		(28%)	(32%)	(10%)	(66%)	(29%)	(32%)	(40%)
RnEB2			(45%)	(95%)	(44%)	(66%)	(45%)	(36%)
MmEB1				58%	97%	79%	98%	56%
MmEB2					57%	75%	58%	36%
HsEB1						75%	98%	55%
HsEB3							76%	69%
HsMAPRE1								56%
HsMAPRE3								

Tab. 11: Identitäten der Aminosäuresequenzen der verschiedenen Vertreter der EB/RP-Protein-familie.

Die Identitäten zu Rn EB1p und Rn EB2p sind eingeklammert, da die Aminosäuresequenzen dieser Proteine nicht vollständig vorliegen.

RnEB2	-----		
MmEB2	-----HI		2
RnEB1	MAVNVYSTSVTSDNLSRHDMLAWINESTQLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGSTIAL		58
MmEB1	MAVNVYSTSVTSDNLSRHDMLAWINESTQLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGSTIAL		58
HsEB1	MAVNVYSTSVTSDNLSRHDMLAWINESTQLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGSTIAL		59
HsEB3	MAVNVYSTSVTSENLSRHDMLAWVNDSTHLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGCVHL		58
HsmAPRE1	MAVNVYSTSVTSDNLSRHDMLAWINESTQLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGSTIAL		58
HsMAPRE3	MPVNVYSTSVTSVNLNRHDMLAWVNDSTHLNLTKEIQLCSGAAYCQF--MDMLFPGCVHL		58
	* *		
RnEB2	-----PSRLVVPGCRIRHEVKGKGFQDNFEFIQWFKKFFDA		36
MmEB2	RKVKFQAKLEHEYIHNFKVLQAAFKKMGVDKIIPVEKIVKGFQDNFEFIQWFKKFFDA		61
RnEB1	KKVKFQAKLEHEYIQNFKILQAGFKKMGITK-----		89
MmEB1	KKVKFQAKLEHEYIQNFKILQAGFKRMGVDKIIPVDKLVKGFQDNFEFVQWFKKFFDA		117
HsEB1	KKVKFQAKLEHEYIQNFKILQAGFKRMGVDKIIPVDKLVKGFQDNFEFVQWFKKFFDA		118
HsEB3	RKVKFQAKLEHEYIHNFKVLQAAFKKMGVDKIIPVEKLVKGFQDNFEFIQWFKKFFDA		117
HsmAPRE1	KKVKFQAKLEHEYIQNFKILQAGFKRMGVDKIIPVDKLVKGFQDNFEFVQWFKKFFDA		117
HsMAPRE3	RKVKFQAKLEHEYIHNFKVLQAAFKKMGVDKIIPVEKLVKGFQDNFEFIQWFKKFFDA		117
	* *		
RnEB2	NYDGKDYNPILLARQGDVAPPENPGDQIFNKSKKLIGTAVPQRTSPTGPKNMQTSGRLS		95
MmEB2	NYDGKDYNPILLARQGDVAPPENPGDQIFNKSKKLIGTAVPQRTSPTGPKNMQTSGRLS		120
MmEB1	NYDGKDYDPVAARQGETAVAPSLVAPALSKPKPLGSSST---AAPQRPIATORITAAP		173
HsEB1	NYDGKDYDPVAARQGETAVAPSLVAPALNPKPKPLTSSS---AAPQRPISTORTAAAP		175
HsEB3	NYDGKDYNPILLARQGDVAPPENPGDQIFNKSKKLIGTAVPQRTSPTGPKNMQTSGRLS		176
HsmAPRE1	NYDGKDYDPVAARQGETAVAPSLVAPALNPKPKPLTSSS---AAPQRPISTORTAAAP		173
HsMAPRE3	NYDGKDYNPILLARQGDVAPPENPGDQIFNKSKKLIGTAVPQRTSPTGPKNMQTSGRLS		176
	* *		
RnEB2	NVAPFCILRKNEPSARNGGHEADAQILELNQQLLDLKLTVDGLEKERDFYFSGKLRDIEL		121
MmEB2	NVAPFCILRKNEPSARNGGHEADAQILELNQQLLDLKLTVDGLEKERDFYFSGKLRDIEL		147
MmEB1	-KAGFGVVRKNP-GVGNCDDEA----AELMQQVNVLKLTVEDLEKERDFYFGKLRNIEL		194
HsEB1	-KAGQGVVRKNP-GVGNCDDEA----AELMQQVNVLKLTVEDLEKERDFYFGKLRNIEL		195
HsEB3	NVAPFCILRKNEPSARNGGHEADAQILELNQQLVDLKLTVDGLEKERDFYFSGKLRDIEL		203
HsmAPRE1	-KAGFGVVRKNP-GVGNCDDEA----AELMQQVNVLKLTVEDLEKERDFYFGKLRNIEL		194
HsMAPRE3	NVAPFCILRKNEPSARNGGHEA-----		198
	* *		
RNEB2	ICQEHSENSPVI SGIIGILYATEEGFAPPEDEIEEHQQEDODEY		199
MMEB2	ICQEHSENSPVI SGIIGILYATEEGFAPPEDEIEEHQQEDODEY		225
MMEB1	ICQENEGENDPVLQRIVDILYATDEGFVLPD-----GGPQEEQEEY		268
HSEB1	ICQENEGENDPVLQRIVDILYATDEGFVLPD-----GGPQEEQEEY		269
HSEB3	ICQEHSENSPVI SGIIGILYATEEGFAPPEDEIEEHQQEDODEY		281
HsMAPRE1	ICQENEGENDPVLQRIVDILYATDEGFVLPD-----GGPQEEQEEY		268
	* *		

Abb. 25: ClustalW-Homologievergleich bekannter Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie
 ClustalW-Homologievergleich der Aminosäuresequenz von Rn EB2p mit verschiedenen Vertretern der EB/RP-Proteinfamilie. Rn EB1: *Rattus norvegicus* EB1 (U75920), *Rattus norvegicus* EB2, *Mus musculus* EB1 (U51196), *Mus musculus* EB2 (U51204), *H. sapiens* EB1 (NM_016168), *H. sapiens* EB3 (AB025186), *H. sapiens* MAPR1 (NM_012325), *H. sapiens* MAPR3 (NM_012326).

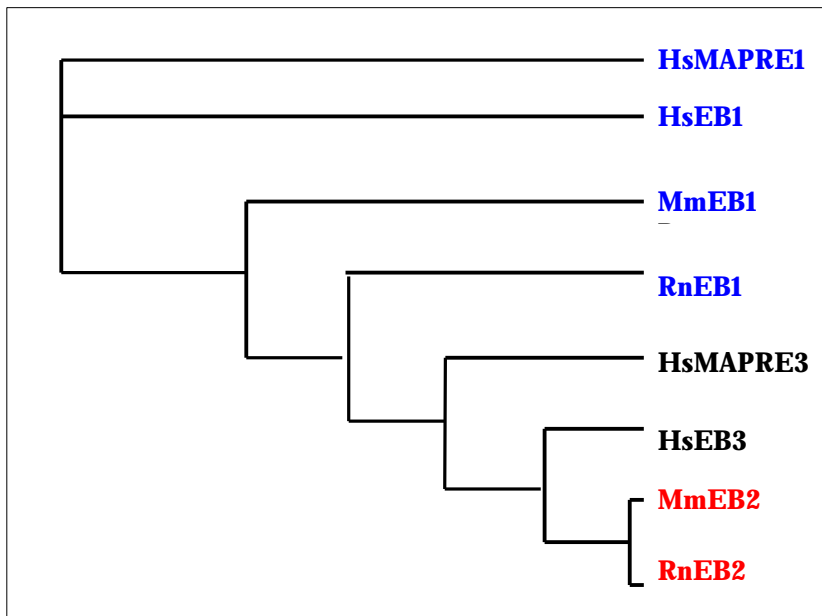


Abb. 26: Darstellung der Verwandtschaft der einzelnen Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie als Kladogramm auf der Basis eines ClustalW-Homologievergleichs.

Der isoelektrischen Punkt von Rn EB2p wurde aus den einzelnen pK-Werten der positiv geladenen (Arginin, Lysin, Histidin), negativ geladenen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und polaren ungeladenen (Cystein, Tyrosin) Aminosäuren berechnet und beträgt 4,67. Mit PROSITE wurden folgende Proteinmotive identifiziert: eine N-Glycosylierungsstelle, eine Tyrosin Sulfatierungsstelle, drei Proteinkinase C (PKC)-Phosphorylierungsstellen, eine Tyrosin Kinase Phosphorylierungsstelle und zwei N-Myristoylierungsstellen (Abb. 27). Mit dem Programm SMART unter Verwendung der Methode nach Lupas (1997) konnte in Aminosäuresequenz ein „coiled-coil“ Sequenzmotiv (Position 114-144) identifiziert werden.

MmEB2p	HLRKVKFQAKLEHEYIHNFKVLQAAFKKMGVDKIIPVEKLVKGFQDNFEFIQWFKK	FFDANY	63		
RnEB2p	PSRLVVPGCRIRHE-----VKGKFQDNFEFIQWFKK	FFDANY	37		
MmEB2p	DGKDYNPLLARQGQDVAPPNP	<u>GDQIFNKSKKLIG</u>	TAVPQRTSPTGPK	<u>KNMQTSGRLSNVAPPC</u>	126
RnEB2p	DGKDYNPLLARQGQDVAPPNP	<u>GDQIFNKSKKLIG</u>	TAVPQRTSPTGPK	<u>KNMQTSGRLSNVAPPC</u>	100
MmEB2p	<u>ILRKNP</u>	<u>PSARNGHEAD</u>	<u>AQILELNQQLLDLKLTVDGL</u>	EKERDFYFSKLRDIELICQEHESNS	189
RnEB2p	<u>ILRKNP</u>	<u>PSARNGHEAD</u>	<u>AQILELNQQLLDLKLTVDGL</u>	EKERDFYFSKLRDIELICQEHESNS	163
MmEB2p	PV	<u>ISGLIGILYAT</u>	EEGFAPPEDEIEEHQQEDQDEY		225
RnEB2p	PV	<u>ISGLIGILYAT</u>	EEGFAPPEDEIEEHQQEDQDEY		199

Abb. 27: Potentielle Proteinmotive von Rn EB2p und Mm EB2p

Die **N-Glycosylierungsstelle** ist fett, in rot und unterstrichen eingezeichnet und die **N-Myristoylierungsstellen** sind hellgrün hinterlegt. **Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen** sind gelb hinterlegt bzw. in gelb eingezeichnet. Die **Tyrosinkinase Phosphorylierungsstelle** ist in hellblau hinterlegt und die **Tyrosin Sulfatierungsstelle** in blau eingezeichnet. Zudem befindet sich bei Rn EB2p von Position 113-163 und bei Mm EB2p von Position 139-159 eine 51 Aminosäuren umfassende „coiled-coil“-Region, die in fett und unterstrichen eingezeichnet ist. Die Proteinmotive wurden mit PROSITE (Programmpaket PCGene), PROSCAN und ProtParam (bei ExPASy) identifiziert.

Die Aminosäuresequenz von Rn EB2p wurde mit dem Programm GGBSM (Programmpaket PCGene) auf Sekundärstrukturmerkmale hin analysiert. Dabei wurden helikale Bereiche (61 Aminosäurereste: 30,6%), langgestreckte Abschnitte (23 Aminosäurereste: 11,5%) und schleifenförmig vorliegende Bereiche (115 Aminosäurereste: 57,7%) identifiziert (Abb. 28). Diese

Strukturmerkmale wurden in einer PSA-Analyse bestätigt („Protein Structure Analysis Server“) RnEB2p dürfte vorwiegend in α -helikaler Struktur mit dazwischenliegenden schleifenförmigen Abschnitten vorliegen (Abb. 29).

```

1   PSRLVVPGCRIRHEVKGKFQDNFEFIQWFKKFFDANYDGKDYNPLLARQGQDVAPPNPGDQIFNKSKKL
   ***---***XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
71  IGTAVPQRTSPTGPKNMQTSGRLSNVAPPCILRKNPPSARNGGHEADAQILELNQQLLDLKLTVDGLEKE
   ---XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
141 RDFYFSKLRDIELICQEHESSENSPVISGIIGILYATEEGFAPPEDEIEEHQQEDQDEY
   XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

```

Abb. 28: Sekundärstrukturanalyse von Rn EB2p mit der GGBSM-Methode

Die Strukturmerkmale sind unterhalb der Proteinsequenz eingezeichnet. * kennzeichnet schleifenförmige, X helikale und --- langgestreckte Bereiche in der Sekundärstruktur. Die “coiled coil“-Region erstreckt sich von Position 113-139 und ist in fett hinterlegt.

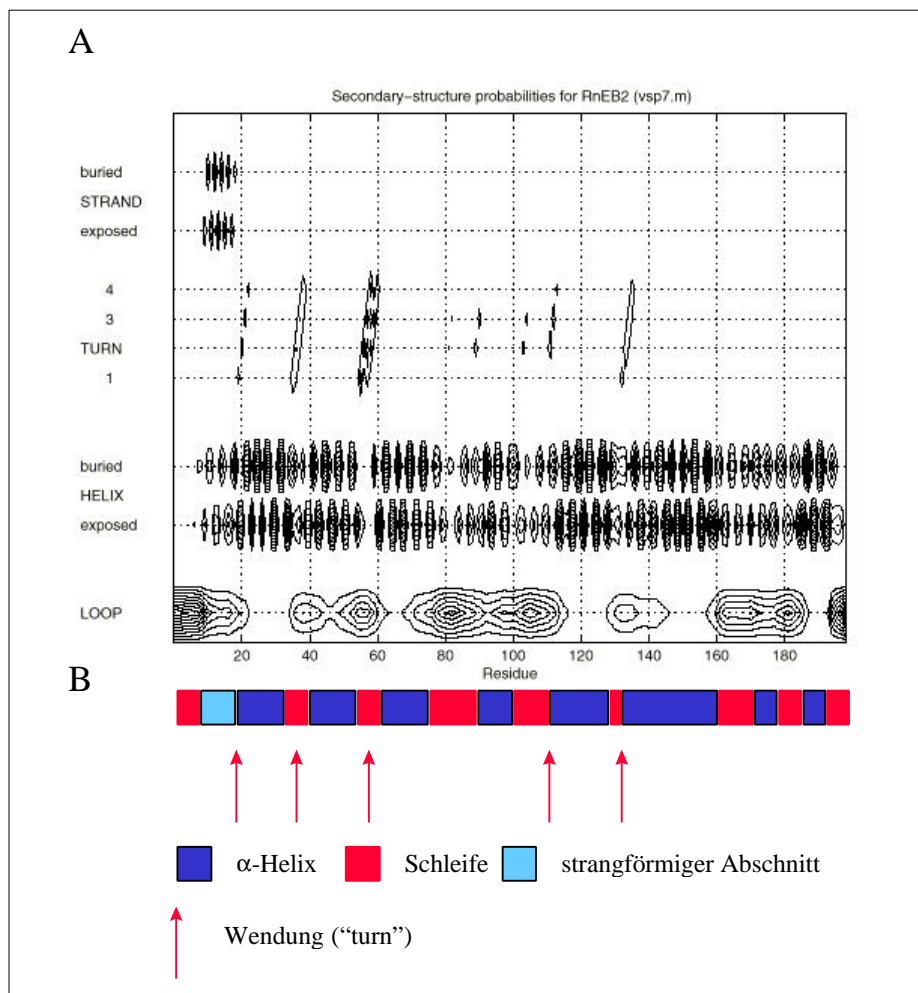


Abb. 29: Kontur-Plot der Wahrscheinlichkeit bestimmter Sekundärstrukturen in Rn EB2p

a: Wahrscheinlichkeit der Aminosäuresequenz von Rn EB2p bestimmte Sekundärstrukturen einzunehmen, Darstellung als topographische Karte von Wahrscheinlichkeiten, in die auch Informationen über die Amphipathizität eingeflossen sind. Regionen hoher Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Struktur entsprechen dunklen Bereichen mit hoher Liniendichte. Die Abstände der Linien entsprechen einem Wahrscheinlichkeitsunterschied von 0,1. **b:** Schematische Darstellung der α -helikalen Struktur mit Wendungen und strangförmigen Abschnitten. Stellen mit engen vier Aminosäurereste umfassenden Wendungen in der Proteinsequenz sind durch rote Pfeile gekennzeichnet. Die Berechnung wurde mit dem „Protein Structure Analysis Server“ durchgeführt.

3.4.2.4 Lokalisation von Rn EB2 in der Retina

Mit dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob Rn EB2p Proteinkomponente des Verbindungsciliums ist. Da zu diesem Zeitpunkt kein Antikörper gegen EB2 zur Verfügung stand, wurde ein Antikörper gegen Maus EB1p verwendet. Dieser ist gegen den C-Terminus von Maus EB1p gerichtet (Aminosäure 107 bis 268), ein Aminosäureabschnitt der bei Rn EB2p konserviert vorliegt, woraufhin der Antikörper mit EB2 kreuzreagiert (Abb. 25).

Die Antikörper gegen Maus EB1p reagieren bei indirekter Immunfluoreszenzmarkierung in der Schicht der Photorezeptoren mit einer intensiven Immunfluoreszenz. Die Markierung liegt im Bereich zwischen den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen (Abb. 30). Die topographische Lage der einzelnen „Striche“ läßt darauf schließen, daß es sich um das Verbindungscilium und den Basalkörper der Photorezeptorzelle handelt. Die Innensegmente der Photorezeptorzellen und weitere retinale Zellen wurden nicht immunmarkiert. Das Ergebnis dieses Experiments zeigt, daß Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums beteiligt sind. Aber der spezifische Nachweis von Rn EB2p im Verbindungscilium steht noch aus.

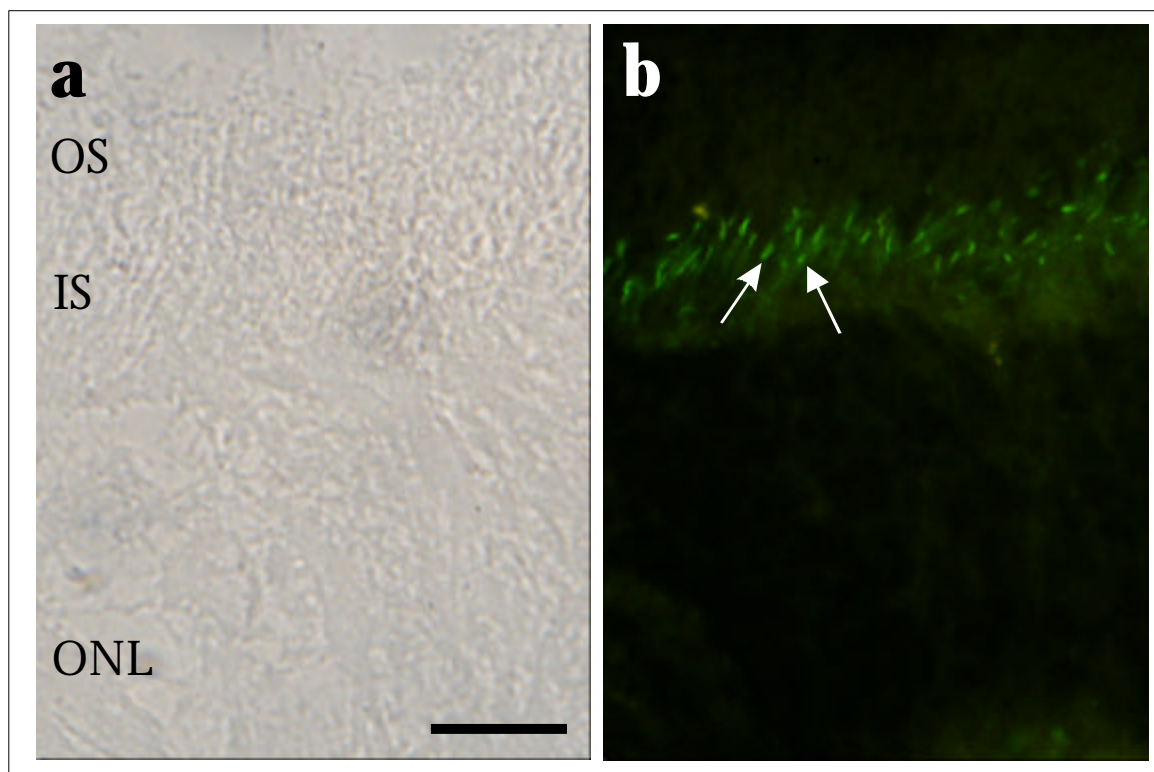


Abb. 30: Lokalisation von EB1/EB2 durch indirekte Immunfluoreszenz in der Retina einer Ratte

a: Longitudinaler Kryostatschnitt durch eine Rattenretina in differentiellem Interferenzkontrast. OS: Außensegmente der Photorezeptorzellen, IS: Innensegmente der Photorezeptorzellen, ONL: äußere nukleäre Schicht. **b:** Indirekte Anti-EB1 Immunfluoreszenz-Markierung in der Rattenretina. Die EB1-Immunfluoreszenz-Markierung ist zwischen den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen lokalisiert, es erfolgt eine Immunmarkierung des Verbindungsciliums mit Basalkörper (weiße Pfeile). Maßstrich: 15 μ m.

3.4.2.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Klon AS118 kodiert für einen C-terminalen Aminosäureabschnitt des Mikrotubuli-Bindungsproteins Rn EB2p. Bei Durchmusterung der Ratten Retina cDNA-Bank mit einer spezifischen EB2-cDNA-Sonde konnten zwei Klone mit Homologien zu *Mus musculus EB2* isoliert werden. Durch Kombination der cDNA-Sequenzen dieser Klone liegt nun fast die vollständige cDNA-Sequenz von Ratten *EB2* vor. In der Aminosäuresequenz wurden verschiedene Proteinmotive identifiziert, Rn EB2p dürfte post-translational modifiziert werden. Dennoch konnte wie bei Mm EB1p keines der bisher bekannten Mikrotubuli-Bindungsmotive identifiziert werden (Tiernauer und Bierer, 2000). Die Sekundärstrukturanalyse ergab, daß RnEB2 vorwiegend α -helikale Strukturmerkmale aufweist. Darüberhinaus zeigen die Immunfluoreszenz-Experimente mit einem Antikörper gegen EB1, daß Vertreter der EB/RP-Proteinfamilie am Aufbau des Cytoskeletts im Verbindungscilium beteiligt sind. Für eine weitere Charakterisierung und subzelluläre Lokalisation ist es aber notwendig, ein spezifisches Antiserum gegen RnEB2 herzustellen.

3.4.3 Klon AS128 kodiert für Rn Flightless

Beim Immunoscreen der Rattenretina cDNA-Bank wurde ein Klon (AS128) mit Homologien zu *Drosophila Flightless* (FLI, Genebank U01182), *C. elegans Flightless* (Genebank U01183) und humanes *Flightless* (FLII, Genebank U01184) isoliert. Flightless wurde ursprünglich bei *Drosophila* anhand von Genmutationen identifiziert. Bei viablen Mutation liegt eine abnormale Anordnung der Myofibrillen in der indirekten Flugmuskulatur vor, und die Fruchtfliegen sind flugunfähig. Handelt es sich um eine letale Mutation, so erfolgt eine abnormale Zellularisierung des Blastoderms oder eine abnormale Gastrulation (Homyk und Sheppard, 1977; Koanna und Hotta, 1978; Deak et al., 1980; Perrimon et al., 1989; Miklos und de Couet, 1990; Straub et al., 1996). Das *Drosophila Fli I*-Gen und seine Homologe bei *C. elegans* und dem Menschen kodieren für Proteine mit einer C-terminalen „gelsolin-like“ Aktin-Bindungsdomäne und einer N-terminalen LRR-Domäne (Abb. 31, LRR: engl. „leucine rich repeat“). Die LRR-Domäne ist an Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen beteiligt (Way und Weeds, 1988; Hartwig und Kwiatkowski, 1991; Campbell, 1993; Orloff et al., 1995; Claudianos und Campbell, 1995; Kajava et al., 1995; Kobe und Deisenhofer, 1995a; 1995b; Campbell et al., 1997b, Davy et al., 2000).

Alle bisher bekannten Flightless-Homologe sind cytoplasmatische Proteine, und liegen mit dem Aktincytoskelett assoziiert vor (Campbell, 1993; Orloff et al., 1995; Campbell et al., 1997b, Davy et al., 2000). Erste funktionelle Analysen des *Drosophila Flightless*-Proteins (DmFlip) haben gezeigt, daß Dm Flip eine Rolle bei Zellularisierung und Entwicklungsprozessen spielt (Deak et al., 1982; Miklos und de Couet, 1989; Campbell et al., 1997b; Davy et al., 2000).

Das humane *Flightless II*-Gen ist auf Chromosom 17p11,2 lokalisiert, einem Chromosomenabschnitt in dem beim Smith Magenis Syndrom (SMS) Deletionen von mind. 700 bp auftreten können (Campbell et al., 1993; Chen et al., 1995; Chen et al., 1997; Seranski et al., 1999; Campbell et al., 1997b). SMS ist eine Erkrankung, die bei 1 von 25.000 Lebendgeburten auftritt und sich unter anderem in Abnormalitäten bei der Entwicklung äußert, wovon auch sensorische Gewebe betroffen sind (Smith et al., 1986; Greenberg et al., 1997).

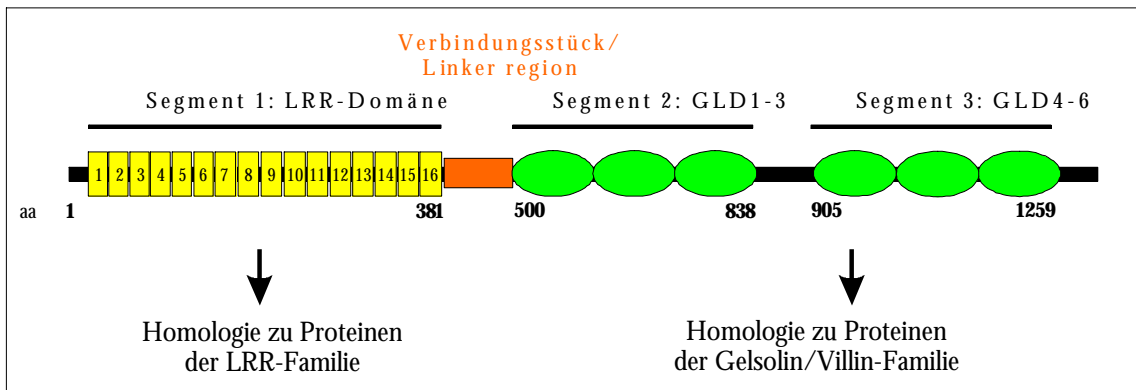


Abb. 31: Proteindomänen von Hs *Flightless*

3.4.3.1 Isolierung und Sequenzierung von Ratten und Maus *Flightless*

Zunächst wurde Klon AS128 (1,2 kb) vollständig sequenziert. Dazu wurden Testverdaue mit verschiedenen Restriktionsenzymen durchgeführt, um geeignete Schnittstellen zur Generierung von Subklonen zu ermitteln. Durch einen BamHI-Verdau konnte ein 655 bp umfassender Bereich herausgeschnitten und der Klon mit dem verbliebenen cDNA-Insert religiert werden (Abb. 32). Anschließend wurde das BamHI-cDNA-Fragment in einen pBluescript-Vektor ligiert und beide Subklone sequenziert, womit die vollständige cDNA-Sequenz von Klon AS128 vorlag (Abb. 33).

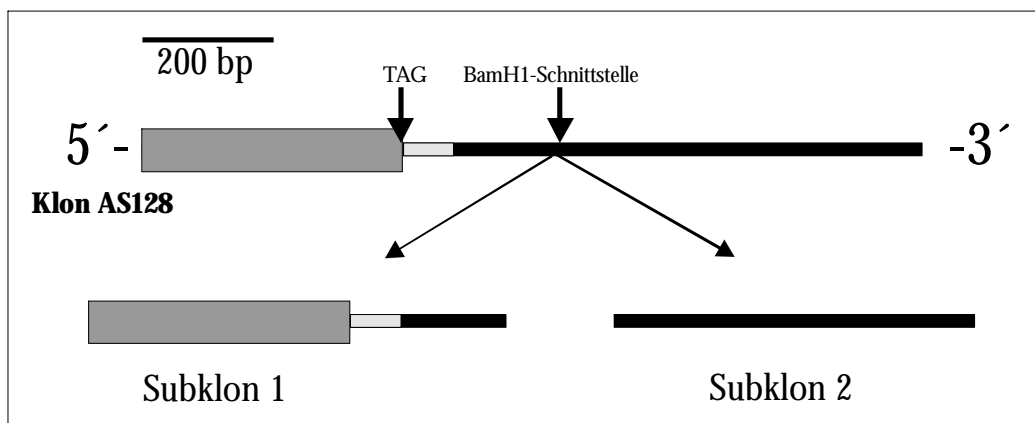


Abb. 32: Klon AS128

Klon AS128 kodiert für ein 3'-terminales Fragment von *R. norvegicus Flightless* (Rn *Fli*). An der Position 409 befindet sich ein Intron von 71 pb wodurch ein Stopcodon (409-411, TAG) inseriert wird. Dieses führt zum Abbruch des offenen Leserahmens 2 (ORF2). Ausgehend von der BamHI-Schnittstelle wurden zwei Subklone (1 und 2) hergestellt und anschließend sequenziert.

1	GGCACGAGTC CCGTGCTCAG	TGCAGGTA ACGTCCATGA	GGGTGCCTGT CCCACGGACA	GGAGTACGAG CCTCATGCTC	GAGGAAGAGA CTCCTTCTCT	AGCCAGAAGA TCGGTCTTCT
61	CAAGGAAGGG GTTCTTCCC	AAGGCCCTCGG TTCCGGAGCC	CAGAGGGCAG GTCTCCCGTC	AGAAGAGGAG TCTTCTCCTC	GAAGCAGCAG CTTCGTCGTC	CTGAGACAGA GACTCTGTCT
121	GGAGAAGCAG CCTCTTCGTC	CCAGAGGAGG GGTCTCCTCC	ATTTTCAGTG CAAAAGTCAC	CATCGTTTAC GTAGCAAATG	TTCGAGCAGG AAGACCGTCC	GCCGGGAGGC CGGCCCTCCG
181	CTCCAACATG GAGGTTGTAC	GGCTGGCTTA CCGACCGAAT	CCTTCACATT GGAAGTGTA	CAGTCTGCAG GTCAGACGTC	AAGAAGTTCG TTCCTCAAGC	AGAGCCTTTT TCTCGGAAAA
241	CCCTGGCAAAG GGGACCGTTC	CTAGAGGTAG GATCTCCATC	TACGCATGAC ATGCGTACTG	ACAACAACAG TGTTGTTGTC	GAGAACCCTA CTCTTGGGAT	AGTTTCTATC TCAAAGATAG
301	CCACTTCAAA GGTGAAGTTT	AGAAAGTTCA TCTTTCAGT	TCATCCACCG AGTAGGTGGC	GGGCAAGAGG CCCGTTCCTC	AAGGTGACCC TTCCACTGGG	AGACTCTCCA TCTGAGAGGT
361	GCCGACCCTC CGGCTGGGAG	TATCAGATCC ATAGTCTAGG	GGACTAATGG CCTGATTACC	CAGTGCCCTC GTCACGGGAG	TGCACCCGGT ACGTGGGC	AGGTACCTGG CA TCCATGGACC
421	CCTGGGGAGG GGACCCCTCC	GAGCAGGATC CTCGTCCTAG	CATGGTGGGG GTACCACCCC	GGTAACACTG CCATTGTGAC	CTGATTCCCC GACTAAGGGG	TTCCCCCAGG AAGGGGGTCC
481	TGCATTCAGA CGTAAGTCTA	TCAACACTGA AGTTGTGACT	CTCCAGTCTT GAGGTCAGAA	CTCAACTCTG GAGTTGAGAC	AGTTCCTGCTT TCAAGACGAA	CATCCTCAAG GTAGGTGTTC
541	GTCCCCTTTG CAGGGGAAAC	AAAGCGAGGA TTTCGCTCCT	CAACCAAGGC GTTGGTTCCG	ATCGTGTATG TAGCACATAC	CCTGGGTAGG GGACCCATCC	CCGGGCATCA GGCCCGTAGT
601	GACCCTGACG CTGGGACTGC	AAGCCAAGCT TTCGGTTCGA	GGCAGAGGAC CCGTCTCCTG	ATCCTGAACA TAGGACTTGT	CCATGTTTGA GGTACAAACT	CCGGATCCTA GGCCTAGGAT
661	CAGCGAAACA GTCGCTTTGT	GGGCATCAAC CCCGTAGTTG	GAGGGTGAGG CTCCCCTCC	AGCCAGAGAA TCGGTCTCTT	C'TTCTTCTGG GAAGAAGACC	GTAGGCATCG CATCCGTAGC
721	GTGCACAGAA CACGTGTCTT	ACCCTATGAT TGGGATACTA	GATGACGCAG CTACTGCGTC	AGTACATGAA TCATGTACTT	GCACACGCGT CGTGTGCGCA	CTCTTCAGGG GAGAAGTCCC
781	GCTCCAATGA CGAGGTTACT	GAAGGGCTAC CTTCCCGATG	TTCGCAGTGA AAGCGTCACT	CTGAGAAATG GACTCTTTAC	CTCTGACTTT GAGACTGAAA	TGCCAAGATG ACGGTCTTAC
841	ACCTGGCAGA TGGACCGTCT	CGATGACATC GCTACTGTAG	ATGCTGCTAG TACGACGATC	ACAATGGCCA TGTTACCGGT	AGAAGTGTAC TCTTCACATG	ATGTGGGTTG TACACCCAAC
901	GGACTCAGAC CCTGAGTCTG	AAGCCAAGTG TTCGGTTCAC	GAGATCAAAC CTCTAGTTTG	TGAGTCTGAA ACTCAGACTT	GGC'TTGCCAG CCGAACGGTC	GTATACATCC CATATGTAGG
961	AGGACACACG TCTGTGTGC	CTCTAAAGAA GAGATTTCTT	CATGAGCGGC GTACTCGCCG	CACGCCGCCT GTGCGGCGGA	GCGCCTGGTC CGCGGACCAG	CCGCAAAGGT GGCGTTTCCA
1021	AACGAACAAC TTGCTTGTTG	GTGCCTTCAC CACGGAAGTG	CCGCTGCTTC GGCGACGAAG	CATGCCCTGGA GTACGGACCT	GCACGTTCCG CGTGCAAGGC	TCAAGCCCCA AGTTCGGGGT
1081	GCCTAGGCAG CGGATCCGTC	TACCTGTGAC ATGGACACTG	CCCAGATCCA GGGTCTAGGT	GTGAGGAGGA CACACCTCCT	AGAGGCCTCC TCTCCGGAGG	TAGTACCTGC ATCATGGACG
1141	TTCATCTACT AAGTAGATGA	CACATCCTGC GTGTAGGACG	AAGCAGCACA TTCGTCGTGT	CAGCCCAAAG GTCGGGTTTC	CCCTACCAGT GGGATGGTCA	GTGTCCACGT CACAGGTGCA
1201	ATGTGCAGAA TACACGTCTT	GTAGTTTAAA CATCAAATTT	AGATATTTAAA TCTATAATTT	TGCTTTTTATT ACGAAAATAA	TTCAATATTA AAGTTATAAT	AAAAATCAGT TTTTTAGTCA
1261	ACTTTTAATA TGAAAATTAT	TTAAAAAAA AATTTTTTTT	AAAAAAA TTTTTTTTT			

Abb. 33: Nukleotidsequenz von Klon AS128

Klon AS128 weist eine Größe von ca. 1,3 kb (1273 bp ohne Poly-A) auf und ist über die Schnittstellen der Restriktionsenzyme EcoRI und XhoI in den Vektor pBluescript SK(-) kloniert. Durch einen Restriktionsverdau mit diesen Enzymen wurde die Insertgröße bestimmt und durch Sequenzierung mit den vektorspezifischen Primern T3 und M13 bestätigt. Die BamHI-Schnittstelle ist schwarz hinterlegt, der Adaptor, der beim Herstellen der cDNA-Bank zwischen dem Vektor und der cDNA-Sequenz eingefügt wurde, ist in hellgrau hinterlegt; das Intron in dunkelgrau hinterlegt, der kodierende Strang ist "fett" eingezeichnet und das Stopkodon an Position 409-411 unterstrichen.

Das Rn *Flightless*-Fragment weist in einem ClustalW-Homologievergleich eine Sequenzidentität von 86,2% zum 3'-Ende von Human *Flightless* auf. Sequenzvariationen treten vorwiegend im nichtkodierenden Bereich hinter dem Stopkodon auf. An der Position 408 befindet sich bei Klon AS128 ein Einschub von 71 bp, der in der 3'-terminalen cDNA von Human *Flightless II* nicht auftritt (Abb. 33). Aufgrund dieses Einschubs befindet sich an der Position 409-411 ein Stopkodon (TAG) und bewirkt den verfrühten Abbruch des offenen Leserahmens ORF2 von Rn *Flightless* (Rn Flip) gegenüber Human *Flightless* (Hs Flip). Da dieser Einschub von dem Sequenzmotiv (GT ---- AG) flankiert wird, welches den Beginn und das Ende von Introns markiert („GT-AG-rule“, Reed und Maniatis, 1985; 1986), handelt es sich möglicherweise um ein nicht herausgeschnittenes Intron. Der ClustalW-Homologievergleich der Rn *Flightless* cDNA-Sequenz mit der genomischen Sequenz von Maus *flightless* bestätigte, daß es sich tatsächlich um ein Intron (Nr. 24 von 29) handelt. Um zu ermitteln, welche Größe die *Flightless*-mRNA in der Retina aufweist, wurde mRNA aus Retina, Gehirn, Testis, Skelettmuskel, Milz und Herzmuskel der Ratte isoliert und Northern Blot Analysen durchgeführt. Die Hybridisierung erfolgte mit einer digoxigenin-markierten „antisense“-cRNA-Sonde, die durch *in vitro* Transkription des „sense“ Stranges vom Klon AS128 hergestellt worden war.

Abbildung 34 zeigt das Ergebnis der Northern Blot Analyse. In allen Spuren mit Ausnahme der Milz ist ein Hybridisierungssignal bei einer Größe von ca. 4,4 kb zu sehen. Dies entspricht der Größe der *Flightless*-mRNA beim Menschen (Campbell et al., 1997). Abweichend zu Campbell et al. (1997b) konnten im Herz- und Skelettmuskel jedoch noch kleinere Transkripte bei ca. 1,9 kb, und beim Herzmuskel noch zusätzlich bei ca. 1,2 kb detektiert werden. Ursache dieser Banden könnte eine partielle Degradation der isolierten mRNA, Kreuzreaktionen der „antisense“ cRNA-Sonde bei der Hybridisierung mit Homologen oder der Nachweis alternativ gespleißter Isoformen sein. Überdies könnte das Intron in Klon AS128 (das ebenfalls in „antisense“ cRNA-Sonde transkribiert wurde) möglicherweise Ursache der Detektion kürzerer mRNA-Transkripte sein. Daher wurde von einem weiteren Rn *Flightless* Klon ohne Intronsequenz (Klon 4.6.4) eine „antisense“-cRNA-Sonde hergestellt und nochmals eine Hybridisierung unter den gleichen Bedingungen durchgeführt. Dabei wurde das oben beschriebene Ergebnis bestätigt. Eine Kreuzreaktion mit Homologen aus der Gelsolin/Villin-Familie ist aufgrund einer Sequenzidentität von weniger als 30% eher unwahrscheinlich (Claudianos und Campbell, 1995; Marks et al., 1998). Ratten *Flightless*-mRNA, isoliert aus Retinae, umfaßt damit gleich dem Homolog bei *H. sapiens*, *D. melanogaster* sowie *C. elegans* ca. 4,4 kb.

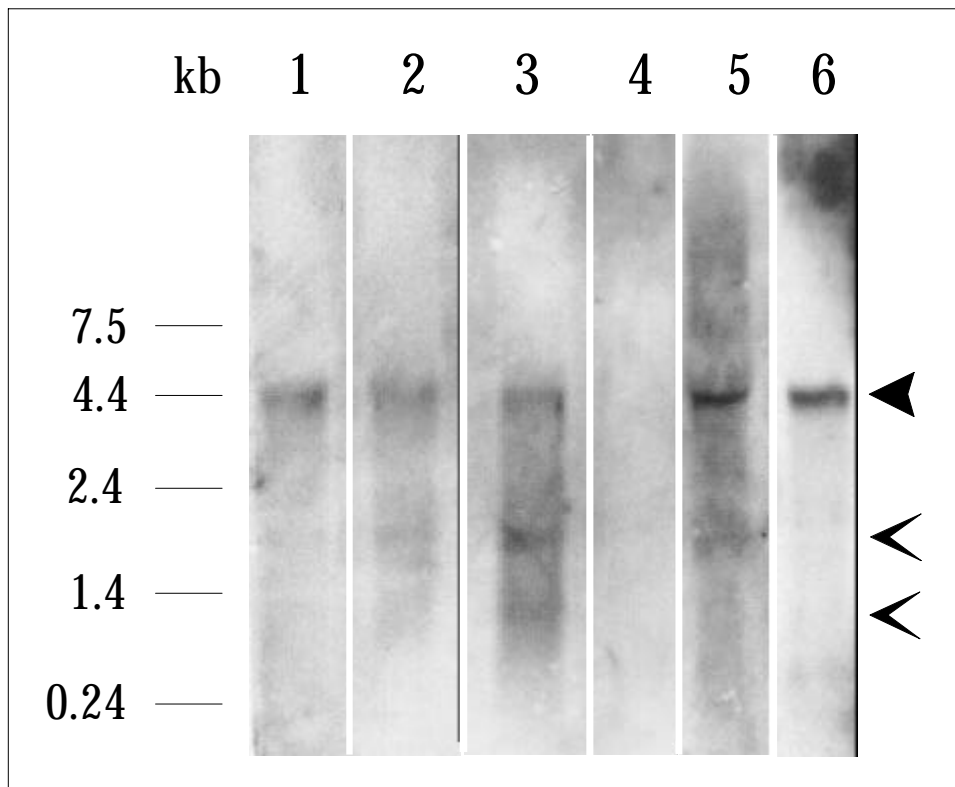


Abb. 34: Analyse der Expression von *Flightless* durch Northern Blot Analysen mRNA isoliert aus Retinae (1), Gehirn (2), Herzmuskel (3), Milz (4), Skelettmuskel (5) und Testis (6) wurde aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit digoxigenin-markierter „antisense“ cRNA-Sonde hybridisiert. Die schwarze Pfeilspitze markiert das 4,4 kb Transkript; die offenen Pfeilspitzen die kleineren Transkripte von 1,9 kb und 1,2 kb. Links des Blots sind zum Größenvergleich die RNA-Größenmarker in Kilobasen (kb) dargestellt.

Im nächsten Schritt sollten weitere cDNA-Klone aus der Ratten Retina cDNA-Bank isoliert werden, die über die Sequenz von Klon AS128 hinaus Informationen beinhalten. Zunächst wurde das cDNA-Insert von Klon AS128 isoliert und als Probe zur Herstellung einer digoxigenin-markierten cDNA-Sonde eingesetzt. Mit dieser hochspezifischen Sonde wurde die retinale cDNA Bank der Ratte nochmals durchmustert. Bei der primären Durchmusterung von 10 Platten mit jeweils 20.000 pfu wurden 22 positiv hybridisierte Plaques aus dem Agar ausgestochen und eine Einzelplaqueisolierung durchgeführt. Nach Ausschleusung und Subklonierung in *E. coli* SOLR wurde die Plasmid-DNA durch alkalische Lyse präpariert, und Restriktionsverdaus mit den Enzymen EcoRI und XhoI durchgeführt, um die Größe der cDNA-Inserts zu bestimmen. In einer Dot Blot Analyse mit der Rn *Flightless*-cDNA-Sonde zeigten 15 Klone eindeutig positive Signale. Diese Klone wurden sequenziert, und die erhaltenen Sequenzdaten in Datenbankrecherchen analysiert. Alle 15 Klone waren homolog zum 3'-Terminus von Human *Flightless*. Darüberhinaus zeigte dieser Homologievergleich, daß es sich um vier verschiedene Klone handelt (Gruppe 1-4; Abb. 35). Keiner der mit der *Flightless*-Sonde isolierten Klone enthielt jedoch weitere Sequenzinformationen. Dennoch kodieren diese cDNA-

Klone gegenüber Klon AS128 für ein größeres Proteinfragment, und sind zu 88% identisch zum 3'-Ende von Hs *Flightless*. Klon AS128 enthält als einziger Klon den Einschub von 71 bp.

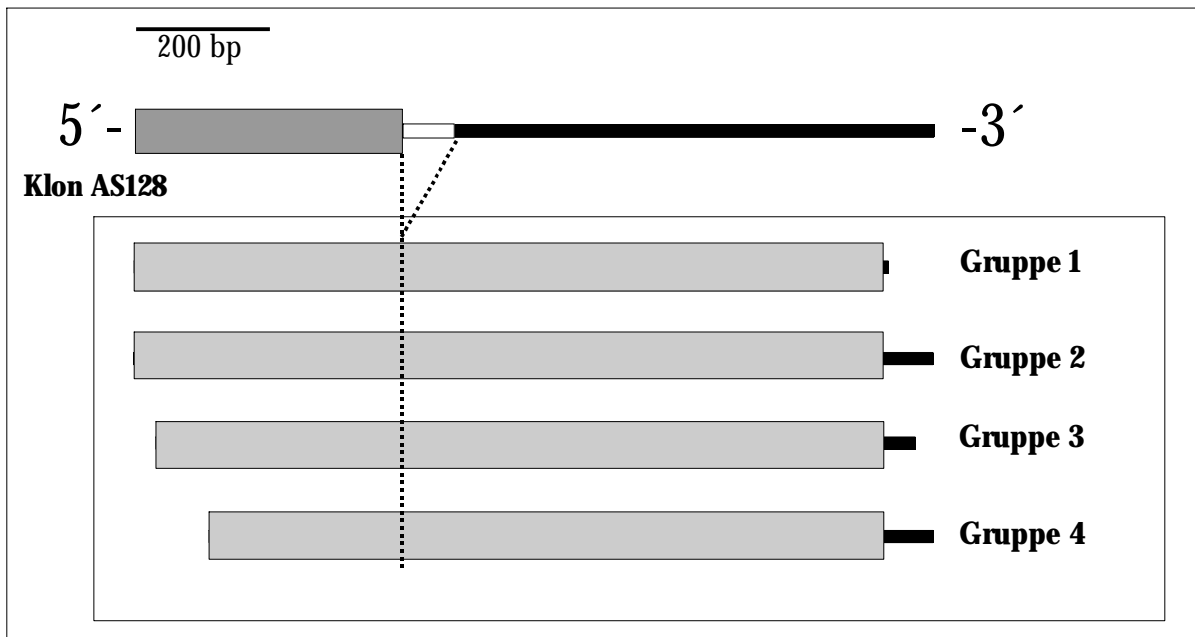


Abb. 35: Isolierte *Flightless*-Klone

Das gesamte cDNA-Insert von Klon AS128 wurde zur Herstellung einer digoxigenin-markierten cDNA-Sonde eingesetzt. Mit dieser Sonde wurde die retinale cDNA-Bank der Ratte nochmals durchmustert und 15 weitere *Flightless*-Klone isoliert. Ein Homologievergleich der cDNA-Sequenzen ergab, daß es sich um vier verschiedene Klone handelt. Keiner der Klone enthielt aber weitere Sequenzinformationen oder den Einschub von 71 bp (Intron). Die Position des Introns ist als weißes Kästchen eingezeichnet, und die kodierende Sequenz von Klon AS128 ist in dunkelgrau dargestellt. *Flightless*-Klone, die bei der Durchmusterung mit der cDNA-Sonde isoliert wurden, sind in einem Kasten zusammengefaßt, die kodierende Sequenz ist in hellgrau eingezeichnet. Die einzelnen Gruppen umfassen folgende Klone: **Gruppe 1:** Klon 4.2.7., **Gruppe 2:** Klon 2.3.8. und Klon 2.3.1., **Gruppe 3:** Klon 4.7.2. und Klon 4.2.6., **Gruppe 4:** Klon 9.1., 4.6.4., Klon 4.7.10, Klo 4.6.10., Klon 4.7.6., Klon 4.7.11, Klon 4.7.3., Klon 4.7.7., Klon 4.7.8., und Klon 4.7.1.

Da die Durchmusterung der Ratten Retina cDNA-Bank gezeigt hatte, daß in dieser keine *Flightless*-Klone mit einem cDNA-Insert von mehr als 1,3 kb enthalten sind, wurde im nächsten Schritt eine oligo(dT)-geprimte Mausretina cDNA-Bank (dankend erhalten von S. Azarian) mit der vorhandenen digoxigeninmarkierten *Flightless*-cDNA-Sonde durchmustert. In dieser cDNA-Bank sind Klone mit cDNA-Inserts von >2 kb angereichert. Insgesamt wurden acht NZY-Platten mit jeweils 20.000 pfu durchmustert, und 8 positive Phagenplaques gepickt. Anschließend wurden Einzelplaques isoliert, die Klone ausgeschleust und in *E. coli* SOLR subkloniert. Die Plasmid-DNA wurde präpariert, und durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen EcoRI und XhoI die Größe der cDNA-Inserts bestimmt. In der Dot Blot Analyse waren zwei Klone positiv, und deren 3'- und 3'-Termini wurden sequenziert. Die nachfolgende Datenbankrecherche ergab, daß die 5'- und 3'-terminalen cDNA-Sequenzen beider Klone (AS360 und AS363) identisch und homolog zu Human *Flightless* sind.

Klon AS360 enthält ein cDNA-Insert von ca. 3,4 kb. Um diesen Klon vollständig zu sequenzieren, wurden Subklone generiert. Zunächst wurden die vorhandenen 5'- und 3'-

terminalen cDNA-Sequenzen mit dem Programm RESTRI (im Programmpaket PCGene) analysiert. Anschließend durchgeführte Testverdau mit verschiedenen Restriktionsenzymen zeigten, daß durch einen Verdau mit den Enzymen SmaI und KpnI drei Subklone entstehen: ein SmaI/SmaI-Fragment (ca. 1,4 bp), SmaI/KpnI-Fragment (ca. 1,4 kb) und ein KpnI/KpnI-Fragment (ca. 600 kb). Dabei wurde als erste und letzte Schnittstelle die SmaI- und KpnI-Schnittstelle im pBluescript-Vektor genutzt. Die drei cDNA-Fragmente wurden in pBluescript-Vektoren kloniert, in *E. coli* XL1 transformiert und nachfolgend sequenziert. Der ClustalW-Homologievergleich der Maus *Flightless* cDNA-Sequenz mit Hs *Flightless* ergab, daß die Sequenz 5'-terminal noch unvollständig vorliegt. Durch eine Datenbankanalyse (von „dbest“ bei NCBI) konnten vier EST-Klone identifiziert werden, welche die noch fehlenden Sequenzinformationen enthielten (Genbank AU035758, AU035748, AI385901, identisch mit W75218; Abb. 36). Diese Klone wurden aus cDNA-Banken isoliert, die aus mRNA aus Gehirngewebe der Maus hergestellt wurden. Durch Kombination dieser EST-Klone mit der vorhandenen cDNA-Sequenz von Klon AS360 lag die vollständige cDNA-Sequenz von Maus *Flightless* vor (Abb. 37). Die Klone mit der Gene Bank „Accession Number“ AU035748 und AU035758 erhielt ich anschließend dankend auf Anfrage von Dr. K. Hashimoto, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan.

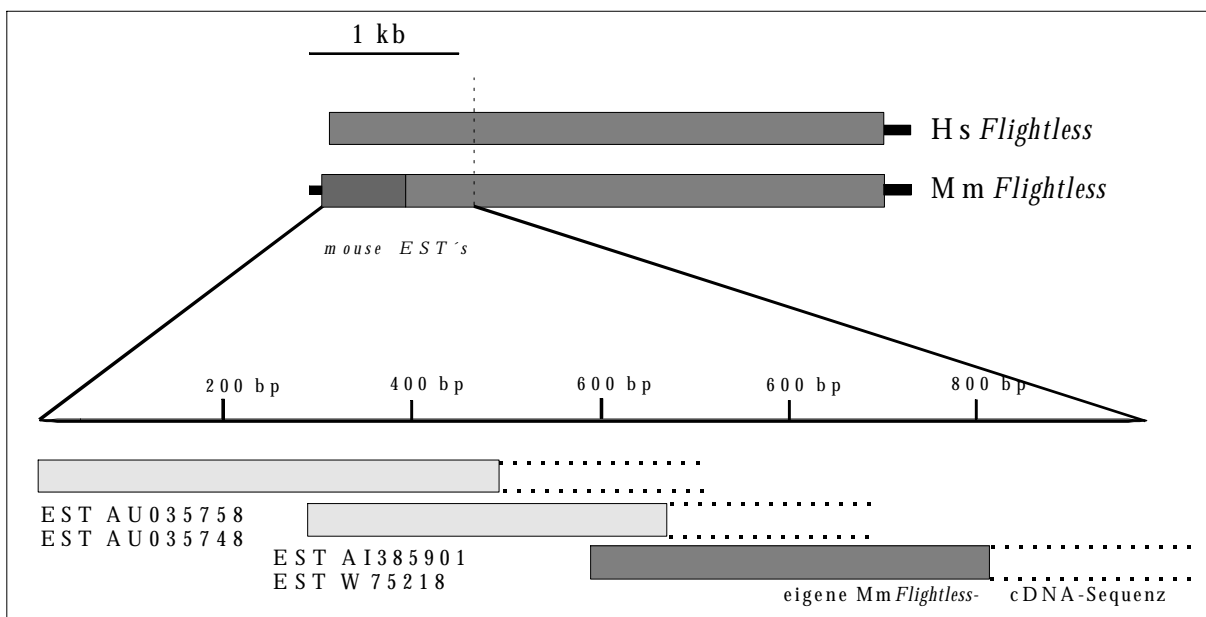


Abb. 36: Graphische Darstellung der vollständigen Mm *Flightless* Sequenz

Mit der partiellen Maus *Flightless* Nukleotidsequenz und der Hs *Flightless* Nukleotidsequenz wurde die Maus EST-Datenbank bei NCBI unter Verwendung des Programms BLASTN durchsucht, um ESTs zu identifizieren, welche die noch fehlende 5'-Region enthalten. Es wurden 4 EST's identifiziert, womit die gesamte cDNA von Maus *Flightless* vorlag.

1	GTCCTCCCTG CAGGAGGGAC	CCCGTAAGAG GGGCATTCTC	AGCTGCGCCA TCGACGCGGT	CCATGGAGGC GGTACCTCCG	CACCGGGGTG GTGGCCCCAC	CTGCCGTTCG GACGGCAAGC
61	TGCGCGGCGT ACGCGCCGCA	GGACCTCAGC CCTGGAGTCG	GGCAACGACT CCGTTGCTGA	TCAAGGGTGG AGTTCCCACC	CTACTTCCCT GATGAAGGGA	GAGAATGTTA CTCTTACAAT
121	AGGCTATGAC TCCGATACTG	CCAGCCTGCG GGTCGGACGC	ATGGCTAAAG TACCGATTTT	CTGAATCGCA GACTTAGCGT	CAGGCCCTCTG GTCCGGAGAC	CTACCTGCCT GATGGACGGA
181	GAAGAACTTG CTTCTTGAAC	CGGCTCTGCA GCCGAGACGT	GAAGCTGGAG CTTCGACCTG	CACCTGTCTG GTGGACAGAC	TGAGCCACAA ACTCGGTGTT	CCATCTGACC GGTAGACTGG
241	ACGCTTCACG TGCGAAGTGC	GCGAACTGTC CGCTTGACAG	TAGCCTGCCT ATCGGACGGA	TCGCTTCGGG AGCGAAGCCC	CCATTGTAGC GGTAACATGC	TCGGGCCAAC AGCCCGGAAG
301	AGCCTGAAGA TCGGACTTCT	ATTCCGGAGT TAAGGCCTCA	CCCTGATGAC GGGACTACTG	ATCTTCAAGC GAGAAGTTCG	TGGATGATCT ACCTACTAGA	CTCTGTTCTG GAGACAAGAC
361	GACTTGAGCC CTGAACTCGG	ATAACCAGTT TATTGGTCAA	GACAGAATGC GTGTCTTACG	CCACGGGAGC GGTGCCCTCG	TGGAGAATGC ACCTCTTACG	CAAGAACATG GTTCTTGTAC
421	CTGGTGCTCA GACCACGAGT	ACCTCAGCCA TGGAGTCGGT	CAACGGCATC GTTGCCGTAG	GACTCCATCC CTGAGGTAGG	CCAACCAGCT GGTTGGTCGA	GTTTCATCAAC CAAGTAGTTG
481	CGTACGGACT GCATGCCTGA	TGCTGTACCT ACGACATGGA	GGACCTCAGT CCTGGAGTCA	GAAAACCGCC CTTTTGGCGG	TAGAGAGCCT ATCTCTCGGA	GCCGCCTCAG CGGCGGAGTC
541	ATGCGCCGCC TACGCGGCGG	TCGTGCACCT AGCACGTGGA	GCAGACACTG CGTCTGTGAC	GTGCTGAATG CACGACTTAC	GAAACCCGCT CTTTGGGCGA	GCTACATGCA CGATGTACGT
601	CAGCTCCGGC GTCGAGGCCG	AGCTCCCAGC TCGAGGGTCG	CATGATGGCC GTACTACCGG	CTACAGACCT GATGTCTGGA	CGCATCTGAG GCGTAGACTC	GAACACTCAA CTTGTGAGTT
661	CGCACCCAGA GCGTGGGTCA	GCAACCTCCC CGTTGGAGGG	CACCAGCCTG GTGGTCGGAC	GAGGGCCTGA CTCCCGGACT	GCAACCTTTC CGTTGGAATG	AGATGTGGAC TCTACACCTG
721	CTGTCTGTGCA GACAGCACGT	ATGACTTGAC TACTGAACTG	AAGGGTGCCG TTCCCACGGC	GAGTGCCTGT CTCACGGACA	ACACCCCTCCC TGTGGGAGGG	CAGCCTGCGC GTCGGACGCG
781	CGCCTCAACC GCGGAGTTGG	TCAGTAGCAA AGTCATCGTT	CCAGATTGCA GGTCTAACGT	GAGCTGTCCC CTCGACAGGG	TGTGCATCGA ACACGTAGCT	CCAGTGGGTG GGTCACCCAC
841	CACCTGGAGA GTGGACCTCT	CCTTGAATCT GGAACCTAGA	GTCCCAGAAC CAGGGCCTTG	CAGCTCACCT GTCGAGTGGG	CCCTGCCTTC GGGACGGAAG	AGCCATCTGC TCGGTAGACG
901	AAGCTCACCA TTCGAGTGGT	AGCTGAAGAA TCGACTTCTT	GCTGTACCTC CGACATGGAG	AACCTCAACA TTGAGGTTGT	AGCTGGACTT TCGACCTGAA	TGATGGGCTG ACTACCCGAC
961	CCTTCTGGCA GGAAGACCGT	TCGGCAAGCT AGCCGTTCTGA	CACCAGCCTG GTGGTCGGAC	GAGGAATTCA CTCCTTAAGT	TGGCTGCCAA ACCGACGGTT	CAACAACCTA GTTGTTGGAT
1021	GAAGTGAATC CTTGACTAAG	CTGAAAGTCT GACTTTCAGA	CTGCAGGTGC GACGTCCACG	CCAAAACCTGA GGTTTTGACT	AGAAACTCGT TCTTTGAGCA	CCTGAATAAG GGACTTATTC
1081	AACCGCCTGG TTGGCGGACC	TGACCCTTCC ACTGGGAAGG	TGAGGCCATC ACTCCGGTAG	CAC'TTCC'TGA GTGAAGGACT	CAGAGATCCA GTCTCTAGGT	GGTCC'TGGAT CCAGGACCTA
1141	GTTTCGAGAAA CAAGCTCTTT	ACCCAGCTTT TGGGGTCGAA	GGTCATGCCG CCAGTACGGC	CCCAAGCTTG GGGTTTGAAC	CTGACCGCAC GACTGGCGTG	CGCCGAGTGG GCGGCTCACC
1201	TACAACATTG ATGTTGTAAC	ATTTCTCGCT TAAAGAGCGA	ACAGAACCAG TGCTTGGTTC	CTGAGGCTGG GACTCCGACC	CGGGCGCCTC GCCC GCGGAG	CCCGGCCACA GGGCCGGTGT
1261	GTGGCTGCTG CACCGACGAC	CTGCAGCTGT GACGTCGACA	AGGGAGCGGG TCCCTCGCCC	TCCAAGGACC AGGTTCC'TGG	CCTTGGCTCG GGAACCGAGC	CAAGATGCGG GTTCTACGCC
1321	CTACGGAGGC GATGCC'TCCG	GCAAGGACTC CGTTCCTGAC	AGCACAGGAT TCGTGTCTTA	GTCCAGGCCA CAGGTCCGGT	AGCAAGTGCT TCGTTACAGG	AAAGGGCATG TTTCCCCTAC
1381	TCAGATGTTG AGTCTACAAC	CCCAGGAGAA GGGTCCTCTT	AAACAAAAAC TTTGT'TTTTGG	CAAGAGGAAA GTTCTCCTTT	GCATAGATGC CGTATCTACG	CCGGGCACCA GGCCCGAGGT
1441	GGGGGGAAAAG CCCCCTTTC	GTACGCGTGG CATGCGCACC	GGACCAGGGC CCTGGTCCCG	CTGGAGAAGC GACCTCTTCG	CACGCCTTGA GTGCGGAACT	CTACTCGGAG CATGAGCCTC

1501	TTCTTTACGG AAGAAATGCC	AGGATGTGGG TCTTACACCC	CCAGCTGCCT GGTCGACGGA	GGTTTGACCA CCAAACTGGT	TCTGGCAAAT AGACCGTTTA	TGAGAACTTT ACTCTTGAAA
1561	GTGCCTGTTC CACGGACAAG	TGGTGGAAGA ACCACCTTCT	AGCCTTCCAT TCGGAAGGTA	GGCAAGTTCT CCGTTCAAGA	ACGAGGCTGA TGCTCCGACT	CTGCTACATT GACGATGTAA
1621	GTGCTCAAGA CACGAGTTCT	CCTTCCTGGA GGAAGGACCT	TGACAGCGGC ACTGTGCGCG	TCCCTGAACT AGGGACTTGA	GGGAGATCTA CCCTCTAGAT	CTACTGGATT GATGACCTAA
1681	GGTGGGGAGG CCACCCCTCC	CCACACTTGA GGTGTGAACT	CAAGAAAGCC GTTCTTTTCGG	TGTTCCGCCA ACAAGGCGGT	TTCATGCAGT AAGTACGTCA	CAATCTGCGC GTTAGACGCG
1741	AACTACCTGG TTGATGGACC	GTGCTGAGTG CACGACTCAC	CCGTACTGTT GGCATGACAA	CGAGAGGAGA GATCTCCTCT	TGGGTGACGA ACCCACTGCT	GAGTGAGGAG CTCACTCCTC
1801	TTCTGCAGG AAGGACGTCC	TGTTTGACAA ACAAACTGTT	TGACATCTCC ACTGTAGAGG	TACATTGAAG ATGTAAC TTC	GCGGAACAGC CGCCTTGTCG	CAGTGGCTTC GTCACCGAAG
1861	TATACTGTGG ATATGACACC	AAGATACACA TTCATATGTGT	CTATGTTACC GATACAATGG	AGGATGTACC TCCTACATGG	GTGTATATGG CACATATACC	GAAAAAGAAC CTTTTTCTTG
1921	ATCAAATTGG TAGTTTAACC	AGCCTGTGCC TCGGACACGG	CCTCAAAGGG GGAGTTTCCC	TCCTCACTAG AGGAGTGATC	ATCCAAGGTT TAGGTTCCAA	TGTGTTTTCTC ACACAAAGAG
1981	CTGGACCAAG GACCTGGTTC	GGCTGGACAT CCGACCTGTA	TTATGTGTGG AATACACACC	CGGGGGGCC GCCCCCGGG	AGGCCACACT TCCGGTGTGA	GAGTTACACG CTCAATGTGC
2041	ACTAAGGCCA TGATTCCGGA	GGCTCTTTGC CCGAGAAACG	AGAGAAAATA TCTCTTTTAT	AACAAGAATG TTGTTCTTAC	AGCGGAAAGG TCGCCTTTCC	GAAGCGGAA CTTCCGCCTT
2101	ATCACACTCC TAGTGTGAGG	TGGTGCAGGG ACCACGTCCC	CAAGGAGCCC GTTCCTCGGG	CCAGGGTTCT GGTCCCAAGA	GGAATTTGCT CCTTAAACGA	GGTTGGAGAC CCAACCTCTG
2161	CCTTCTGAGA GGAAGACTCT	TCAAGAATCA AGTTCTTAGT	TGTCCTGAT ACAGGGACTA	GACTTTTGGC CTGAAAACCG	CACCCAGCC GTGGGGTCGG	CAAGCTATAC GTTTCGATATG
2221	AAGGTGGGCC TTCCACCCGG	TGGGTCTGGG ACCCAGACCC	CTACTTGGAG GATGAACCTC	CTTCCGCAGA GAAGGCGTCT	TCAACTACAG AGTTGATGTC	GCTCTCAGTG CGAGAGTCAC
2281	GAACACAAAA CTTGTGTTTT	AACGGCCCAA TTGCCGGGTT	GGTGGAGCTG CCACCTCGAC	ATGCCAGGAA TACGGTCCTT	TGAGGCTGCT ACTCCGACGA	GCAGAGCCTA GCTCTCGGAT
2341	CTGGACACAC GACCTGTGTG	GATGCGTGTA CTACGCACAT	CATCCTGGAC GTAGGACCTG	TGCTGGTCTG ACGACCAGAC	ATGTATCCAT TACATAGGTA	CTGGCTGGGC GACCGACCCG
2401	CGCAAGTCCC GCGTTCAGGG	CACGCCTAGT GTGCGGATCA	GCGTGCAGCA CGCACGTCGT	GCAC TCAAAC CGTGAGTTTG	TTGGCCAGGA AACCGTCCCT	GCTATGTGGG CGATACACCC
2461	GGGATGCTAC CCCTACGATG	ACCGGCCACG TGGCCGGTGC	ACATACAGTG TGATATGCAC	GTCAGCCGCA CAGTCGGCGT	GCCTGGAGGG CGGACCTCCC	CACCGAGGCC GTGGCTCCGG
2521	CAGGTGTTCA GTCCACAAGT	AGGCCAAGTT TCCGGTTCAA	CAAGAATTGG GTTCTTAACC	GACGATGTGT CTGCTACACA	TGACGGTGGA ACTGCCACCT	CTACACACGC GATGTGTGCG
2581	AATGCGGAGG TTACGCCTCC	CTGTGCTTCA GACACGAAGT	GGGCCAGGGC CCCGTCCCG	CTCTCTGGGA GAGAGACCCCT	AGGTGAAGCG TCCACTTCGC	TGACACTGAG ACTGTGACTG
2641	AAGACAGACC TTCTGTCTGG	AGATGAAGGC TCTACTTCCG	TGACCTCACT ACTGGAGTGA	GCAC TCTTCC CGTGAGAAGG	TACCTCGGCA CTGGAGCCGT	GCCCCCATG CGGGGGGTAC
2701	CCCCTGGCTG GGGGACCGAC	AGGCAGAGCA TCCGTCTCGT	GCTGATGGAG CGACTACCTC	GAGTGGAATG CTCACCTTAC	AGGACCTGGA TCCTGGACCT	TGGCATGGAG ACCGTACCTC
2761	GGCTTCGTGC CCGAAGCACG	TGGAGGGCCG ACCTCCCGGC	CAAGTTCACT GTTCAAGTGA	CGACTGCCAG GCTGACGGTC	AGGAGGAGGA TCCTCCTCCT	GTTTGGCCAC CAAACCGGTG
2821	TTCTACACAC AAGATGTGTG	AGGACTGCTA TCCTGACGAT	TGTC TTTCCCT ACAGAAGGAG	TGCAGGTACT ACGTCCATGA	GGGTACCTGT CCCATGGACA	GGAGTACGAG CCTCATGCTC
2881	GAGGAAGAGA CTCCTTCTCT	AGACAGAAGA TCTCTTTCT	CAAGGAGGGG GTTCCCTCCC	AAGGCC TCGG TTCCGGAGCC	CAGAGGCCAG GTCTCCGGTC	AGAAGGGGAG TCTTCCCCTC
2941	GAAGCAGCAG CTTCGTGCTC	CGGAGGCAGA GCCTCCGTCT	GGAGAAGCAG CCTCTTCGTC	CCAGAGGAGG GGTCTCCTCC	ACTTTCAGTG TGAAAGTCAC	CATCGTTTAC GTAGCAAATG

3001	TTCTGGCAGG AAGACCGTCC	GCCGGGAGGC CGGCCCTCCG	CTCCAACATG GAGGTTGTAC	GGCTGGCTGA CCGACCGACT	CCTTCACATT GGAAGTGTAA	CAGTCTTCAG GTCAGAAGTC
3061	AAGAAGTTTG TTCTTCAAAC	AGAGCCTCTT TCTCGGAGAA	CCCTGGCAAG GGGACCGTTC	CTGGAGGTAG GACCTCCATC	TACGTATGAC ATGCATACTG	ACAGCAGGAG TGTCGTCTCC
3121	AACCCCAAGT TTGGGGTTCA	TCCTATCCCA AGGATAGGGT	TTTCAAAAAGA AAAGTTTTTCT	AAGTTCATCA TTCAAGTAGT	TTCACCGAGG AAGTGGCTCC	CAAGAGGAAG GTTCTCCTTC
3181	GTGACCCAGG CACTGGGTCC	GTACTCTTCA CATGAGAAGT	GCCGACCCTC CGGCTGGGAG	TATCAGATCC ATAGTCTAGG	GCACCAACGG CGTGGTTGCC	CAGTGCCCTC GTCACGGGAG
3241	TGCACCCGGT ACGTGGGCCA	GCATCCAGAT CGTAGGTCTA	TAACACTGAC ATTGTGACTG	TCCAGCCTTC AGGTCGGAAG	TCAACTCTGA AGTTGAGACT	GTCCTGCTTC CAGGACGAAG
3301	TCAAGTCCCT AGTTCAGGGA	TTGAAAGCGA AACTTTCGCT	GGACAACCAA CCTGTTGGTT	GGCATTGTGT CCGTAACACA	ATCCCTGGGT TAGGGACCCA	AGTCCGGGCA TCAGGCCCGT
3361	TCAGACCCCG AGTCTGGGGC	ACGAAGCAAA TGCTTCGTTT	GTTGGCAGAG CAACCGTCTC	GACATCCCTGA CTGTCCGACT	ACACTATGTT TGTGATACAA	TGACGGATCC ACTGCCTAGG
3421	TACAGCAAAC TAGTCGTTTG	AGGTCATCAA CCCAGTAGTT	TGAAGCGCAG ACTTCCGCTC	GAGCCAGAGA CTCGGTCTCT	ACTTCTTCTG TGAAGAAGAC	GGTAGGCATT CCATCCGTAA
3481	GGGCACAGAA CCCGTGTCTT	ACCCTATGAT TGGGATACTA	GACGATGCGG CTGCTACGCC	AGTACATGAA TCATGTACTT	GCACACGAGT CGTGTGCTCA	CTCTTCAGGG GAGAAGTCCC
3541	GCTCCAATGA CGAGGTTACT	GAAGGGTTAC CTTCCAATG	TTCGCAGTGA AAGCGTCACT	CTGAGAAATG GACTCTTTAC	CTCTGACTTT GAGACTGAAA	TGCCAAGATG ACGGTTCCTAC
3601	ACCTGGCAGA TGGACCGTCT	CGATGACATC GCTACTGTAG	ATGCTGCTAG TACGACGATC	ACAATGGCCA TGTTACCGGT	AGAAGTCTAC TCTTCAGATG	ATGTGGGTTG TACACCCAAC
3661	GGACCCAGAC CCTGGGTCTG	AAGCCAAGTG TTCGGTTCAC	GAGATCAAAC CTCTAGTTTG	TGAGTCTGAA ACTCAGACTT	GGCTTGCCAG CCGAACGGTC	GTATACATCC CATATGTAGG
3721	AGGACACACG TCCTGTGTGC	CTCTAAAGAA GAGATTTCTT	CATGAGCGGC GTACTCGCCG	CACGCCTGCG GTGCGGACGC	CCTGGTCCGC GGACCAGGCG	AAAGGTAATG TTTCCATTAC
3781	AGCAGCGCGC TCGTGCGCGC	CTTCACCCGC GAAGTGGGCG	TGCTTCCACG ACGAAGGTGC	CCTGGAGCAC GGACCTCGTG	GTTCCGCCAA CAAGGCGGTT	GCCCAGCCTA CGGGTCCGAT
3841	AGCAGTACCT TCGTCATGGA	ATGACCTCAG TACTGGAGTC	ACTCCAGGTG TGAGGTCCAC	AGGAAGAGGA TCCTTCTCCT	CTCCTCGTAC GAGGAGCATG	CTGCTTCAGC GACGAAGTCG
3901	TAGCCACAGC ATCGGTGTCG	CTGCAAGCAG GACGTTCGTC	CACACAGCCC GTGTGTGCGG	CAAGCCCCAC GTTCCGGGTG	CAGTGTGTCC GTCACACAGG	ACATGTGTGC TGTACACACG
3961	AGATGTAGTT TCTACATCAA	TAAAAGATAT ATTTTCTATA	TAAATGCTTT ATTTACGAAA	TATTTTCAAT ATAAAAGTTA	ATTAAAAAAA TAATTTTTTTT	AAAAAAAAAA TTTTTTTTTTT

Abb. 37: Nukleinsäuresequenz von Maus *Flightless*

Durch Ergänzung der vorliegenden cDNA-Sequenz von Klon AS360 mit den Sequenzinformationen der EST's liegt die vollständige kodierende Sequenz von Maus *Flightless* vor. Das Startkodon ist grau hinterlegt (Position 33-35), das Stopkodon ist unterstrichen (TAG; Position 3852-3854). Die SmaI- (CCCGGG) und KpnI- (GGTACC) Restriktionsschnittstellen sind in hellgrau hinterlegt.

```

1      M E A T G V L P F V R G V D L S G N D F K G G Y F P E N V K A M T S L
36     R W L K L N R T G L C Y L P E E L A A L Q K L E H L S V S H N H L T T
71     L H G E L S S L P S L R A I V A R A N S L K N S G V P D D I F K L D D
106    L S V L D W S H N Q L T E C P R E L E N A K N M L V L N L S H N G I D
141    S I P N Q L F I N L T D L L Y L D L S E N R L E S L P P Q M R R L V H
176    L Q T L V L N G N P L L H A Q L R Q L P A M M A L Q T L H L R N T Q R
211    T Q S N L P T S L E G L S N L S D V D L S C N D L T R V P E C L Y T L
246    P S L R R L N L S S N Q I A E L S L C I D Q W V H L E T L N L S R N Q
281    L T S L P S A I C K L T K L K K L Y L N S N K L D F D G L P S G I G K
316    L T S L E E F M A A N N N L E L I P E S L C R C P K L K K L V L N K N
351    R L V T L P E A I H F L T E I Q V L D V R E N P S L V M P P K L A D R
386    T A E W I Y N D F S L Q N Q L R L A G A S P A T V A A A A V G S G S
421    K D P L A R K M R L R R K D S A Q D V Q A K Q V L K G M S D V A Q E
456    K N K N Q E E S I D A R A P G G K G T R G D Q G L E K P R L D Y S E F
491    F T E D V G Q L P G L T I W Q E N F V P V L V E E E A F H G K F Y E A
526    D C Y I V L K T F L D D S G S L N W E I Y Y W I G G E A T L D K K A C
561    S A I H A V N L R N Y L G A E C R T V R E E M G D E S E E F L Q V F D
596    N D I S Y I E G G T A S G F Y T V E D T H Y V T R M Y R V Y G K K N I
631    K L E P V P L K G S S L D P R F V F L L D Q G L D I Y V W R G A Q A T
666    L S Y T T K A R L F A E K I N K N E R K G K A E I T L L V Q G K E P P
701    G F W N L L V G D P S E I K N H V P D D F W P P Q P K L Y K V G L G L
736    G Y L E L P Q I N Y R L S V E H K K R P K V E L M P G M R L L Q S L L
771    D T R C V Y I L D C W S D V S I W L G R K S P R L V R A A L K L G
806    Q E L G G M L H R P R H T V V S R S L E G T E A Q V F K A K F K N W D
841    D V L T V D Y T R N A E A V L Q G Q G L S G K V K R D T E K T D Q M K
876    A D L T A L F L P R Q P P M P L A E A E Q L M E E W N E D L D G M E G
911    F V L E G R K F T R L P E E E E F G H F Y T Q D C Y V F L C R Y W V P
946    V E Y E E E E K T E D K E G K A S A E A R E G E E A A A E A E E K Q P
981    E E D F Q C I V Y F W Q G R E A S N M G W L T F T F S L Q K K F E S L
1016   P G K L E V V R M T Q Q E N P K F L S H F K R K F I I H R G K R K V T
1051   Q G T L Q P T L Y Q I R T N G S A L C T R C I Q I N T D S Q L L N S E
1086   S C F S S P F E S E D N Q G I V Y P W V R A S D P D E A K L A E D I
1121   L N T M F D G S Y S K Q V I N E G E E P E N F F W V G I G A Q K P Y D
1156   D D A E Y M K A T S L F R G S N E K G Y F A V T E K C S D F C Q D D L
1191   A D D D I M L L D N G Q E V Y M W V G T Q T S Q V E I K L S L K A C Q
1226   V Y I Q D T R S K E H E R P R L R L V R K G N E Q R A F T R C F H A W
1261   S T F R Q A Q P K Q Y

```

Abb. 38: Aminosäuresequenz von Maus *Flightless* (Mm Flip)

Maus *Flightless* kodiert für ein Protein von 1271 Aminosäureresten und einem berechneten Molekulargewicht von 144,87 kDa.

Die Maus *Flightless* cDNA-Sequenz umfaßt (ohne Poly-A) 4002 bp und zeigt eine Identität von 87,3% zu Hs *Flightless* (*FLII*), 62,3% zu *D. melanogaster Flightless* (*FLI*) und 58,3% zu *C. elegans Flightless* (Tab. 12). Maus *Flightless* kodiert für ein Protein von 1271 Aminosäurereen (Mm Flip) mit der berechneten molekularen Masse von 144,872 kDa (Abb. 38). Die 5'-nichttranslatierte Region von Maus *Flightless* umfaßt 32 Basenpaare und enthält ein im Leserahmen liegendes Stopkodon (TGA). Als Translationsstart dient das erste ATG-Kodon („CCACCATGG“), des zweiten offenen Leserahmens. Die Kosensussequenz für den Translationsinitiationspunkt, CC(A/G)CCAUGG („Kozaksequenz“, Kozak, 1991) ist vollständig konserviert. Der nichttranslatierte Bereich nach dem Stopkodon umfaßt bis zum Beginn des Poly-A-Schwanzes 146 Basenpaare, das Stopkodon befindet sich an Position 3852. Der Homologievergleich der Aminosäuresequenz von Mm Flip mit den Homologen beim Menschen (Hs Flip), bei *Drosophila* (Dm Flip) und *C. elegans* (Ce Flip) ergibt Identitäten von 95%, 56% und 50% (Tab. 12). Die

genomische Sequenz von Maus *Flightless* konnte anhand der im Internet in Gendatenbanken zur Verfügung stehenden Sequenzen des „Mouse Genome Sequencing Projects“ mit Hilfe von Homologievergleichen rekonstruiert werden. Diese umfaßt 15,6 kb, ist auf dem Chromosom 11B lokalisiert, und enthält wie das humane Homolog 29 Introns (Campbell et al., 2000a).

	Mm Flightless	Hs Flightless	Dm Flightless	Ce Flightless
Mm Flightless		95%	56%	50%
Hs Flightless	86%		58%	50%
Dm Flightless	62%	63%		49%
Ce Flightless	51%	54%	56%	

Tab. 12: Homologievergleich der verschiedenen Flightless-cDNA- und Proteinsequenzen.

Der Homologievergleich wurde mit dem Programm NALIGN im Programmpaket PC-Gene erstellt. Die Werte für Identitäten auf Aminosäureebene sind fett gedruckt, diejenigen für einen Vergleich auf Nukleinsäureebene sind kursiv gedruckt. Wie erwartet ist die Identität von Maus Flightless auf Nukleinsäure- und Proteinebene zu Human Flightless am höchsten

3.4.2.2 Analyse der Aminosäuresequenz von Maus *Flightless*

Die potentielle Funktion und Struktur eines Proteins kann anhand seiner Aminosäuresequenz abgeleitet werden. Die Analyse von Proteinen erfolgt dabei auf vier Ebenen. Die *Primärstrukturanalyse* untersucht die Aminosäurezusammensetzung, die *Sekundärstrukturanalyse* die Faltung der Polypeptidkette, die *Tertiärstrukturanalyse* die dreidimensionale Struktur des gesamten Polypeptids und die *Quartärstrukturanalyse* die räumliche Anordnung der Untereinheiten eines Proteins. Die Primärstruktur ausschlaggebend dafür, welche dreidimensionale Struktur das Protein aufweist. Zunächst wurde eine Analyse der Primärstruktur von Maus Flightless durchgeführt, und diese nachfolgend durch eine Sekundärstrukturanalyse ergänzt. Das Ergebnis der Sekundärstrukturanalyse von Maus Flightless wurde anschließend vergleichend zu bereits vorhandenen Strukturdaten von Gelsolin analysiert. Dies ermöglichte die Identifikation von funktionell essentiellen invarianten Aminosäureresten.

3.4.2.2.1 Analyse der Primärstruktur von Maus *Flightless*

Die Aminosäuresequenz von *Mus musculus* Flightless (Mm Flip) wurde vergleichend zu Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip mit PCGene und im Internet verfügbaren Programmen analysiert (Tab. 13). Die Berechnung des isoelektrischen Punktes aus den einzelnen pK-Werten der positiv geladenen (Arginin, Lysin, Histidin), negativ geladenen (Asparaginsäure, Glutaminsäure) und polaren, ungeladenen (Cystein, Tyrosin) Aminosäuren ergab einen Wert von 5,61. Hsflip, Dmflip und Ceflip sind ebenfalls leicht saure Proteine (Tab. 13). Die Analyse der absoluten Aminosäurezusammensetzung der vier Flightless-Proteine zeigt neben zahlreichen sauren Aminosäuren, eine auffällig hohe Zahl an Leucinresten. Diese sind vor allem im N-terminalen Segment 1 konzentriert, das aus 16 Wiederholungen eines 23-Aminosäuren umfassenden leucinreichen

Motivs besteht (LRR = leucine rich repeat; Campbell et al., 1993). Darüberhinaus sind alle Flightless-Homologe instabile Proteine, die leicht degradiert werden (Tab. 13). Der negative mittlere Hydropathiewert (GRAVY) weist auf eine Membranassoziation dieser Proteine hin (Kyte und Doolittle, 1982). Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip weisen ähnliche Hydropathiewerte auf (Tab. 13).

Feature	Mmfli	Hsfli	Dmfli	Cefli
Anzahl an Aminosäuren	1271	1268	1256	1257
Molekulargewicht (kDa)	144,534	144,619	143,682	144,815
pI-Wert	5.61	5.75	5.56	5.77
Instabilitäts Index	40.63 instabil	43.64 instabil	47.22 instabil	41.30 instabil
mittlere Hydropathie (GRAVY)	-0.439	-0.442	-0.372	-0.500
negativ geladene aa (Asp + Glu)	175	180	178	190
positiv geladene aa (Arg + Lys)	153	157	146	164

Tab. 13: Physiochemische Eigenschaften von Flightless bei der Maus, dem Menschen, *Drosophila* und *C. elegans*

Die einzelnen Werte wurden unter Verwendung des Programms „ProPram“ bei „ExpASy“ und mit dem Programm PCGene berechnet.

Mit ROARGOS (Programmpaket PCGENE) konnte in der Aminosäuresequenz von Mm Flip und Hs Flip ein 16 Aminosäurereste umfassender hydrophober Aminosäureabschnitt (bei Mm Flip Position 403-418: LAGASPATVAAAAAVG) in der Übergangszone zwischen der LRR-Domäne (Segment 1) und dem Segment 2 identifiziert werden. In diesem Aminosäureabschnitt sind vorwiegend hydrophobe Aminosäuren wie Leucin (L), Alanin (A) und Valin (V) vertreten. Die Lage dieses Aminosäurebereichs wurde durch einen Hydropathieplot der Aminosäurereste 1-500 mit der Methode nach Kyte und Doolittle (1982) bestätigt (Abb. 39). Desweiteren ist anhand des Plots zu sehen, daß innerhalb der LRR-Domäne ein stetiger Wechsel kurzer hydrophober und hydrophiler Aminosäureabschnitte erfolgt, wobei die hydrophoben Abschnitte überwiegen. Nach Kobe und Deisenhofer (1994) sowie Buchanan und Gay (1996) basiert die Interaktion von LRR-Repeats mit Membranen auf dem überwiegend hydrophobe Charakter dieser Repeats.

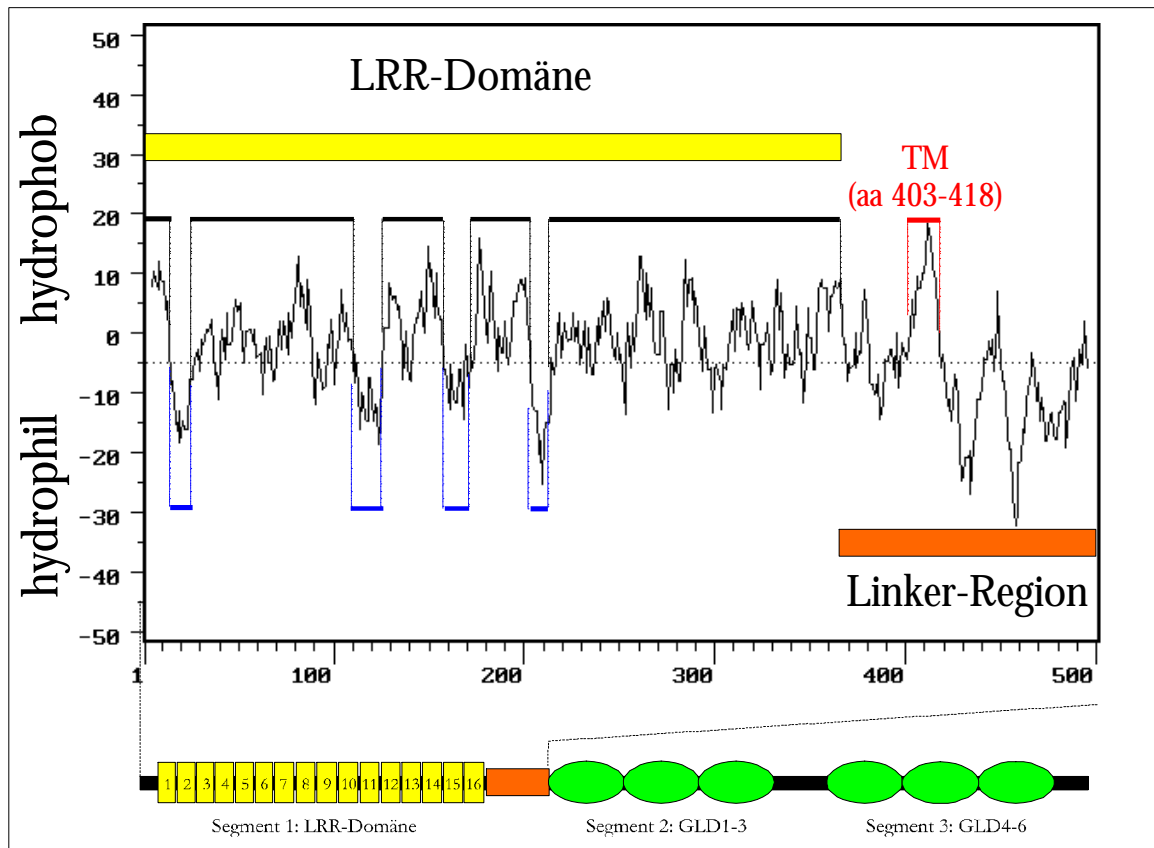


Abb. 39: Hydropathieprofil der Aminosäurereste 1-500 von Maus Flightless

Die Erstellung der Grafik erfolgte mit dem PCGene Programm „SOAP“. Der gelbe Balken markiert die Lage der LRR-Domäne, der orange Balken die Linker-Region zwischen der LRR-Domäne und den nachfolgenden „gelsolin-like“-Domänen. Die schwarzen Balken kennzeichnen hydrophobe Bereiche des Proteins, die blauen Balken hydrophile Bereiche innerhalb der LRR-Domäne. Der Hydropathieplot wurde anhand der Berechnung des Hydropathie-Index der Seitenketten der einzelnen Aminosäuren von Maus Flightless erstellt. Der Hydropathie-Index einer Aminosäure ist ein Indikator dafür, ob diese Kontakt zum wässrigen Medium (hydrophil) oder innerhalb eines Proteins liegt (hydrophob) (Kauzmann, 1958; Kyle und Doolittle, 1982; Clothia und Finkelstein, 1990).

Die Identifikation von potentiellen Proteinmotiven in der Aminosäuresequenz von Mmflip ermöglicht einen Einblick in die potentielle Regulation dieses Proteins. Diese Analysen wurden mit PCGene und im Internet zur Verfügung stehenden Programmen durchgeführt. Die Positionen der Proteinmotive sind in Abbildung 40 schematisch dargestellt, die genaue Lage ist im Anhang tabellarisch aufgelistet. In der Aminosäuresequenz von Mmflip konnten folgende Proteinmotive identifiziert werden: sieben N-Glycosylierungsstellen, vier Tyrosin Sulfatierungsstellen, eine „Glycosaminoglycan attachment site“, ein Leucin-Zipper-Motiv; 14 N-Myristoylierungsstellen, vier cAMP/cGMP-abhängige Phosphorylierungsstellen, 14 Proteinkinase C Phosphorylierungsstellen, 21 Caseinkinase II Phosphorylierungsstellen und vier Tyrosinkinase Phosphorylierungsstellen (Abb. 40).

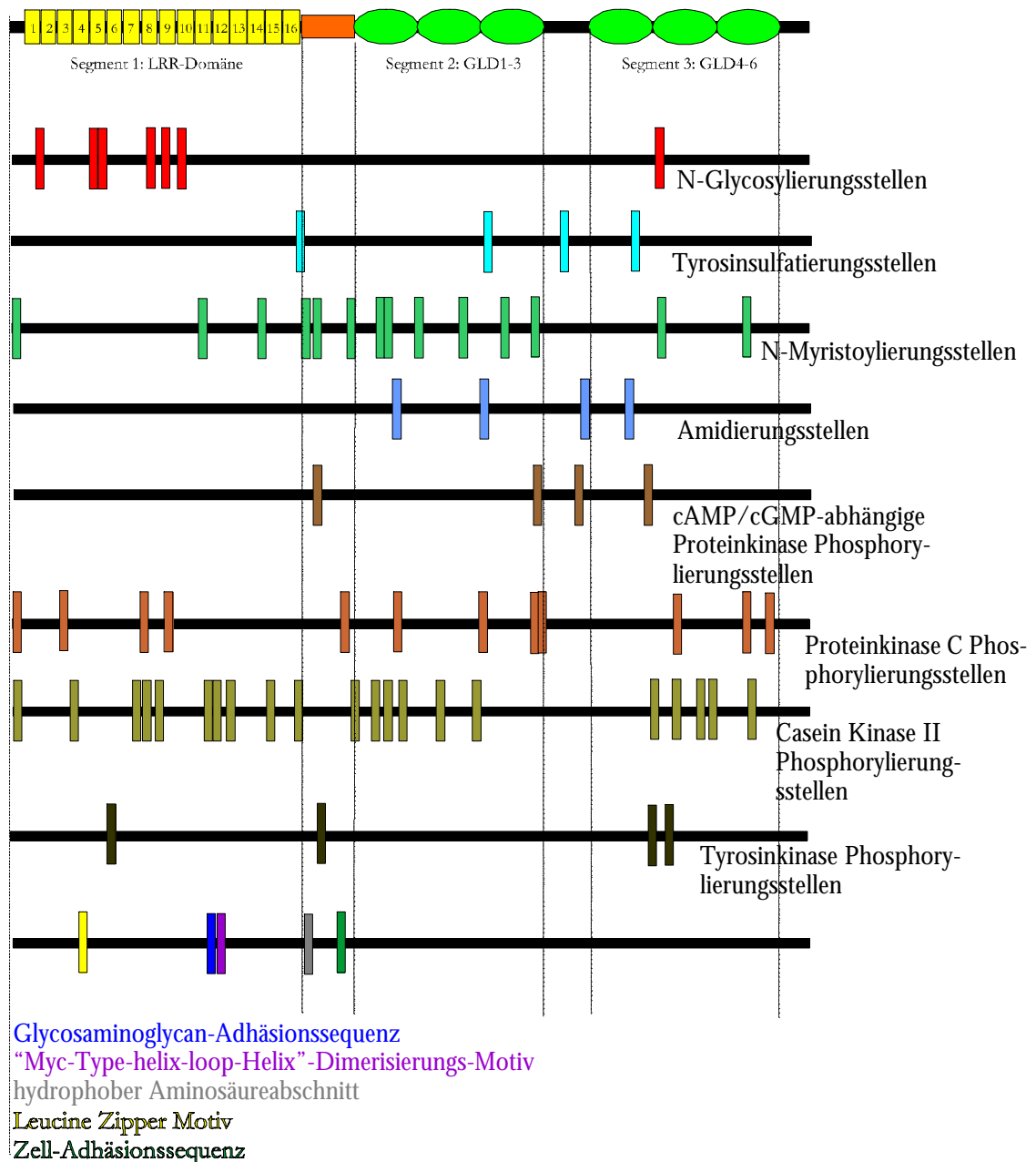


Abb. 40: Potentielle Proteinmotive von Mm Flip

3.4.2.2.2 Sekundärstrukturanalyse von Maus *Flightless*

Da die Sekundärstruktur eines Proteins durch seine Primärstruktur spezifiziert wird, kann die räumliche Anordnung einer Polypeptidkette theoretisch anhand der Aminosäuresequenz berechnet werden. Dies erfolgte computergestützt mittels umfangreicher Analyseprogramme, die im Internet zur Verfügung stehen. Basis des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Programms, ist die „Chou-Faßman“-Methode. Die Zuverlässigkeit dieser Berechnungen liegt nach Chou und Faßman (1978a, 1978 b) im Bereich von 60-80%. Berechnet wird die Wahrscheinlichkeit, mit der Aminosäureabschnitte einer Polypeptidkette in Helices, Faltblattstrukturen oder Schleifen vorliegen.

Diese Analysen ermöglichen einen ersten Einblick in die potentielle Sekundärstruktur. Die Daten können anschließend mit bereits vorliegenden Strukturinformationen von kristallographischen Analysen homologer Proteine verglichen werden.

Zunächst wurde die Aminosäuresequenz von Mm Flip mit „COIL“ (Programmpaket PCGENE) und „Paircoil“ (ExPASy) analysiert und eine „coiled-coil“ Region mit Tendenz zur Dimerisierung identifiziert (Abb. 41). Mit dem Programm „GGBSM“ (Programmpaket PCGENE) konnten in der Aminosäuresequenz von Mm Flip Bereiche mit helikaler (38%), schleifen- (45%), oder langgestreckter (15%) Konformationen lokalisiert werden (Abb. 41). Dies wurde anschließend durch eine Analyse mit dem „Protein Analysis Server“ (PSA; <http://bmercwww.bu.edu/psa/>) bestätigt. Dabei wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der Mm Flip eine bestimmte Sekundärstruktur einnimmt. Die graphische Darstellung erfolgt am Beispiel der LRR-Domäne von Mm Flip (Aminosäurereste 1-350) durch einen XY-Plot der Wahrscheinlichkeiten für eine bestimmte Struktur über der Aminosäuresequenz. Bezieht man die Antheipathizität mit ein, so läßt sich eine topographische Karte, ein Kontur-Plot erstellen (Abb. 42). Die Ergebnisse der PSA-Analyse der „gelsolin-like“-Domäne von Flightless wurden im Vergleich zu Sekundärstrukturdaten von Gelsolin analysiert. Abbildung 43 zeigt vergleichend zu Maus und Human Gelsolin, deren Sekundärstruktur bereits bekannt ist, die potentielle Lage der helikalen, strangförmigen und schleifenförmigen Aminosäurebereiche der „gelsolin-like“-Domänen von Mm Flip und Hs Flip.

Mm Flip zählt zur Strukturklasse von Proteinen mit alternierender α -helikaler und langgestreckter Struktur (α - β -Superklasse). Der C-Terminus liegt in β -Strängen alternierend mit α -Helices oder langgestreckten Schleifen vor, der mittlere Aminosäurebereich hingegen besteht mit hoher Wahrscheinlichkeit aus α - β -Domänen, wobei strangförmige Abschnitte in β -Faltblatt-Struktur und α -helikale Abschnitte durch Schleifen mit Wendungen verbunden sind. Der N-Terminus liegt überwiegend in α -helikaler Struktur mit kurzen strangförmigen Abschnitten vor, verbunden durch Schleifen.

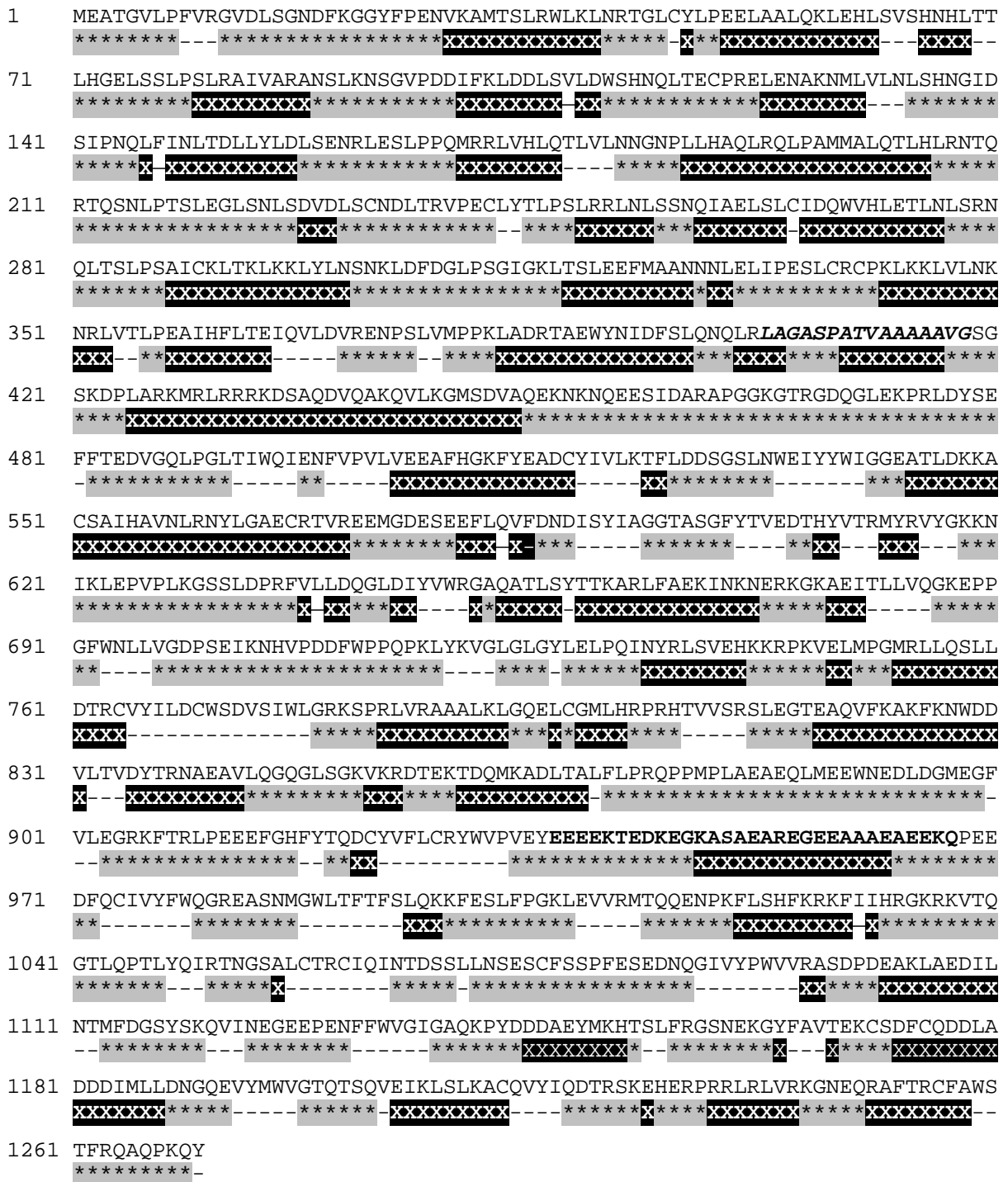


Abb. 41: Potentielle Sekundärstruktur von Mm Flip
Die Strukturmerkmale sind unterhalb der Proteinsequenz eingezeichnet. * kennzeichnet eine schleifenförmige Struktur, X eine helikale Struktur und --- langgestreckte Bereiche in der Sekundärstruktur. Die "coiled coil"-Region erstreckt sich von Position 946-977 und ist in fett hinterlegt; der hydrophobe Aminosäureabschnitt Bereich erstreckt sich über 16 Aminosäuren von Position 403 bis 418, und ist fett und kursiv eingezeichnet.

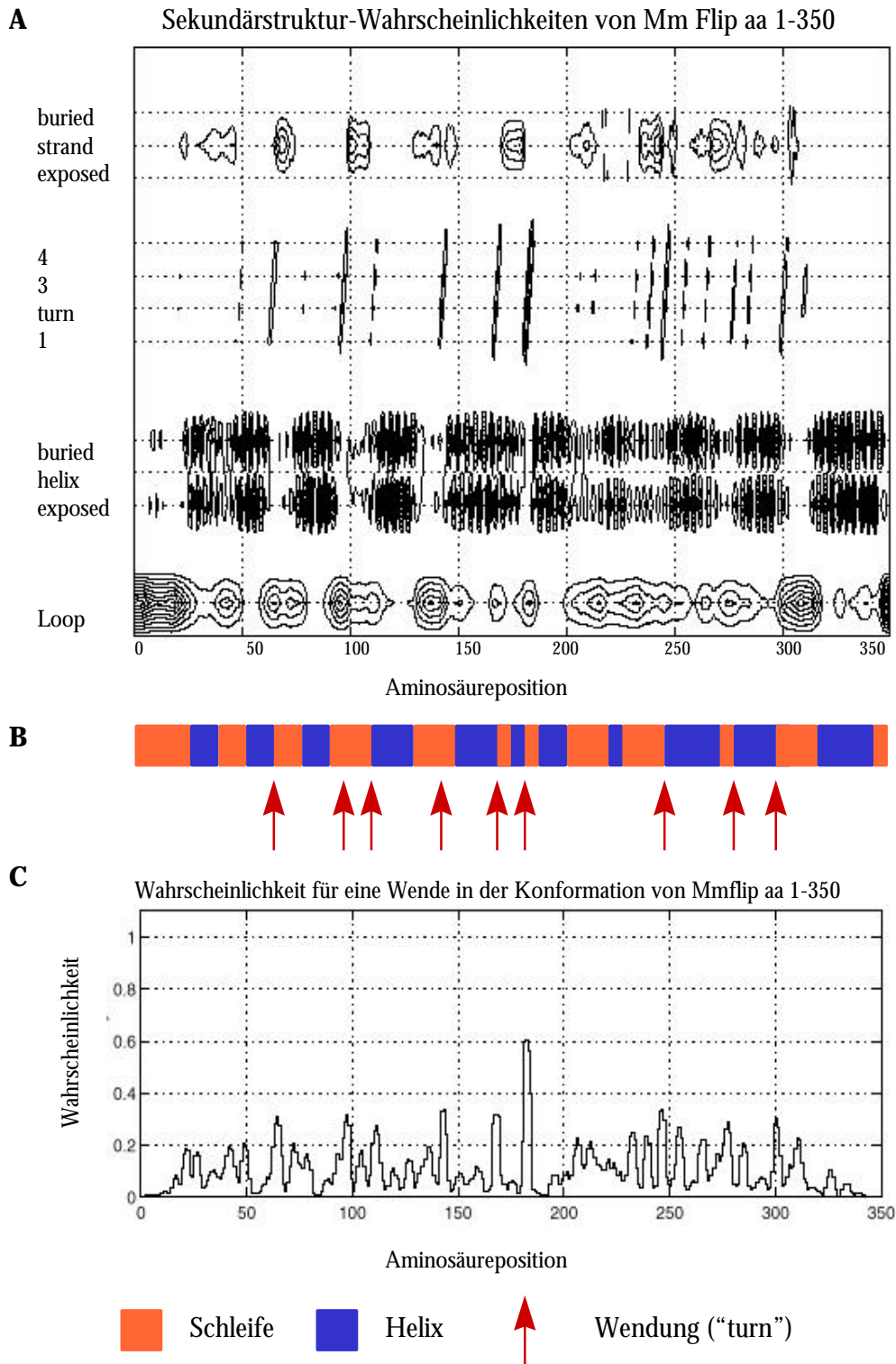


Abb. 42: Kontur-Plot und XY-Plot der Wahrscheinlichkeit bestimmter Sekundärstrukturen in Mm Flip aa 1-350

A: Wahrscheinlichkeit der Aminosäuresequenz von Mmflip (Position 1-350), eine bestimmte Sekundärstruktur einzunehmen. Darstellung als topographische Karte von Wahrscheinlichkeiten, in die auch Informationen über die Amphipathizität eingeflossen sind. Regionen hoher Wahrscheinlichkeit für eine bestimmte Struktur entsprechen den dunklen Bereichen mit hoher Liniendichte. Die Abstände der Linien entsprechen einem Wahrscheinlichkeits-Unterschied von 0,1. **B:** Schema der Lage helikaler Bereiche, schleifen- und strangförmigen Abschnitte. Stellen mit engen vier Aminosäurereste umfassende Wendungen in der Proteinsequenz sind mit rote Pfeile gekennzeichnet. **C:** XY-Plot der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Wendung in der Aminosäuresequenz.

Mmgel	-----MVEVHP-----EFL--KAKKEPGLQIWRVEKFDLVPVPPNLYGDFFTCD	42
Hsgel	QCRVP--EARPNSMVVEHP-----EFL--KAKKEPGLQIWRVEKFDLVPVPTNLYGDFFTGD	93
Mmfli	DARAPGGKGTRGDQGLEKPRLDYSEFFTEDVQQLPGLTIWQIENFVVPVLVEEAFHCKFYEAD	524
Hsfli	DARAPSGKVRWDQGLEKPRLDYSEFFTEDVQQLPGLTIWQIENFVVPVLVEEAFHCKFYEAD	524



Mmgel	AYVILKTVQLRNGNLQYDLHYWLGNECSQDESAAAAFTVQLDDYLNGRAVQHREVQGFESS	104
Hsgel	AYVILKTVQLRNGNLQYDLHYWLGNECSQDESAAAAFTVQLDDYLNGRAVQHREVQGFESA	155
Mmfli	CYIVLKTFLDSDGSLNWEIYYWIGGEATLDKKACSAIHAVNLRNYLGAECRTVREEMGDESE	586
Hsfli	CYIVLKTFLDSDGSLNWEIYYWIGGEATLDKKACSAIHAVNLRNYLGAECRTVREEMGDESE	586



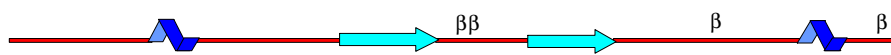
Mmgel	THSGYFKSGLKYYKGGVASGFKHVVPNEVVQRLFOVKGRRVVRATEVVPVSWDSFNNGDCFI	166
Hsgel	THSGYFKSGLKYYKGGVASGFKHVVPNEVVQRLFOVKGRRVVRATEVVPVSWESFNNGDCFI	217
Mmfli	EFLQVFDNDISYLAGGTASGFY-TVEDTHYVTRMYRVYGGKNIKLEPVPLKGSLLDRPFV-L	646
Hsfli	EFLQVFDNDISYLAGGTASGFY-TVEDTHYVTRMYRVYGGKNIKLEPVPLKGSLLDRPFV-L	647



Mmgel	LDLGNNIYQWCGSGSNKFERLKATQVSKGIRDNERSGRAQVHVSEETEPEAMLQVLGPKP-	227
Hsgel	LDLGNNIHQWCGSNSNRYERLKATQVSKGIRDNERSGRARVHVSEECTEPEAMLQVLGPKP-	278
Mmfli	LDQGLDIYVWRCAQATLSYTTKARLFAEKINKNERKGAETITLLVQCKEPPGFWNLLVGDPS	708
Hsfli	LDRGLDIYVWRCAQATLSSTTKARLFAEKINKNERKGAETITLLVQQLPEFWALGGEPS	709



Mmgel	----ALPEGTEDTAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGSMSVSLVADE----NF---FAQGPLRSE	278
Hsgel	----ALPAGTETAKEDAANRKLAKLYKVSNGAGTMSVSLVADE----NP---FAQGALKSE	329
Mmfli	EIKNHVPDDFWPPQPKLYKVLGLGYLELPQINRYLSVEHKKRPKVELMPPGMRLLQSLDTR	770
Hsfli	EIKKHVPEDFWPPQPKLYKVLGLGYLELPQINYKLSVEHKQRPKVELMPPRMRLLQSLDTR	771



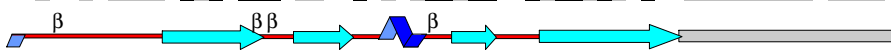
Mmgel	DCFILDHGRDCKIFVWKGKQANMEERKAALKTASDFISKMQYPRQTOVSVLPEGGETPLFKQ	340
Hsgel	DCFILDHGRDCKIFVWKGKQANTEERKAALKTASDFITKMDYPKQTOVSVLPEGGETPLFKQ	391
Mmfli	CVYILDQWSD--VSIWLGKSPRLVRAAALKLQELCGMLHRPRHIVVRSRLEGTAEAQVFKA	830
Hsfli	CVYILDQWSD--VFIWLGKSPRLVRAAALKLQELCGMLHRPRHATVRSRLEGTAEAQVFKA	831



Mmgel	FFKNWRDPDQTD-----GPGLG-YLSSHIANVERVPFDAGTLHT-----STAMAAQ	385
Hsgel	FFKNWRDPDQTD-----GLGLS-YLSSHIANVERVPFDAATLHT-----STAMAAQ	436
Mmfli	KFKNWDDVLTVDYTRNAEAVLQCGGLSGKVKRDTEKTDQMKADLTALFLPRQPPMLAEAEQ	892
Hsfli	KFKNWDDVLTVDYTRNAEAVLQSPGLSGKVKRDAEKKDQMKADLTALFLPRQPPMSLAEAEQ	893



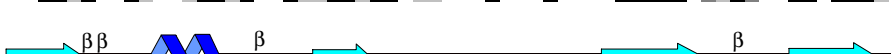
Mmgel	HGMDD-DGTGQKQIWRIEGNSNKVPVDPATYGFYGGDSYIILYNYRH-----	431
HSGEL	HGMDD-DGTGQKQIWRIEGNSNKVPVDPATYGFYGGDSYIILYNYRH-----	482
Mmfli	LMEEWNEDLDGMEGFVLEGRKFTRLPEEEFCHFYTQDCYVFLCRYWVWPVEYEEEEKTEDKEG	954
Hsfli	LMEEWNEDLDGMEGFVLEGRKFARLPEEEFCHFYTQDCYVFLCRYWVWPVEYEEEEKEDKE-	954



Mmgel	----GGRQGG-----IINYWQG-AQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPV	471
Hsgel	----GGRQGG-----IINYWQG-AQSTQDEVAASAILTAQLDEELGGTPV	522
Mmfli	KASAEAREGEEAAAEAEKQPEEDFQCIVYFWQGREASNMGWLTFFSLSQKKFESLFPCKLE	1016
Hsfli	-EKAEGCKEGEATAAEAEKQPEEDFQCIVYFWQGREASNMGWLTFFSLSQKKFESLFPCKLE	1015



Mmgel	QSRVVQCKEPAHLMSLFGCKPMTIYKGGTSRDGQTAPASIRLFQVRAS-SSGATRAVEVMP	532
Hsgel	QSRVVQCKEPAHLMSLFGGKPMIYKGGTSREGGQTAPASTRLFOVRAN-SAGATRAVEVLP	583
Mmfli	VVRMTQQ-ENPKFLSHFK-RKFIHRGKRKRVQGTLOPT---LYQIRTNGSALCTRCIQINT	1073
Hsfli	VVRMTQQENPKFLSHFK-RKFIHRGKRKRAVQGAQQPS---LYQIRTNGSALCTRCIQINT	1073



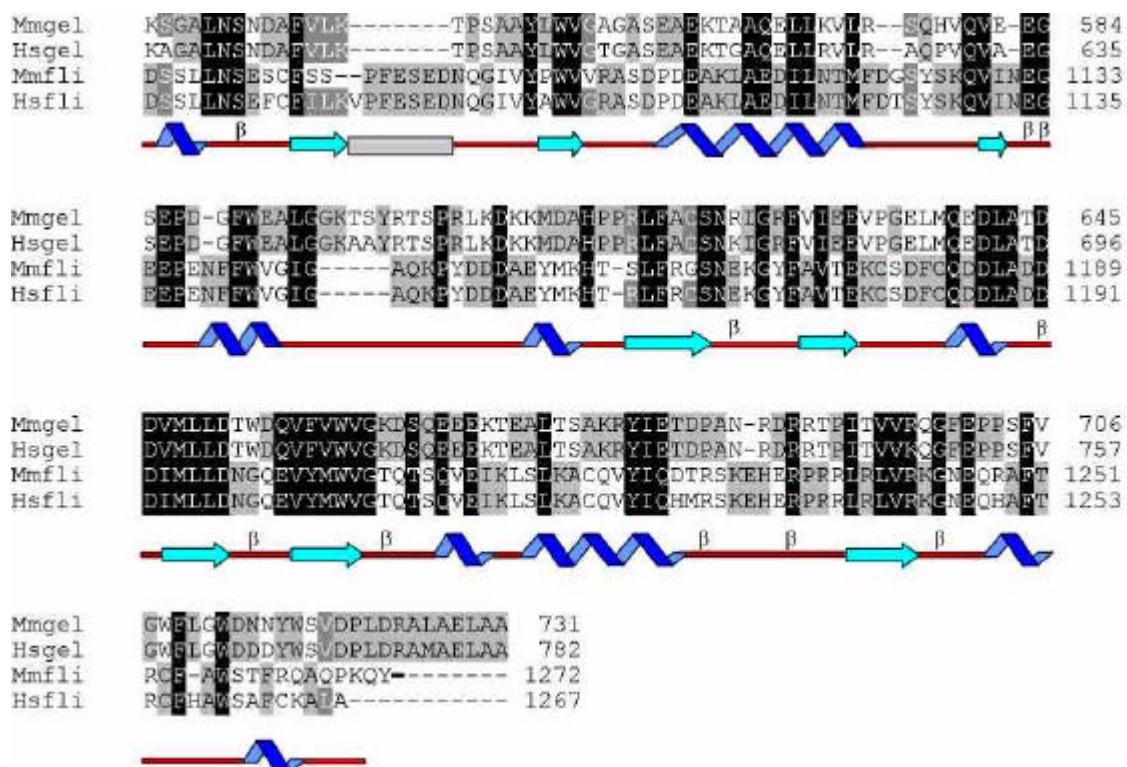


Abb. 43: Potentielle Sekundärstruktur der Segmente 2 und 3 von Flightless

Die Sekundärstruktur von Human Gelsolin ist erhältlich unter dem PDB Kode 1d0n unter der Adresse <http://www.biochem.ucl.ac.uk/>. In einem Homologievergleich von Gelsolin mit Mm Flip und Hs Flip unter Berücksichtigung der Ergebnisse der PSA-Analyse wurde die potentielle Sekundärstruktur von Mmflip abgeleitet. Rot: Schleifen, blau: α -helikale Abschnitte, türkis: β -Faltblattstrukturen. Unterhalb der Sequenz grau eingezeichnete Bereiche sind von unbekannter Struktur. Im Homologievergleich sind vollständig konservierte Aminosäurebereiche in schwarz hinterlegt (100%), teilweise konservierte Bereiche sind in grau hinterlegt. β : β -Turns, vier Aminosäuren umfassen den Wendungen in der Aminosäuresequenz.

3.4.2.2.3 Proteindomänen von Maus Flightless

Polypeptidketten, die aus mehr als 200 Aminosäureresten bestehen, falten sich in der Regel in zwei oder mehrere Domänen. Dadurch erhalten Proteine eine zwei- oder mehrlappige Struktur. Diese Domänen sind oftmals strukturell unabhängige Einheiten mit spezifischen Funktionen. Diese Funktionen sind wiederum durch die Proteinmotive dieser Domänen definiert, die in Ein-, Mehrzahl, oder in Form zahlreicher Wiederholungen vorkommen. Die Anordnung der Polypeptidkette in einzelne Proteindomänen verleiht dem Protein eine hohe Flexibilität bei Wechselwirkung mit einem Liganden. Andererseits ermöglicht die Fusion funktionell unterschiedlicher Domänen die Vereinigung verschiedener Funktionen in einem Protein.

Zunächst wurde die Aminosäuresequenz von Mm Flip mit den Programmen "SMART" (Schultz et al., 1998; 2000), „ProtParam“ (ExPASy) und "ProScan" (ExPASy) analysiert. Mm Flip ist wie seine Homologe aus drei Segmenten oder Großdomänen aufgebaut: eine N-terminale LRR-Domäne, die aus 16 Wiederholungen eines leucinreichen, 23 Aminosäuren umfassenden LRR-Motivs besteht (entsprechend der Literatur weiterhin als bezeichnet LRR-Repeat; LRR: "leucine rich repeat", Segment 1), und zwei C-terminale Segmente mit Homologie

zu Gelsolin (GLD1-6; "gelsolin-like-domains"; Segment 2 und Segment 3, Campbell et al., 1993; 1997b).

Flightless-Proteine nehmen eine Mittelstellung zwischen zwei verschiedenen Proteinfamilien ein. Einerseits gehört Flightless zur Gelsolin/Villin-Familie, da die Segmente 2 und 3 die klassische dreifach segmentale Anordnung wie Gelsolin aufweisen. Andererseits ist als funktionelle Erweiterung N-terminal eine LRR-Domäne angefügt (Claudianos und Campbell, 1995).

Proteine mit LRR-Domänen sind eine diverse Gruppe von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen und zellulären Lokalisationen in verschiedenen Organismen (Kobe und Deisenhofer, 1994, Marino et al., 2000). Gemeinsamkeit ist die Fähigkeit zur Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktion, vermittelt über die LRR-Domäne (Kobe und Deisenhofer, 1994; Liu et al., 1998). LRR-Domänen sind aus 20 bis 29 kurzen, leucinreichen Aminosäure-Sequenzmotiven aufgebaut, die als β - α -strukturelle Einheiten vorliegen. Dabei sind parallel angeordnete β -Faltblatt-Strukturen und α -helikale Bereiche durch Umkehrschleifen miteinander verbunden. Die β -Faltblatt-Strukturen bilden eine konkave, die α -helikalen Bereiche eine konvexe Oberfläche aus. Die Konsensussequenz aller hydrophoben LRR-Repeats enthält Leucinreste oder aliphatische Reste an den Positionen 2, 5, 7, 12, 16, 21 und 24, sowie einen Asparagin- oder Cysteinrest an der Position 10. Letzterer ermöglicht die Ausbildung von Wasserstoffbrücken zur Stabilisierung der Struktur der LRR-Domäne (Kobe und Deisenhofer, 1994; Marino et al., 2000). Die LRR-Domäne von Flightless ist homolog zu LRR-Repeats von Proteinen der Cyr1p-Unterfamilie: Maus Rsp-1, Human Rsu-1 und die Adenylatzyklase von *S. cerevisiae* (Buchanan und Gay, 1996).

Die Segmente 2 und 3 von Flightless sind homolog zu Gelsolin und weiteren Vertretern der Gelsolin/Villin-Familie wie Villin, Adseverin, Severin oder Fragmin (Kwiatkowski et al., 1988; Paunino et al., 1997; Yin und Stossel, 1979; Arai und Kwiatkowski, 1999). Gelsolin ist unter anderem an der Organisation des Aktincytoskeletts beteiligt, reguliert durch mikromolare Calciumkonzentrationen, dem pH-Wert und Phosphoinositide wie PPI/PIP₂ (Arai und Kwiatkowski 1999, Meerschaert et al., 1998, Yin und Stossel, 1979). Gelsolin modifiziert Aktinfilamente indem es diese entzwei schneidet („severing“), und an das Plus-Ende eines der beiden Filamente bindet („capping“). Zudem reguliert Gelsolin die Nukleation von Aktinfilamenten und moduliert Membran-Cytoskelett-Interaktionen (Sun et al., 1999).

Mit dem Programm SMART wurden in der Aminosäuresequenz von Mm Flip 12 LRR-Repeats im Segment 1 identifiziert. Anhand der Konsensussequenz für 23-Aminosäurereste umfassende LRR-Repeats (xx α xxLxxLxxLD/NLSxN x α xx α P, wobei α für einen hydrophoben aliphatischen Aminosäurerest wie L/I oder V steht, und x variabel ist, Claudianos und Campbell,

1995) wurden 12 hoch konservierte LRR-Repeats (LRR-Motive 3-7 und 10-16) und 4 geringer konservierte Repeats identifiziert. Dies wurde durch Analysen mit ProtParam und ProScan bestätigt. Mm Flip weist wie Hs Flip, Ce Flip und Dm Flip 16 Wiederholungen des 23 Aminosäuren umfassenden LRR-Motivs auf. Abbildung 44 zeigt in einem Homologievergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von Mm Flip, Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip den hohen Konservierungsgrad dieser Domäne innerhalb der Flightless-Subfamilie auf.

Bei Mm Flip sind 12 der 16 LRR-Repeats hoch konserviert, nur an 4 Positionen erfolgen konservative Aminosäuresubstitutionen. Die LRR-Repeats 1 und 2 sowie 8 und 9 hingegen sind geringer konserviert (Abb. 44). Der Konservierungsgrad der LRR-Domäne von Mm Flip gegenüber Hs Flip liegt bei 94,75%, gegenüber Dm Flip bei 56,25% und Ce Flip bei 53,50%. Variationen in der Aminosäuresequenz erfolgen vorwiegend außerhalb der Konsensussequenz bei invarianten Aminosäureresten. Diese variablen Aminosäurereste sind aber ausschlaggebend für die Spezifität einer LRR-Domäne für einen Liganden oder Interaktionspartner (Kobe und Deisenhofer, 1994). Da die Aminosäurereste außerhalb der Konsensussequenz bei Mm Flip und Hs Flip gegenüber Ce Flip und Dm Flip nur teilweise konserviert sind, binden Mm Flip-LRR und Hs Flip-LRR möglicherweise andere Liganden als Dm Flip-LRR oder Ce Flip-LRR (Claudianos und Campbell, 1995).

An die LR-Domäne angeschlossen folgt eine Linkerregion und nachfolgend die Segmente 2 und 3 mit Homologien zu Gelsolin. Die Segmente 2 und 3 bestehen jeweils aus drei Untereinheiten (oder GLD's: „gelsolin-like-domains“), das Segment 2 aus den GLD's 1-3, das Segment 3 aus GLD's 4-6, wobei GLD 1 hochhomolog zu GLD 4, GLD 2 zu GLD 5 und GLD 3 zu GLD 6 ist. Nach Way und Weeds (1988) entstanden die beiden Segmente von Gelsolin ausgehend von einem ursprünglichen Gen durch Duplikation. Abbildung 45 zeigt in einer Übersicht anhand der Aminosäuresequenz die Lage der einzelnen Domänen von Maus Flightless.

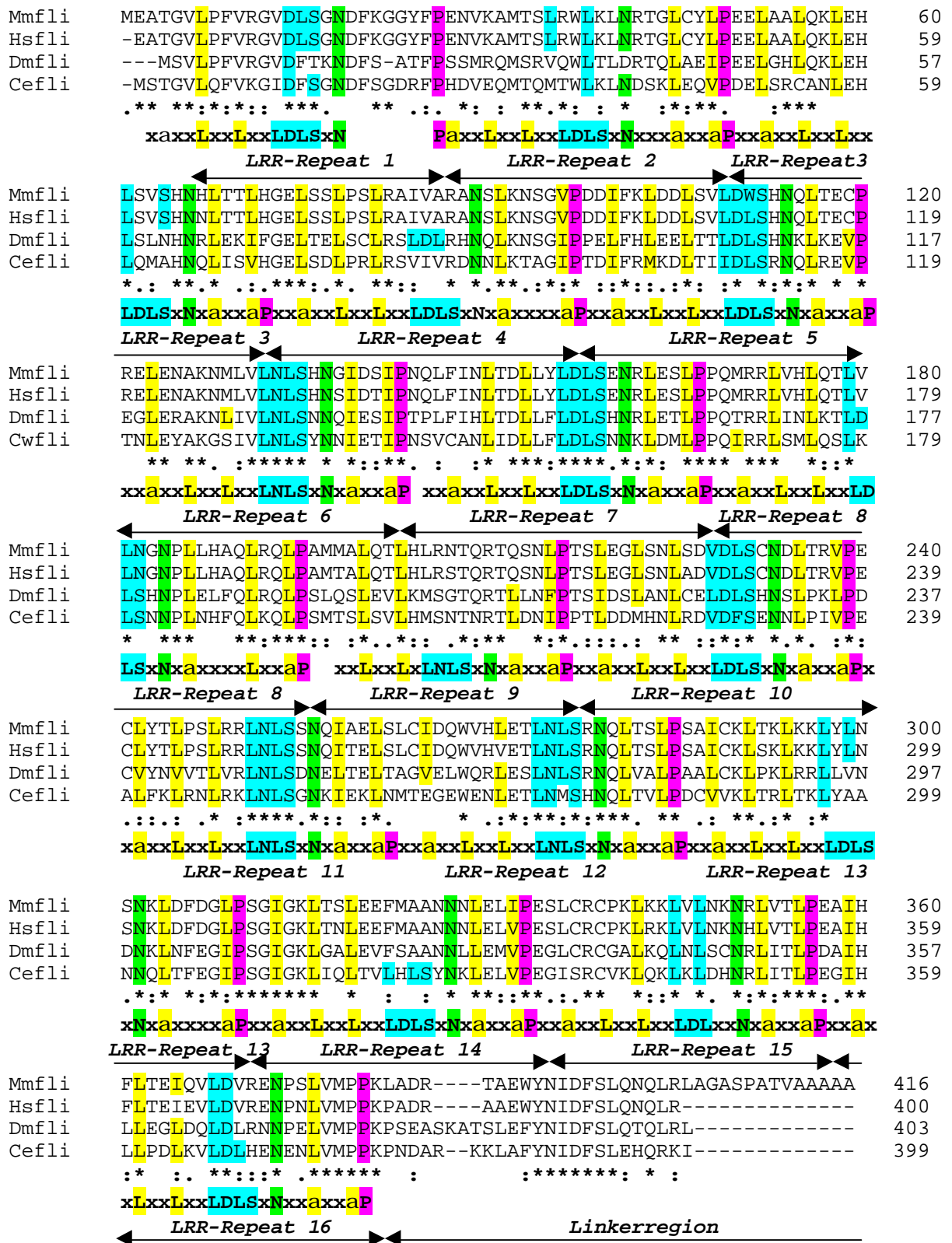


Abb. 44: Homologievergleich der LRR-Domänen von Mm Flip, Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip. Die LRR-Domäne weist 16 Wiederholungen eines konservierten 23-Aminosäuren umfassenden hydrophoben Motivs auf. Der Homologievergleich zeigt die Lage der LRR-Repeats anhand von Pfeilen unterhalb der Aminosäuresequenz: **LRR1** : Aminosäurereste 9-26, **LRR2**: 27-49, **LRR3**: 50-72; **LRR4**: 73-97, **LRR5**: 98-120, **LRR6**: 121-143, **LRR7**: 144-167, **LRR8**: 168-196, **LRR9**: 197-217, **LRR10**: 218-240, **LRR11**: 241-263, **LRR12**: 264-286, **LRR13**: 287-311, **LRR14**: 312-334, **LRR15**: 335-357, **LRR16**: 358-380.

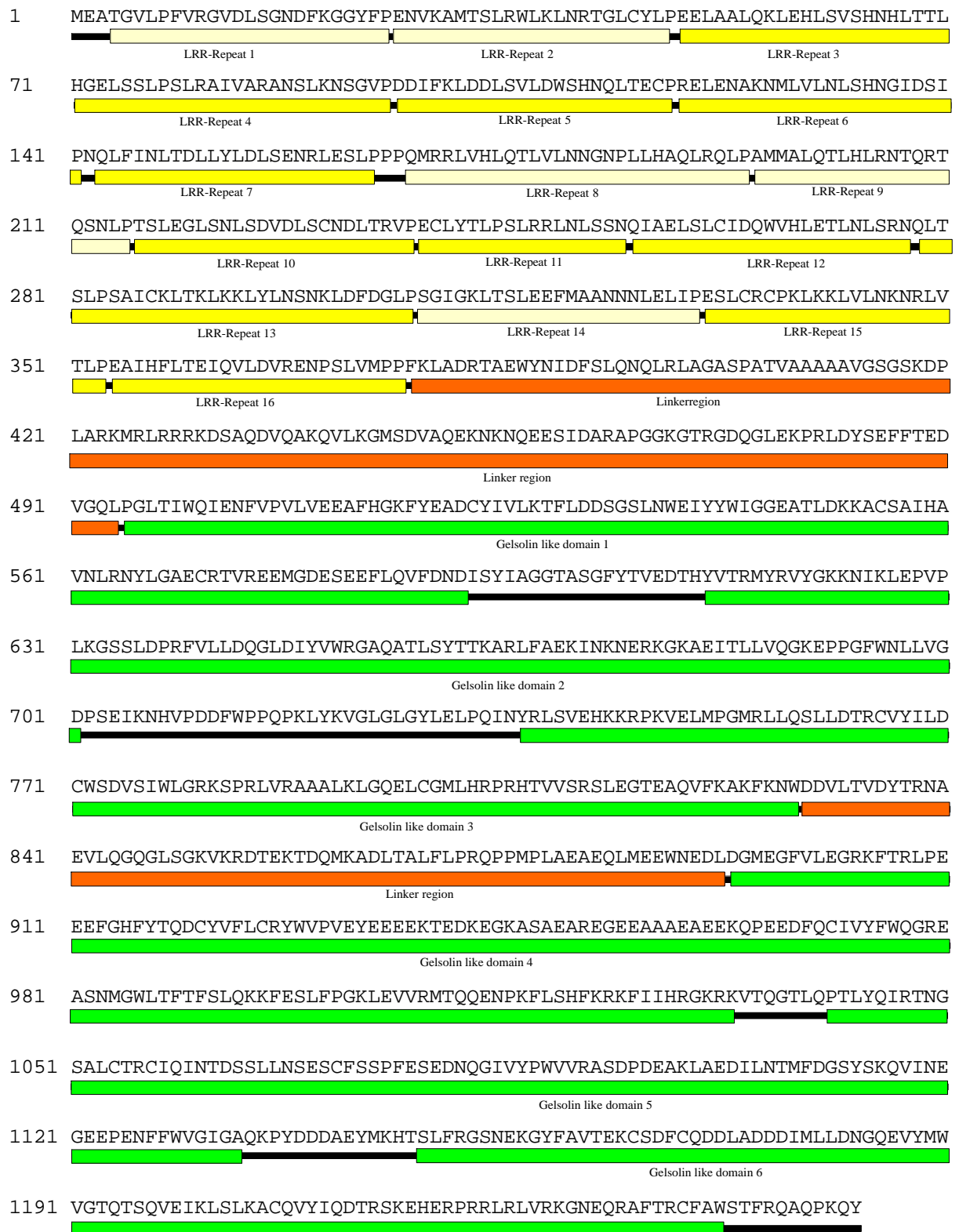


Abb. 45: Lage und Aminosäuresequenz der einzelnen Proteindomänen von Mm Flip

Mm Flip verfügt über folgende Domänen: Segment 1 besteht aus 16 Wiederholungen eines 23 Aminosäuren umfassenden LRR-Motives (12 hochkonservierte Repeats (gelber Balken) und 4 weniger stark konservierte Repeats (hellgelber Balken). An eine Linkerregion angeschlossen (orange) sind 6 "gelsolin-like Domänen" oder GLD's wobei die GLD1, GLD2 und GLD3 das Segment 2, sowie GLD4, GLD5 und GLD6 das Segment 3 ausbilden.

3.4.2.2.4 Phylogenetische Analyse von Maus *Flightless*

Flightless-Proteine gehören infolge der Fusion einer LRR-Domäne mit zwei Segmenten homolog zu Gelsolin zu zwei verschiedenen Proteinfamilien (Campbell, 1993; Claudianos und Campbell, 1995). Um die Zugehörigkeit von Maus *Flightless* innerhalb der Gelsolin/Villin-Familie zu untersuchen, wurde ein ClustalW-Homologievergleich der Aminosäuresequenzen der Segmente 2 und 3 der *Flightless*-Proteine mit 23 Proteinen aus 11 Spezies und 5 Klassen der Gelsolin/Villin-Familie durchgeführt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 46 als Phylogramm dargestellt. Das Phylogramm wurde mit *D. discoideum* Severin und *P. polycephalum* Fragmin als Außengruppe „gerootet“. Die verschiedenen Vertreter der Gelsolin/Villin-Familie bei Vertebraten und Invertebraten sind weitgehend voneinander getrennt. Maus *Flightless* bildet zusammen mit seinen Homologen beim Menschen, *Drosophila* und *C. elegans* eine Untergruppe in der Gelsolin/Villin-Familie aus. Die Gelsolin/Villin-Familie umfaßt bei den Säugetieren insgesamt sieben Mitglieder mit homologen Segment-Strukturen und Funktionen: Gelsolin (1) (Kwiatkowski et al., 1988, Paunino et al., 1997; Yin und Stossel, 1997), Adseverin (2), Villin (3) (Bretscher und Weber, 1980), Supervillin (4) (Pestonjamas et al., 1997), Advillin (5) (Marks et al., 1998); *Flightless* (6) (de Couet et al., 1995) und das monomere Protein CapG (7).

Mit der „Neighbor-Joining“-Methode (Phylip-Programmpaket, Felsenstein, 1993) wurde eine Distanzmatrix berechnet und eine Maximum-Parsimony-Analyse durchgeführt. Dadurch wurde die Nähe oder Ferne der verschiedenen Familienmitglieder und die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der eine Abzweigung innerhalb des Phylogramms erfolgt. *D. discoideum* Severin und *P. polycephalum* Fragmin wurden wiederum als Außengruppe definiert und bilden die Basis des Phylogramms (Abb. 47). Auch hier bleiben die Taxa weitgehend zusammen, und Abzweigungen weisen fast immer Werte von >70% auf (Abb. 47). *Flightless*-Proteine bilden ebenfalls eine Untergruppe innerhalb der Gelsolin/Villin-Familie aus, wobei *Ce Flip* der ursprünglichste Vertreter ist. Das Phylogramm zeigt zudem die postulierte Entstehung der Gelsolin/Villin-Familie auf. Gelsolin dürfte ausgehend von Severin/Fragmin durch Duplikation entstanden sein (Claudianos und Campbell, 1995; Pestonjamas et al., 1997). *Flightless*-Proteine zeigen auch Homologien zu ursprünglichen monomeren Vertretern dieser Familie auf. In ihrer Gesamtstruktur ähneln diese aber eher Gelsolin oder Villin (Claudianos und Campbell, 1995; Kwiatkowski et al., 1986; Way und Weeds, 1988; Pendergast und Ziff, 1991; Finidori et al., 1992; Nakamura et al., 1994).

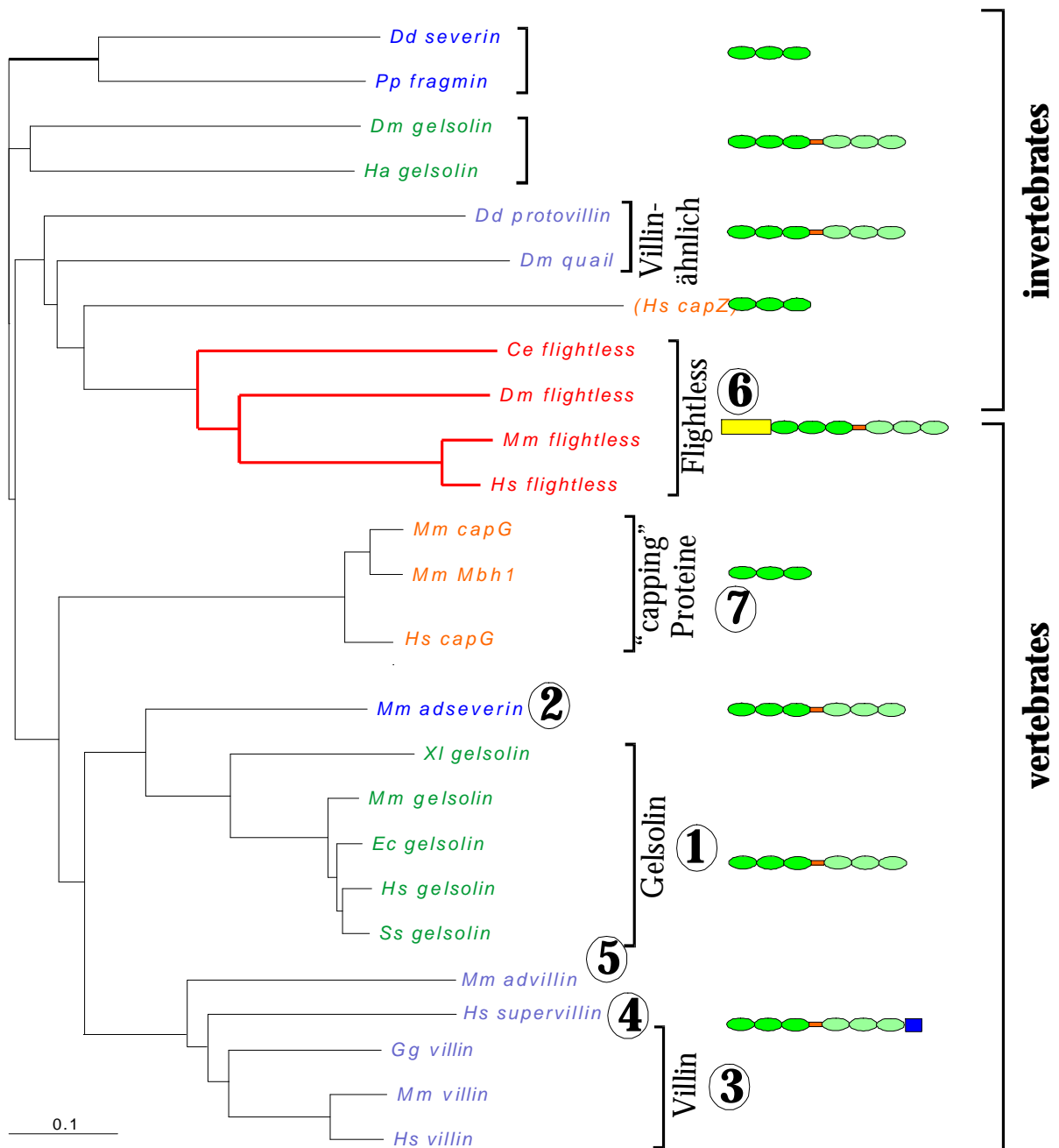


Abb. 46: Phylogramm der verwandtschaftlichen Beziehungen der Flightless-Subfamilie zur Gelsolin/Villin-Familie

Ausgewählte Vertreter der Gelsolin-Villin Superfamilie wurden in einem Homologievergleich der Aminosäuresequenzen mit der Flightless-Subfamilie analysiert. Der Homologievergleich für das Phylogramm wurde mit dem Programm ClustalW berechnet, und unter Verwendung des Programms Treview dargestellt. Das Phylogramm ist als Baum in Bezug zu Pp fragmin: *P. polycephalum* Fragmin (PORS06287) und Dd severin: *D. discoideum* severin (PIRA28517) dargestellt. Ha gelsolin: *H. americanus* gelsolin (Z29534); Dm gelsolin: *D. melanogaster* gelsolin (L08794); Ce flightless: *C. elegans* flightless (U01183); Dm flightless: *D. melanogaster* flightless (U01182); Hs flightless: *H. sapiens* flightless (U01184); Mm flightless: *M. musculus* flightless; Dd provillin: *D. discoideum* Protovillin (X74387); Dm quail: *D. melanogaster* villin-like protein quail (U10070); Hs capZ: *H. sapiens* capping protein (M94345); Mm adseverin: *M. musculus* adseverin (U04354); XI gelsolin: *X. laevis* gelsolin (P14885); Mm gelsolin: *M. musculus* gelsolin (P13020); Ec gelsolin: *E. caballus* gelsolin (Q28372); Hs gelsolin: *H. sapiens* gelsolin (UX04412); Ss gelsolin: *S. scrofa* gelsolin (M36927); Gg villin: *G. gallus* villin (P02640); Hs villin: *H. sapiens* villin (X12901); Mm villin: *M. musculus* villin (M98454); Hs capG: *H. sapiens* Macrophagen capping protein G (P40121); Mm Mbh1: *M. musculus* Mbh1 (X54511); Mm capG: *M. musculus* capG (NM_007599). Subfamilien: (1) Gelsolin; (2) Adseverin, (3) Villin, (4) Supervillin, (5) Advillin, (6) Flightless, (7) „capping“ Proteine.

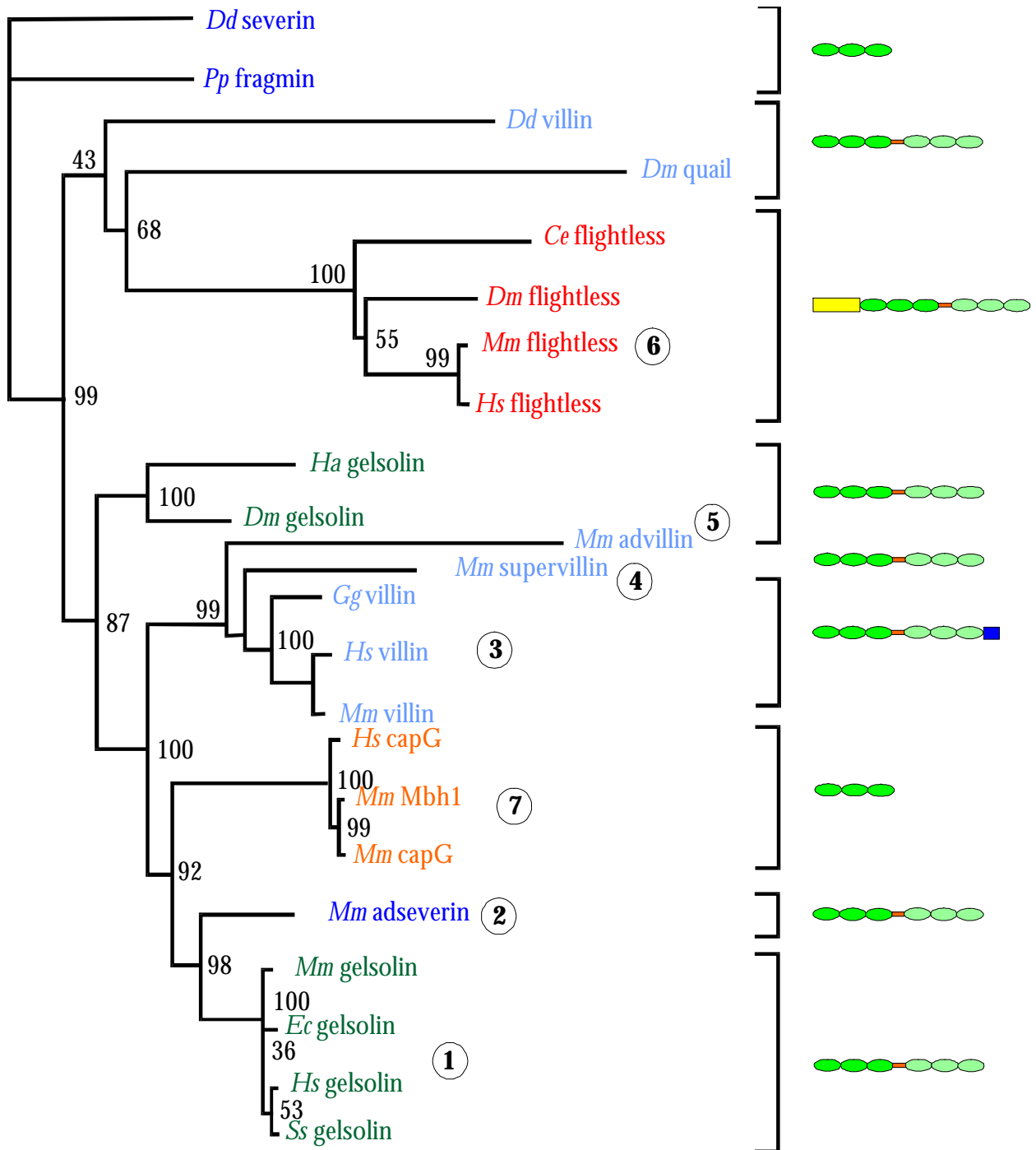


Abb. 47: Darstellung der Verwandtschaftsbeziehungen als berechnetes Phylogramm

Das Phylogramm wurde mittels einer Distanzmatrix unter Verwendung der „Neighbor-Joining“-Methode mit dem Programm Phylip 3.1 berechnet, mit der Außengruppe *D. dicoideum* Severin und *P. polycephalum* Fragmin „gerootet“, und als Baum dargestellt. Bootstrap-Werte sind in % an den Knotenpunkten angegeben. Die Länge der Äste spiegelt Aminosäure-Substitutionen zwischen den einzelnen Proteinen dar, sie zeigen die Nähe bzw. Ferne der einzelnen Vertreter dieser Familie zueinander an. Die verschiedenen Proteine gruppieren sich in sechs Clustern, deren Struktur schematisch dargestellt ist. Flightless-Proteine bilden eine eigene Unterfamilie und sind relativ früh während der Evolution entstanden. Das monophyletische Phylogramm zeigt zudem die Veränderungen innerhalb dieser Superfamilie durch Duplikationen, Insertionen und Deletionen. Subfamilien: (1) Gelsolin; (2) Adseverin, (3) Villin, (4) Supervillin, (5) Advillin, (6) Flightless, (7) „capping“ Proteine.

Zur Analyse der Verwandtschaftsverhältnisse in der LRR-Familie wurde ein ClustalW-Homologievergleich von 40 Proteinen mit LRR-Domänen unterschiedlicher Länge und zellulärer Lokalisation durchgeführt (Abb. 48). Die höchsten Identitäten weist die Flightless-LRR-Domäne zu Human Rsu-1, Maus Rsp-1, *S. cerevisiae* und *S. kluyveri* Adenylatcyclasen und Proteinkinasen bei *A. thaliana* auf (Kataoka et al., 1985; Cutler et al., 1992; Tsuda und Cutler, 1993). Diese Proteine werden mit den Flightless Proteinen in der Cyr1p-Klasse zusammengefaßt (Buchanan und Gay, 1996).

3.4.2.2.5 Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse

Maus Flightless ist wie seine Homologe ein leicht saures Protein mit einem pI-Wert von 5,61. Am N-Terminus befindet sich eine LRR-Domäne, aufgebaut aus 16 Wiederholungen eines 23 Aminosäurereste umfassenden hydrophoben Motivs. Daran angeschlossen sind zwei Segmente mit Homologien zu Gelsolin, die aus jeweils drei „gelsolin-like-domains“ bestehen (Campbell et al., 1993; Claudianos und Campbell, 1995). Mm Flip weist zahlreiche Proteinmotive auf, von denen verschiedene charakteristisch sind für extrazellulär lokalisierte Proteine oder Proteinabschnitte. Es dürften sich aber um nichtfunktionelle Motive handeln, da Flightless ein cytoplasmatisches Protein ist. Der hydrophobe Aminosäureabschnitt, die N-Myristoylierungsstellen und der negative mittlere Hydropathiewert weisen auf eine Membran-Assoziation von Flightless hin. Die Sekundärstruktur-analyse ergab, daß Maus Flightless zur α - β -Superklasse von Proteinen mit überwiegend α -helikaler und langgestreckter Struktur zählt. Phylogenetisch bilden die Flightless-Proteine innerhalb der Gelsolin/Villin-Familie eine eigene Untergruppe aus. Diese Gruppe ist nach Claudianos und Campbell (1995) durch Duplikation eines ancestralen Vorläuferproteins und Fusion einer LRR-Domäne evolutionär nach Gelsolin und vor Villin entstanden. Innerhalb der Familie der LRR-Proteine bilden Flightless-Proteine eine Untergruppe mit weiteren LRR-Proteinen aus, die ebenfalls 23 Aminosäuren umfassende LRR-Repeats besitzen. Diese Proteine interagieren mit Ras-Proteinen, und können über ihre LRR-Domäne an Membranen assoziieren (Kobe und Deisenhofer, 1994; Buchanan und Gay, 1996; Buchanan et al., 1998).

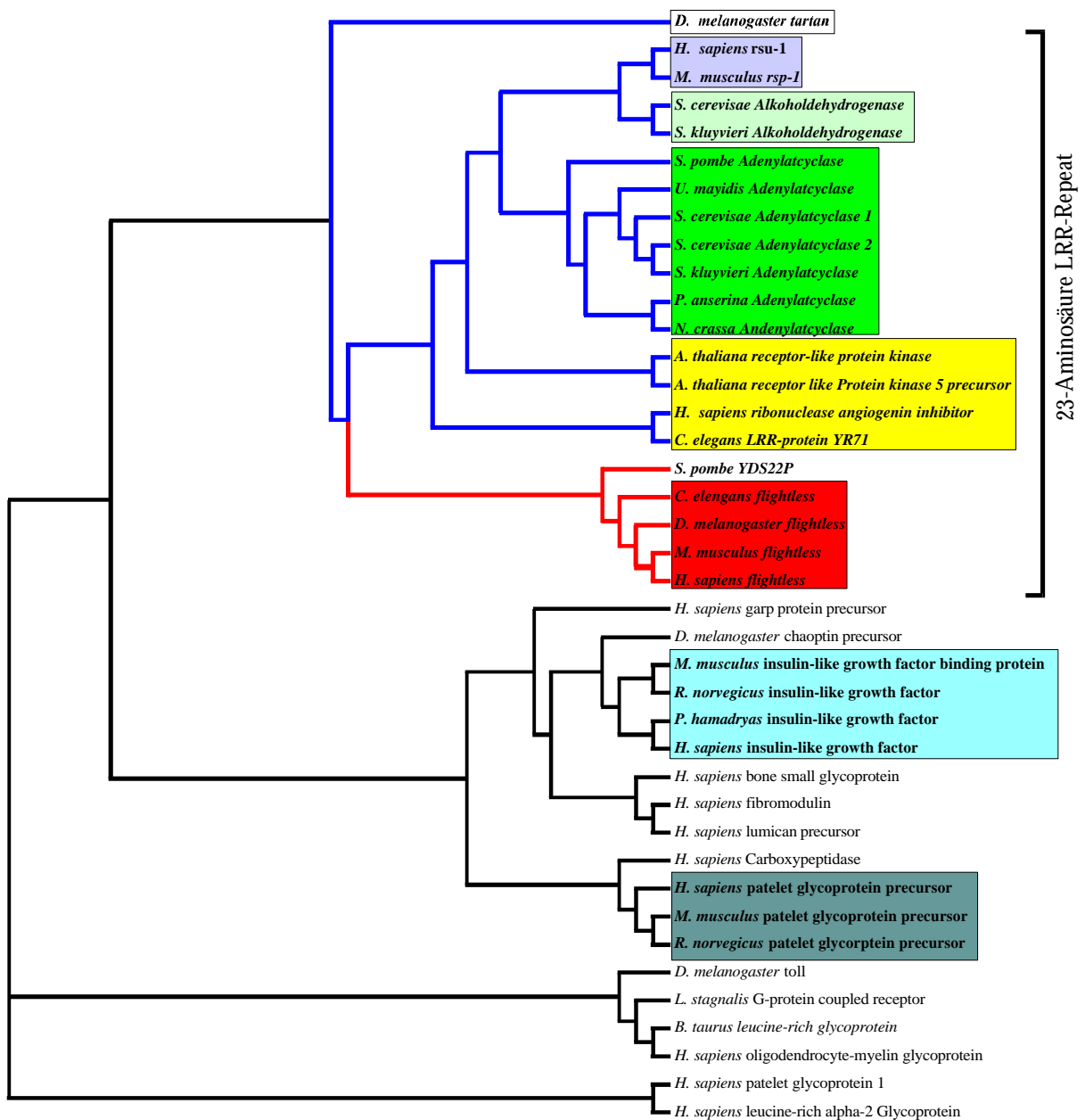


Abb. 48: Phylogramm der verwandtschaftlichen Beziehungen der Flightless-Familie in Bezug zu ausgewählten Vertretern der LRR-Proteinfamilie

Die Aminosäuresequenzen von Vertretern unterschiedlicher Subfamilien der LRR-Proteinfamilie wurden in einem ClustalW-Homologievergleich analysiert, und unter Verwendung des Programms Treeview als Phylogramm dargestellt. Die einzelnen Subfamilien sind farbig hinterlegt. *D. melanogaster tartan* (U02078), *H. sapiens rsu-1* (HSRSP1), *M. musculus rsp-1* (HMRSP1), *S. cerevisiae* Alkoholdehydrogenase (S50459), *S. kluyveri* Alkoholdehydrogenase (S31537), *S. pombe* adenylatcyclase (P14605), *U. mayidis* Adenylatcyclase (P49606), *S. cerevisiae* Adenylatcyclase 1 (P08678), *S. cerevisiae* Adenylatcyclase (M12057), *S. kluyveri* Adenylatcyclase (X56042), *P. anserina* Adenylatcyclase (Q01513), *N. crassa* Adenylatcyclase (Q01631), *A. thaliana* „receptor-like“ Proteinkinase (M84660), *A. thaliana* „receptor-like“ Proteinkinase 5 precursor (P47735), *H. sapiens* ribonuclease angiogenin inhibitor (M36717), *C. elegans* LRR-Protein YR71 (Q09564), *S. pombe* YDS22P (M57495), *C. elegans* flightless (U01183), *D. melanogaster* flightless (U01182), *H. sapiens* flightless (U00184), *H. sapiens* garp protein precursor (Q14392), *D. melanogaster* chaoptin precursor (M19013), *M. musculus* insulin-like growth factor (A35841), *R. norvegicus* insulin-like growth factor (P35859), *P. hamadryas* insulin-like growth factor (O02833), *H. sapiens* insulin-like growth factor (P35858), *H. sapiens* bone small glycoprotein (J04599), *H. sapiens* fibromodulin (X72913), *H. sapiens* lumican precursor (P51884), *H. sapiens* Carboxypeptidase (P22792), *H. sapiens* platelet glycoprotein precursor (P40197), *M. musculus* platelet glycoprotein precursor (O08742), *R. norvegicus* platelet glycoprotein precursor (O08770), *D. melanogaster* toll (M19969), *L. stagnalis* „G-protein coupled“ receptor precursor (P46023), *B. taurus* leucine-rich glycoprotein (S45673), *H. sapiens* oligodendrocyte-myelin glycoprotein (X51694), *H. sapiens* glycoprotein 1 (J02940), *H. sapiens* leucine-rich alpha-2 glycoprotein (P02750).

3.4.2.3 Herstellung eines spezifischen Antiserums gegen *Flightless*

Mit dem Ziel einer biochemischen Charakterisierung, zellulären und subzellulären Lokalisation von *Flightless* wurde ein C-terminaler Aminosäureabschnitt rekombinant exprimiert, und zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt.

3.4.2.3.1 Generierung eines Antiserums gegen rekombinant exprimiertes *Flightless*

Zunächst wurde der C-Terminus von Rn *Flightless* im „GST-Gene Fusion System“ als Fusionsprotein rekombinant exprimiert. Dazu wurden die cDNA-Inserts der Ratten *Flightless* Klone 4.6.4 und 2.3.2 in pGEX-Expressionsvektoren kloniert. Das exprimierte Protein wurde an Sepharose 4B aus dem Bakterienlysat aufgereinigt, und anschließend durch einen Thrombinverdau vom GST-Protein abgetrennt, oder alternativ als Fusionsprotein mit GST von der Sepharose 4B eluiert. Die Expressionsprodukte 2/1 (Klon 4.6.4) und 6/3 (Klon 2.3.2) wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt, und die Proteine mit Coomassie gefärbt (Abb. 49). Die Fragmentierung der exprimierten Proteine erfolgte bei Abtrennung vom GST durch Thrombinverdau, da sich in der C-terminalen Aminosäuresequenz von *Flightless* zwei Thrombin-Schnittstellen befinden (Abb. 50). Das Expressionsprodukt von Klon 4.6.4 (2/1) wurde zur Immunisierung des Kaninchens eingesetzt. Klon 4.6.4 kodiert für ein Proteinfragment von 320 Aminosäuren mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 36 kDa. 2/1 umfasst partiell die GLD 4, sowie die GLD 5 und 6 (Abb. 50). Die Immunisierung wurde wie zuvor beschrieben mit jeweils 250 µg Protein pro Immunisierung durchgeführt. Unter Einhaltung des Immunisierungsschemas erfolgte nach 80 Tagen die Endblutung, und anschließend die Reinigung des Antiserums durch Affinitätschromatographie am Antigen. Alle immunohistochemischen und biochemischen Experimente wurden mit den gereinigten Anti-*Flightless* Antikörpern durchgeführt.

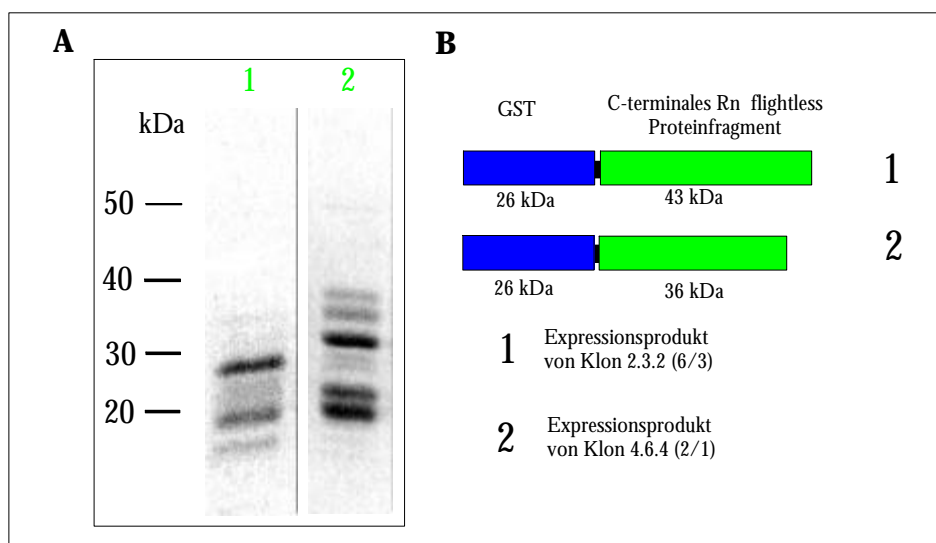


Abb. 49: Expressionsprodukte der Klone 4.6.4 und 2.3.2

A: SDS-Page und Coomassiefärbung der Expressionsprodukte von Klon 2.3.2 (Spur 1: 6/3) und 4.6.4 (Spur 2: 2/1) nach Abtrennung vom GST. Nach der Expression folgte eine Aufreinigung der Bakterienlysate an Sepharose 4B, und ein Thrombinverdau, wobei das rekombinant exprimierte Protein vom GST abgetrennt wurde. **B:** Schematische Darstellung der Expressionsprodukte 2/1 und 6/3. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

1	GGCACGAGGGAAGCAGCAGCTGAGACAGAGGAGAAGCAGCCAGAGGAGGATTTTCAGTGCATCGTT
1	G T R E A A A E T E E K Q P E E D F Q C I V „gelsolin-like“-Domäne 4 (GLD4)
68	TACTTCTGGCAGGGCCGGGAGGCCTCCAACATGGGCTGGCTTACCTTCACATTGAGTCTGCAGAAG
23	Y F W Q G R E A S N M G W L T F T F S L Q K „gelsolin-like“-Domäne 4 (GLD4)
135	AAGTTCGAGAGCCTTTTCCCTGGCAAGCTAGAGGTAGTACGCATGACACAACAACAGGAGAACCCT
45	K F E S L F P G K L E V V R M T Q Q Q E N P „gelsolin-like“-Domäne 4 (GLD4)
202	AAGTTTCTATCCCACTTCAAAGAAAGTTCATCATCCACCGGGGCAAGAGGAAAGGTGACCCAGACT
67	K F L S H F F R K F I I H R G K R K V T Q T „gelsolin-like“-Domäne 4 (GLD4)
269	CTCCAGCGGACCCCTATCAGATCCGGACTAATGGCAGTGCCTCTGCACCCGGTGCATTGAGATC
89	L Q P T L Y Q I R T N G S A L C T R C I Q I „gelsolin-like“-Domäne 5 (GLD5)
336	AACTGACTCCAGTCTTCTCAACTCTGAGTCTGCTTCATCCTCAAGGTCCCCTTTGAAAGCGAG
111	N T D S S L L N S E F C F I L K V P F E S E „gelsolin-like“-Domäne 5 (GLD5)
403	GACAACCAAGGCATCGTGTATGCCTGGGTAGGCCGGGCATCAGACCCGACGAAGCCAAGCTGGCA
133	D N Q G I V Y A W V G R A S D P D E A K L A „gelsolin-like“-Domäne 5 (GLD5)
470	GAGGACATCCTGAACACCATGTTTGACCCCTCCTACAGCAAACAGGGCATCAACGAAGGGGAGGAG
155	E D I L N T M F D P S Y S K Q G I N E G E E „gelsolin-like“-Domäne 5 (GLD5)
537	CCAGAGAACTTCTTCTGGGTAGGCATCGGTGCAAGCAAACCCATGATGATGACGCAGAGTACATG
177	P E N F F W V G I G A Q K P Y D D D A E Y M
604	AAGCACACAGATCTCTTCAGGGGCTCCAATGAGAAGGGCTACTTCGCGAGTACTGAGAAATGCTCT
199	K H T S L F R G S N E K G Y F A V T E K C S „gelsolin-like“-Domäne 6 (GLD6)
671	GACTTTTGCCAAGATGACCTGGCAGACGATGACATCATGCTGCTAGACAATGGCCAAGAAGTGTAC
221	D F C Q D D L A D D D I M L L D N G Q E V Y „gelsolin-like“-Domäne 6 (GLD6)
738	ATGTGGGTGGGACTCAGACAAGCCAAGTGGAGATCAAAC TGAGTCTGAAGGCTTGCCAGGTATAC
243	M W V G T Q T S Q V E I K L S L K A C Q V Y „gelsolin-like“-Domäne 6 (GLD6)
805	ATCCAGGACACACGCTCTAAAGAACATGAGCGGCCACGCCGCTGCGCCTGGTCCGCAAAGGTAAC
265	I D Q T R S K E H E R P R R L R L V R K G N „gelsolin-like“-Domäne 6 (GLD6)
872	GAACAACGTGCCTTCACCCGCTGCTTCCATGCCTGGAGCACGTTCCGTCAAGCCCAGCCTAAGGCA
287	E Q R A F T R C F H A W S T F R Q A Q P K Q „gelsolin-like“-Domäne 6 (GLD6)
949	GTACCTGACCCCAGATCCAGTGAGGAGGAAGAGGCCTCCTAGTACCTGCTTCATCTACTCACATCC
319	Y L
1016	TGCAAGCAGCACACAGCCAAAGCCCTACAGTGTGTCCACGTATGTGCAGAAGTAGTTTAAAAGAT
1083	ATTAAATGCTTTTATTTTCAATATTAATAATCAGTACTTTTAAATATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Abb. 50: Nukleinsäuresequenz von Klon 4.6.4 mit korrespondierender Aminosäuresequenz
Das cDNA-Insert von Klon 4.6.4 kodiert für den C-Terminus von Rn Flip, einem Proteinfragment von 320 Aminosäuren. Dies entspricht einem berechneten Molekulargewicht von 36119 Da. Das Expressionsprodukt umfaßt die „gelsolin-like“-Domänen 4, 5 und 6, und wurde zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Die Trombin-Schnittstellen sind gelb hinterlegt.

3.4.2.3.2 Spezifität des Anti-Flightless Antikörpers

Der affinitätsgereingte Anti-Flightless Antikörper wurde zunächst in Western Blot Analysen charakterisiert. Exprimiertes GST-Protein und die Flightless-Expressionsprodukte 2/1 und 6/3 wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit Antiseren gegen GST und Flightless inkubiert.

Die Anti-GST-Antikörper detektieren in der Western Blot Analyse exprimiertes GST wie erwartet als Proteinbande mit einem Molekulargewicht von 26 kDa (Abb. 51). Bei den Flightless-Expressionsprodukten 6/3 und 2/1 reagierten die Anti-GST-Antikörper mit einer höhermolekularen Proteinbande (6/3), und einer niedermolekularen Proteinbande (2/1). Dabei dürfte es sich um Flightless-Proteinfragmente mit GST oder ein GST-Fragmente handeln. Die Anti-Flightless-Antikörper reagieren in einer Western Blot Analyse nicht mit exprimiertem GST. Die Antikörper detektieren aber spezifisch die Flightless-Expressionsprodukte in den Proben 6/3 und 2/1.

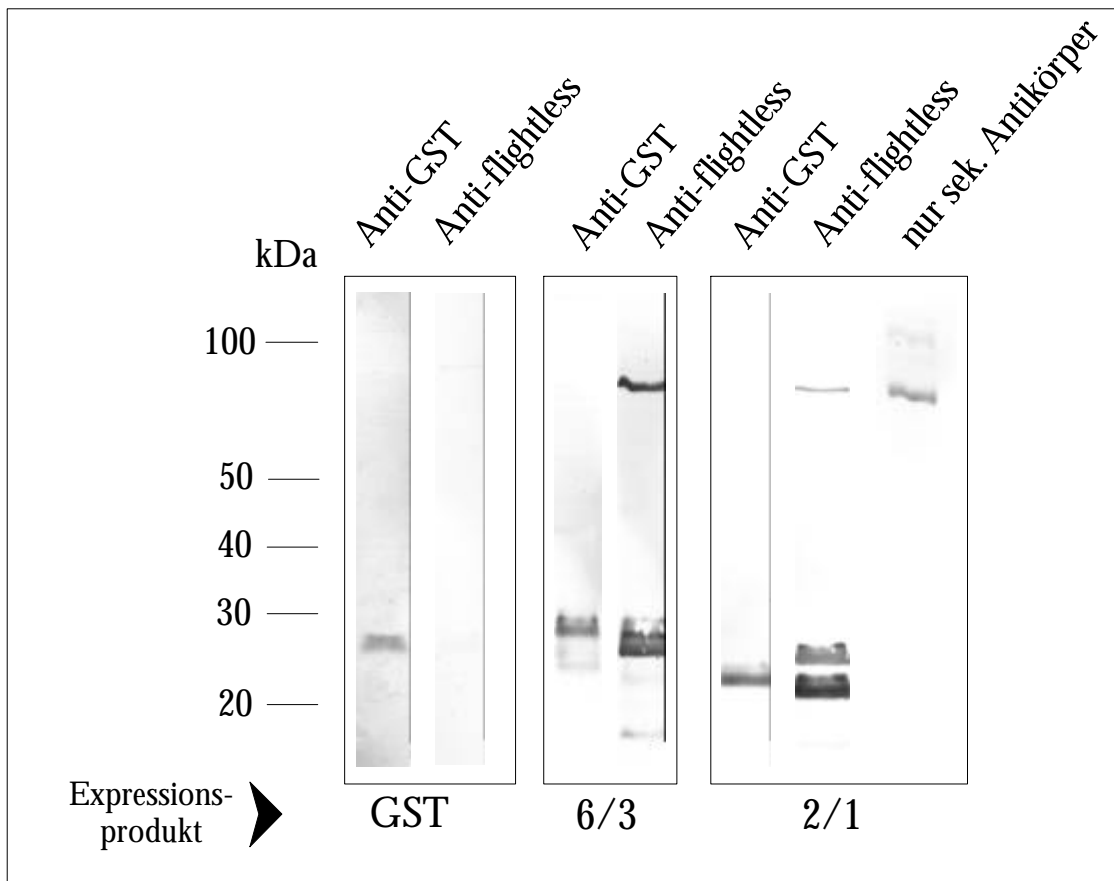


Abb. 51: Analyse der Spezifität der Anti-Flightless Antikörper

SDS-PAGE und Western Blot Analysen von exprimiertem GST, und der Expressionsprodukte 6/3 und 2/1 nach Thrombinverdau. Eine Spur von 2/1 wurde nur mit dem sekundären Anti-Kaninchen Antiserum inkubiert, wobei eine 70 kDa-Bande nachgewiesen wurde. Dieses Protein tritt bei Expressionen im GST-System auf, und wird bei Aufreinigung des Fusionsproteins ebenfalls isoliert. In der Western Blot Analyse erfolgte ein Nachweis dieses Proteins aufgrund einer unspezifischen Kreuzreaktion mit dem sekundären Anti-Kaninchen Antikörper. Es handelt sich vermutlich um das Produkt des *E. coli*-Gens *dnaK* (Sherman und Goldberg, 1992). kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

3.4.2.4 Western Blot Analyse: Expression von Flightless in sensorischen und nichtsensorischen Geweben

Zunächst wurde mit Hilfe des Immunoblots geprüft, ob Flightless in sensorischen und nichtsensorischen Geweben der Ratte exprimiert wird. Skelettmuskelgewebe wurde bei den Western Blot Analysen als Kontrollgewebe eingesetzt, da in diesem Gewebe das höchste RNA-Expressionsniveau von Flightless vorliegt (Campbell et al., 1997). Um Flightless in der Retina zu detektieren, wurden zunächst unterschiedliche Proteinmengen eines Hepes-Proteinextraktes von isolierten Rattenretinae in einem SDS-PAGE aufgetrennt, und eine Western Blot Analyse durchgeführt. Die affinitätsgereinigten Anti-Flightless-Antikörper detektieren bei einer Gesamtproteinmenge von 30 µg und 40 µg Flightless als Proteinbande bei ca. 200 kDa (Abb. 52).

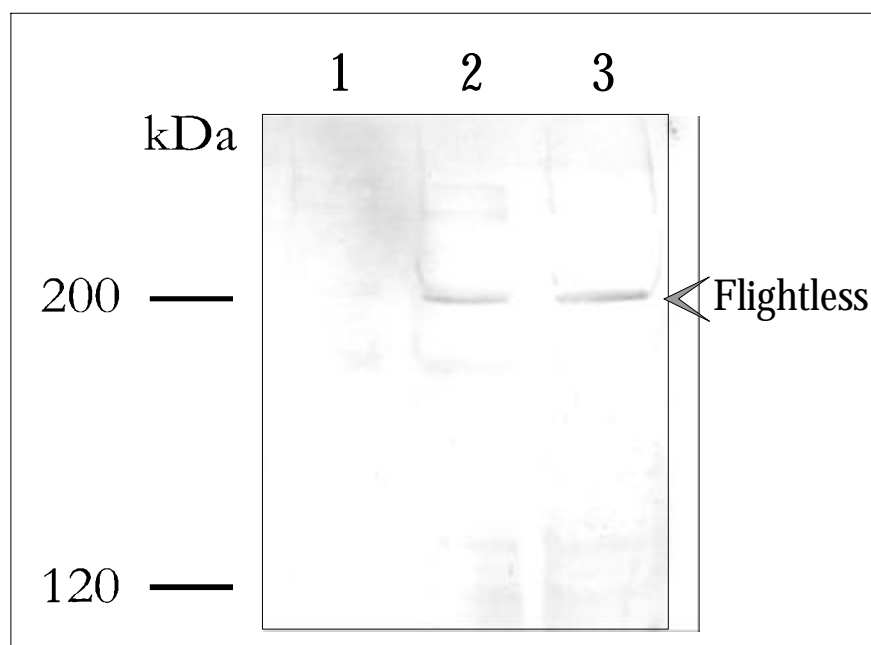


Abb. 52: Expression von Flightless in der Retina

Unterschiedliche Proteinmengen eines Hepes-Proteinextraktes von 10 Rattenretinae wurden in einem 8% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von Flightless erfolgte mit dem polyklonalen affinitätsgereinigten Antikörper gegen den C-Terminus von Flightless. Die Anti-Flightless Antikörper reagieren mit einer Proteinbande von ca. 200 kDa. **1:** 20 µg Gesamtprotein; **2:** 30 µg Gesamtprotein, **3:** 40 µg Gesamtprotein. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton

Da die 200 kDa-Proteinbande vom zuvor berechneten Molekulargewicht von 145 kDa abweicht, wurden Proteinextrakte vom Skelettmuskel, Gehirn, Testis und Retina der Ratte, sowie isolierten OS von Rinderretinae, in unterschiedlichen Proteinextraktionspuffern hergestellt. Diese Proben wurden vor Durchführung des SDS-PAGE erhitzt, oder kurz ultraschallbehandelt. In Hepes-Proteinextrakten vom Gehirn, der Testis und dem Skelettmuskel wurde Flightless ebenfalls als Proteinbande von ca. 200 kDa detektiert (Abb. 53). Bei SDS-PAGE und Western Blot Analysen von Hepes-Proteinextrakten mit 50 mM Tris/0,1%SDS, und Extrakten hergestellt mit RIPA- oder modifiziertem RIPA-Puffer reagierten die Anti-Flightless-Antikörper mit einer

Proteinbande von 145 kDa, und beim Skelettmuskel zusätzlich noch mit einer 200 kDa Proteinbande (Abb. 53).

Der Nachweis von Flightless dürfte vom Extraktionspuffer bedingt sein, mit welchem das Proteinextrakt hergestellt wurde. Bei Verwendung von nativen Puffern wie Hepes und PBS erfolgt der Nachweis einer 200 kDa-Proteinbande. Waren Tris und SDS, sowie geringe Mengen an reduzierendem DTT enthalten, so erfolgte die Detektion von Flightless beim berechneten Molekulargewicht von 145 kDa. Bei isolierten und angereicherten OS von Rinderphotorezeptorzellen hingegen erfolgte unabhängig vom Puffer immer der Nachweis einer Proteinbande bei 145 kDa (Abb. 53). Die Zugabe von geringen Konzentrationen von EDTA und EGTA verbesserten den Nachweis von Flightless, da diese Calcium in einem Komplex binden und calciumabhängige Proteasen in ihrer Aktivität hemmen. Durch Ultraschallbehandlung und kurzzeitiges Erhitzen hingegen dürfte eine Degradation von Flightless erfolgen, da das Protein in Western Blot Analysen nicht mehr nachweisbar war.

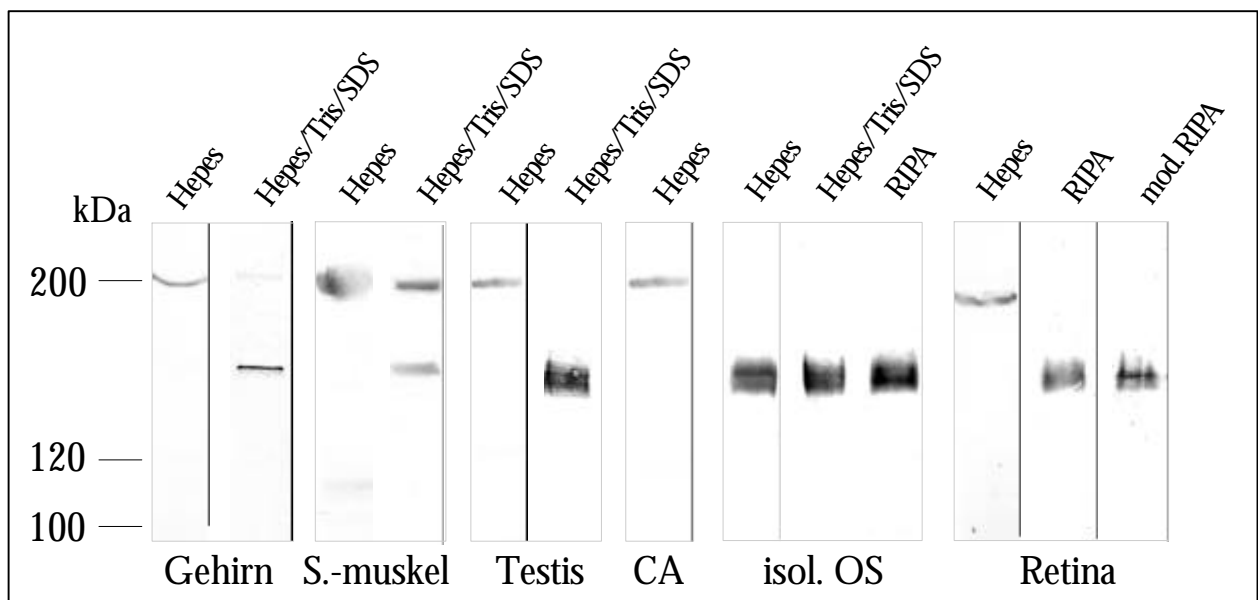


Abb. 53: Expression von Flightless in unterschiedlichen Geweben

Von Gehirn, Skelettmuskel, Testis, Retinae und isolierten Außensegmenten von Rinderphotorezeptorzellen (isol. OS) wurden Proteinextrakte mit 0,5 M Hepes und 0,5 M Hepes mit 50 mM Tris und 0,1% SDS hergestellt. Von isol. OS und Rattenretinae wurden zudem mit RIPA- und modifiziertem RIPA-Puffer Proteinextrakte hergestellt und analysiert. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

Anschließend wurden weitere ciliäre sensorische Gewebe in einer Western Blot Analyse auf eine Expression von Flightless getestet. Dabei konnte Flightless in Hepes-Proteinextrakten der Cochlea und des Riechepithels bei einem Molekulargewicht von ca. 200 kDa nachgewiesen werden (Abb. 54).

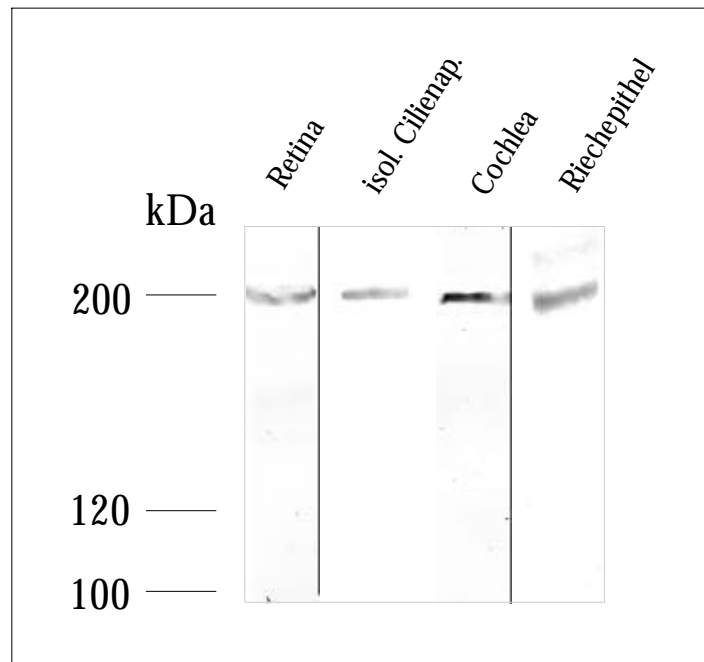


Abb. 54: Nachweis von Flightless in sensorischen Geweben

40 µg Protein von Hapes-Gewebeextrakten der Retina, Cochlea, des Riechepithels und 20 µg isolierte Cilienapparate wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt, und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die affinitätsgereinigten Anti-Flightless Antikörper detektierten in allen Proben eine Proteinbande von ca. 200 kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

Um zu prüfen, ob es sich bei der 200 kDa um Flightless mit einem fest gebundenen Liganden handelt, wurde in mehreren Ansätzen versucht, das Flightless-Protein aus dem Proteinlysate verschiedener Gewebe zu präzipitieren. Aber weder mit dem Anti-Flightless Antiserum, noch mit den affinitätsgereinigten Flightless-Antikörpern war eine Immunopräzipitation möglich. Daher wird es in Zukunft notwendig sein, ein weiteres Antiserum gegen einen antigenen Bereich von Flightless herzustellen, um Immunopräzipitationen durchzuführen. Dies sollte auch die Identifikation potentieller Interaktionspartner ermöglichen.

3.4.2.5 Lokalisation von Flightless im Gewebe durch immunhistochemische Methoden

In indirekten Immunofluoreszenzmarkierungen von Kryostatschnitten mit Anti-Flightless Antikörpern wurde die zelluläre Lokalisation von Flightless in der der Retina, und weiteren sensorischen Geweben ermittelt. Darüberhinaus wurde der Antikörper in immunoelektronenmikroskopischen Analysen eingesetzt, um die subzelluläre Lokalisation von Flightless in Photorezeptorzellen der Maus festzustellen. Zunächst wurde aber die Reaktivität der Anti-Flightless Antikörper an Kryostatschnitten von Skelettmuskelgewebe der Ratte getestet.

3.4.2.5.1 Immunologische Lokalisation von Flightless im Skelettmuskel

In Northern Blot und Western Blot Analysen wurde gezeigt, daß Flightless im Skelettmuskel der Ratte exprimiert wird. Bei indirekter Immunofluoreszenzmarkierung von Querschnitten durch Skelettmuskelfasern der Ratte mit Anti-Flightless Antikörpern sind zahlreiche „punktförmige“

Markierungen zu sehen (Abb. 55 A). Bei der Vergrößerung eines Ausschnitts wird deutlich, daß die „punktförmigen“ Markierungen kreisförmig angeordnet sind (Abb 55 D). Die Epitope, mit denen die Anti-Flightless Antikörper reagieren, dürften an der Peripherie der einzelnen Muskelfasern eines Muskelfaserbündels liegen (Abb. 55 C). Flightless ist im Skelettmuskel vermutlich mit der Membran der einzelnen Muskelfasern assoziiert.

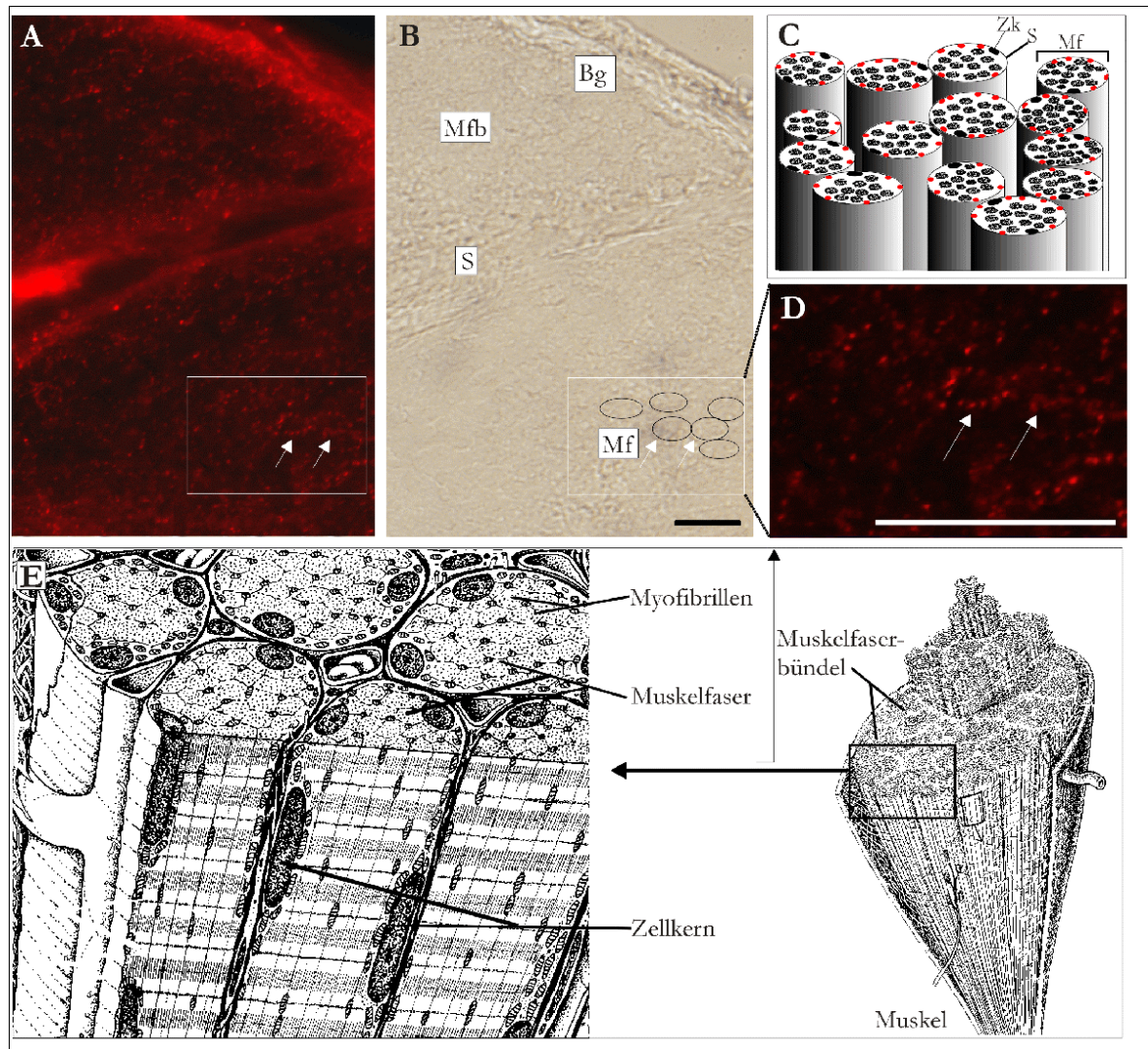


Abb. 55: Lokalisation von Flightless im Skelettmuskel

A: Bei indirekter Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti-Flightless Antikörpern erfolgt ein „punktförmige“ Lokalisation von Flightless in Querschnitten durch ein Muskelfaserbündel. **B:** Korrespondierendes Bild in differentiellem Interferenzkontrast. **C:** Schematische Darstellung der Muskelfaserbündel des Details (D). Die Flightless-Immunmarkierung ist in rot eingezeichnet **D:** Ausschnitt aus A, zu sehen sind die „punktförmigen“ Markierungen an der Peripherie einzelnen Muskelfasern eines Muskelfaserbündels. **E:** Schematische Darstellung des Aufbaus des Skelettmuskels. Maßstrich: A, B: 12 µm, D: 19 µm, Schemata in **E** aus Krstić, 1979).

3.4.2.6.2 Lokalisation von *Flightless* in sensorischen Geweben

Die durchgeführten Western Blot Analysen belegen, daß *Flightless* in der Retina, im Innenohr und im olfaktorischen Epithel exprimiert wird. Durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung soll nun die zelluläre Lokalisation von *Flightless* in Photorezeptorzellen geklärt werden. Darüberhinaus soll anhand von immuno-elektronenmikroskopischen Analysen die subzelluläre Lokalisation von *Flightless* im Verbindungscilium ermittelt werden. Durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierung wurde zudem geprüft, in welchen Zellen des Riechepithels und des Innenohrs *Flightless* exprimiert wird.

3.4.2.6.2.1 Immunologische Lokalisation von *Flightless* in der Retina

Longitudinale Kryostatschnitte durch das Auge einer Maus wurden mit Antikörpern gegen *Flightless* und Centrin doppelmarkiert (Abb. 56). Dadurch sollte geprüft werden, in welchen Zellen der neuronalen Retina *Flightless* exprimiert wird. Anhand der gleichzeitig durchgeführten Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Centrin war es möglich, spezifisch die Verbindungscilien und Basalkörper-Centriolen-Komplexe der Photorezeptorzellen zu visualisieren (Wolfrum, 1995). Dies ermöglichte eine zweifelsfreie Zuordnung der *Flightless*-Immunmarkierung zu den Verbindungscilien der Photorezeptorzellen.

Bei indirekter Immunfluoreszenzmarkierung von unfixierten Kryostatschnitten durch das Auge einer Maus reagieren die Antikörper gegen Centrin (mA Klon 20H5) in den Zellen der neuronalen Retina im Bereich zwischen den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen. Dabei ist eine „strichförmige“ und eine „punktförmige“ Markierung zu sehen (Abb. 56 b). Immuno-elektronenmikroskopische Analysen von Wolfrum (1995) haben gezeigt, daß es sich bei der „strichförmigen“ Markierung um das Verbindungscilium mit Basalkörper, und bei der „punktförmigen“ Markierung um die zugehörige Centriole handelt.

Bei indirekter Immunfluoreszenzmarkierung mit Anti-*Flightless* Antikörpern ist ebenfalls eine „punktförmige“ Markierung im Bereich zwischen den Innen- und Außensegmenten der Photorezeptorzellen zu sehen (Abb. 56 c und d). Bei einem Vergleich der *Flightless*-Immunmarkierung mit der Centrin-Markierung wird deutlich, daß eine teilweise Kolo-kalisation vorliegt. Die Anti-*Flightless* Antikörper reagieren auch spezifisch mit Epitopen im Bereich der Außensegmente der Photorezeptorzellen. Diese Immunfluoreszenzmarkierung erstreckt sich über den Bereich der Außensegmente der Photorezeptorzellen bis zum Pigmentepithel hin. Im Bereich des Pigmentepithels liegt keine *Flightless*-Markierung vor. Die Zellen der proximalen Retina wie Bipolarzellen, Horizontalzellen und Ganglienzellen wurden mit den Anti-*Flightless* Antikörpern ebenfalls nicht immunmarkiert.

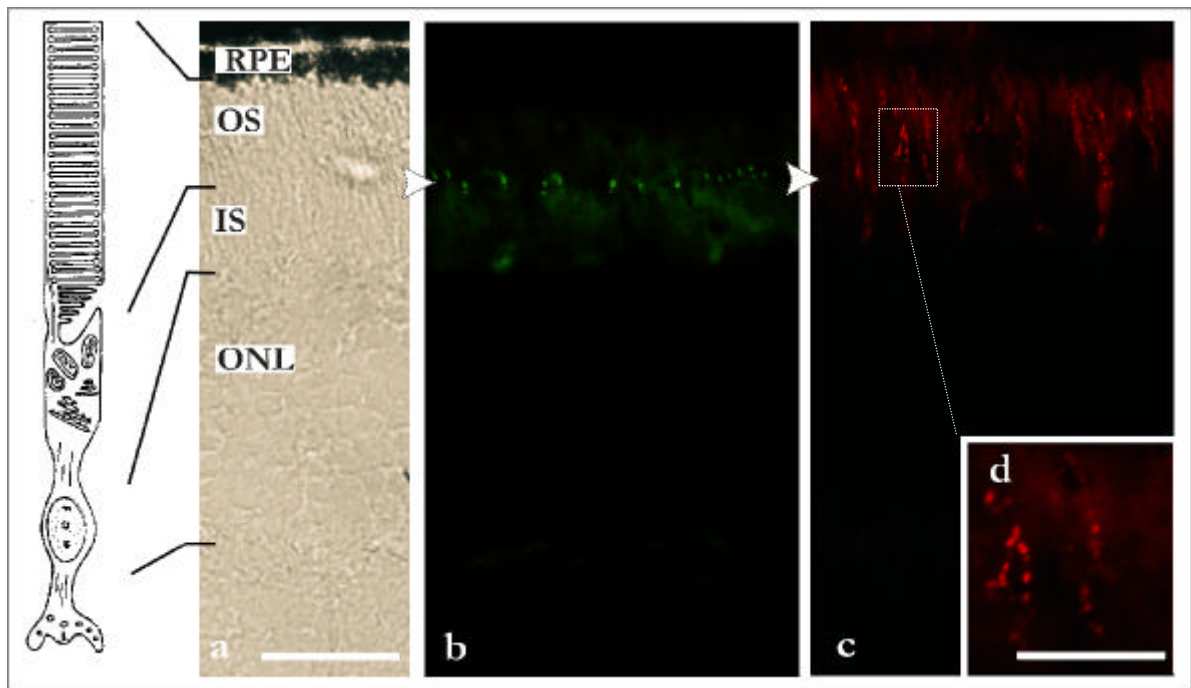


Abb. 56: Immunolokalisation von Flightless und Centrin in der Retina der Maus

Doppelmarkierung eines Kryostatschnitts durch das Auge einer Maus. **a:** Differentieller Interferenzkontrast. **b:** Indirekte Anti-Centrin Immunofluoreszenzmarkierung **c:** Immunofluoreszenzmarkierung von Flightless in der Retina. Anti-Centrin Antikörper (Klon 20H5) reagieren mit Verbindungscilien und dem Basalkörper-Centriolen-Komplex. Flightless-Antikörper detektieren das Protein im Verbindungscilium und den Außensegmenten der Photorezeptorzellen. **d:** Detail von c (weiße Umrahmung). RPE: Pigmentepithelschicht, OS: Außensegmente der Photorezeptorzellen, IS: Innensegmente der Photorezeptorzellen, ONL: äußere nukleäre Schicht Maßstrich a, b und c: 20 μm , d: 9 μm

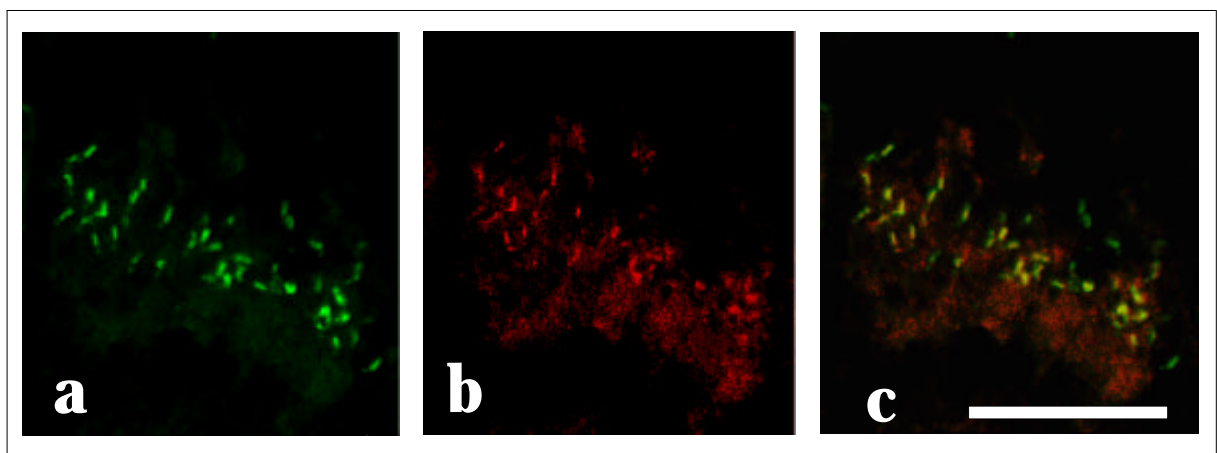


Abb. 57: Kolokalisation von Flightless und Centrin im Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplex von Photorezeptorzellen

Konfokale Analyse der Doppelmarkierung eines longitudinalen Kryostatschnitts einer Rattenretina. Die Antikörper gegen Centrin und Flightless reagieren spezifisch mit dem Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplex des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle. **a:** Immunmarkierung des Verbindungsciliums mit Basalkörper und der Centriole der Photorezeptorzellen mit dem monoklonalen Anti-Centrin Antikörper 20H5. **b:** Immunmarkierung mit den affinitätsgereinigten Anti-Flightless Antikörpern. **c:** Übereinanderlagerung der Markierungen von **a** (Centrin) und **b** (Flightless), dies resultiert in einer orange-gelben Immunmarkierung der Verbindungscilien und des Basalkörper-Centriolen-Komplexes. Centrin und Flightless sind im Cilienapparat kolokalisiert. Maßstrich: 14 μm .

Um zu prüfen, ob im Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplex tatsächlich eine Kolokalisation von Flightless und Centrin vorliegt, wurden longitudinale Kryostatschnitte durch eine unfixierte Rattenretina mit Antikörpern gegen Flightless und Centrin doppelmarkiert. Die Analyse der Präparate erfolgte mit dem Laserscanningmikroskop Leica TCSNT (Abb. 57). Centrin wurde wie erwartet im Verbindungscilium, Basalkörper und der Centriole nachgewiesen. Die indirekte Immunofluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen Flightless erfolgte analog zur Centrin-Markierung. Bei einer Übereinanderlagerung der beiden Markierungen wird deutlich, daß in der Retina in der Tat eine Kolokalisation von Flightless und Centrin im Verbindungscilium und Basalkörper vorliegt (Abb. 57 c).

Durch indirekte Immunofluoreszenzmarkierung wurde Flightless im Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplex des Cilienapparates von Photorezeptorzellen in Kolokalisation mit Centrin nachgewiesen. Die eindeutige Zuordnung war aufgrund der Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen Flightless und Centrin möglich. Durch Immuno-elektronenmikroskopie soll nun geprüft werden, in welcher subzellulären Domäne des Verbindungsciliums Flightless spezifisch angereichert ist. Darüberhinaus soll ermittelt werden, ob Flightless tatsächlich im Außensegment der Photorezeptorzellen lokalisiert ist, und mit welchen Strukturen des Außensegments Flightless assoziiert ist.

Hierzu wurden Ultradünnschnitte einer Mäuseretina angefertigt, und mit Anti-Flightless Antikörpern inkubiert. Auf Längsschnitten durch die Retina einer Maus reagieren die affinitätsgereinigten Antikörper gegen Flightless mit Epitopen im Verbindungscilium und Außensegment der Photorezeptorzellen (Abb. 58). Im Verbindungscilium ist Flightless zwischen der Plasmamembran und den Mikrotubuli-Paarringen lokalisiert (Abb. 58 a und c). Darüberhinaus sind im Außensegment die Disk-Membranen der Photorezeptorzelle mit silberverstärktem Nangold dekoriert (Abb. 58 a und b). Das Innensegment der Photorezeptorzellen wurde nicht über Hintergrundniveau markiert. Die immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation von Flightless bestätigt somit den Befund aus der Immunohistochemie. Eine Quantifizierung der immuno-elektronenmikroskopischen Flightless-Markierung an Querschnitten von Verbindungscilien zeigt Abbildung 59. Flightless ist hochsignifikant in der subzellulären Domäne zwischen der Außenfläche der Mikrotubuli-Paarringe und der Cilienmembran lokalisiert.

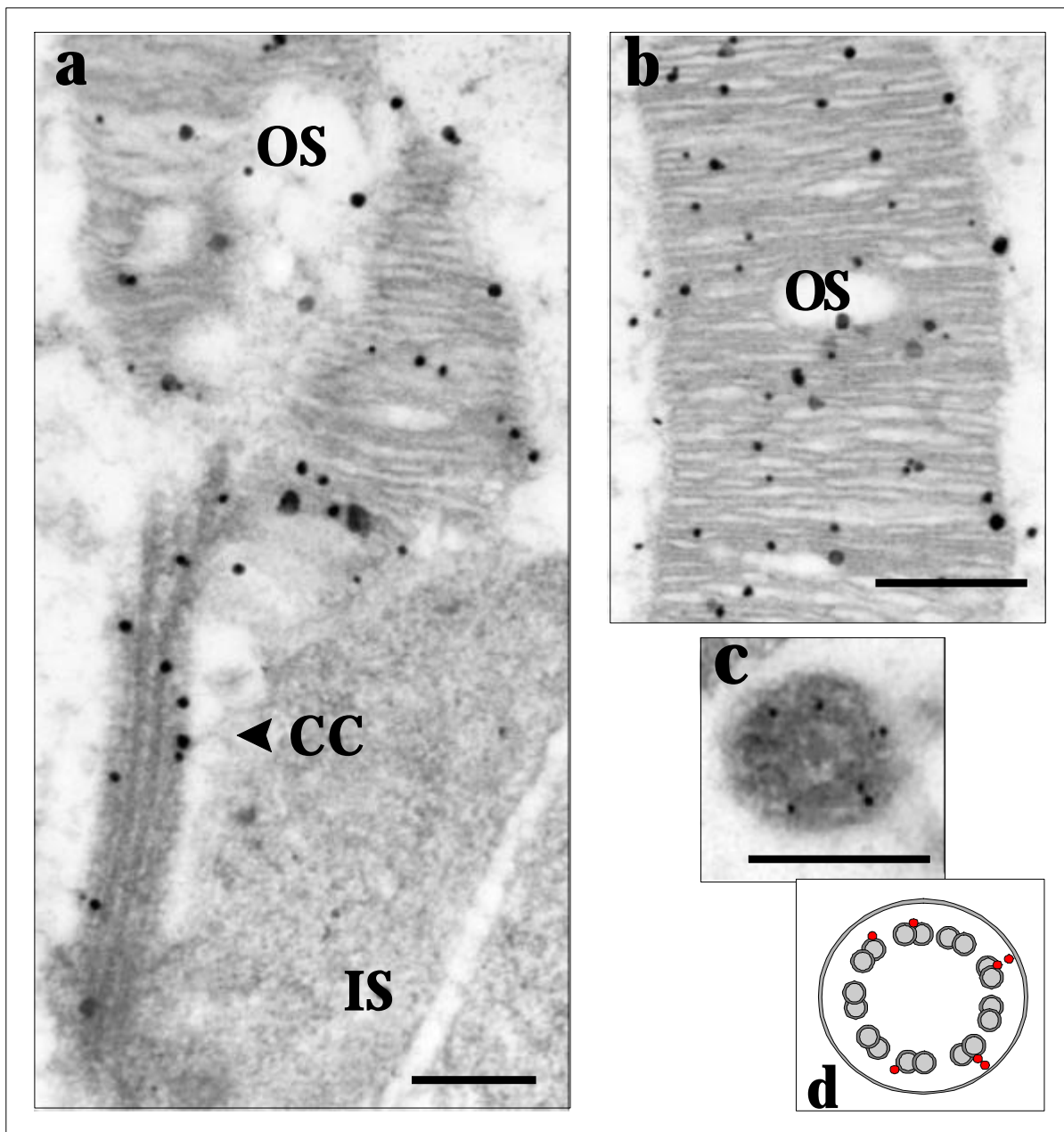


Abb. 58: Immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation von Flightless in einer Stäbchen-Photorezeptorzelle

a. Längsschnitt durch eine Stäbchen-Photorezeptorzelle einer Maus, immunmarkiert mit dem polyklonalen Antiserum gegen Flightless. Die Anti-Flightless Antikörper reagieren mit Epitopen im Verbindungscilium (CC) und Außensegment der Photorezeptorzelle (OS). Das Innensegment (IS) wird nicht über Hintergrundniveau markiert. **b.** Ausschnittsvergrößerung des Außensegments einer Photorezeptorzelle. Die silberverstärkten Nanogoldpartikel dekorieren die Disk-Membranen. **c:** Querschnitt durch das Verbindungscilium einer Photorezeptorzelle. **d:** Schematische Darstellung eines Querschnitts durch ein Verbindungscilium. Die roten Punkte markieren schematisch die Lokalisation von Flightless im Verbindungscilium. Im Verbindungscilium reagieren die Anti-Flightless Antikörper mit Epitopen in der subciliären Domäne zwischen den axonemalen Mikrotubuli-Paarringen und der Plasmamembran. Maßstrich a: 200 nm, b: 500 nm, c: 150 nm.

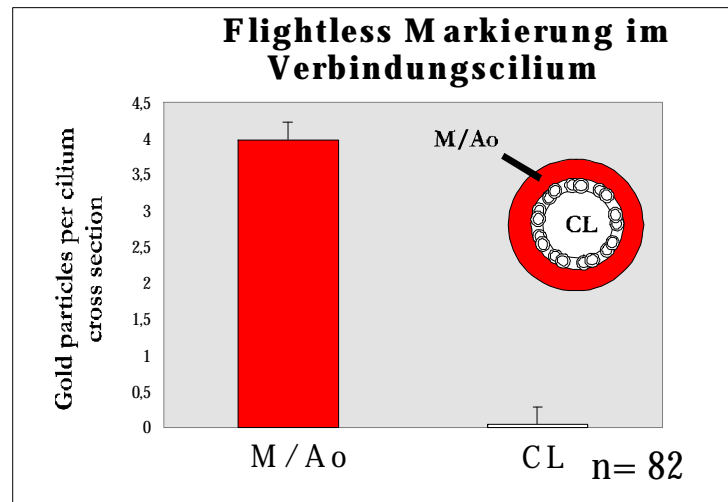


Abb. 59: Histogramm der Anzahl von silberverstärkten Nanogoldpartikeln in den unterschiedlichen subciliären Domänen von Querschnitten durch das Verbindungscilium von Photorezeptorzellen einer Maus nach immuno-elektronenmikroskopischer Markierung mit Antikörpern gegen Flightless.

Der Cilienquerschnitt wurde in folgende Domänen unterteilt: **M/Ao**: Cilienmembran mit Außenseite des Axonems, **CL**: Cilienlumen, **Ao**: Außenseite des Axonems, **M**: membranständig. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

Bei einem Querschnitt durch den apikalen Bereich des Innensegments einer Photorezeptorzelle wurden der Basalkörper und die Centriole des Basalkörper-Centriolen-Komplexes angeschnitten (Abb. 60). Infolge des leicht schrägen Anschnitts liegen mehr Epitope frei, mit welchen die Anti-Flightless Antikörper reagieren können. Die längs angeschnittene Centriole ist an einem Ende intensiver mit silberverstärkten Nanogoldpartikeln dekoriert (Abb. 60 a). Sind die Centriole und der Basalkörper beide quer angeschnitten, so erfolgt auch hier vorwiegend die Markierung von nur einer Centriole (Abb. 60 b).

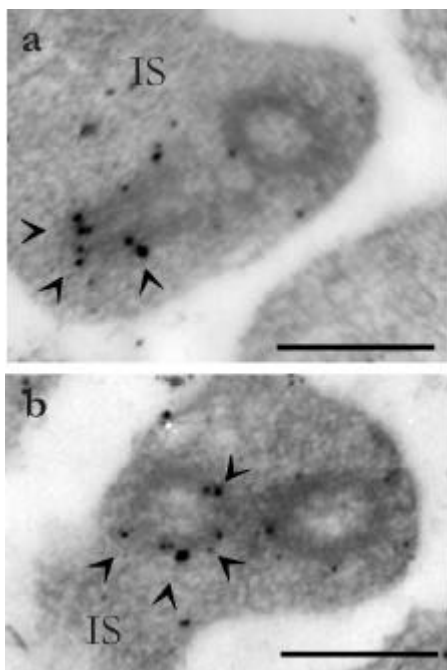


Abb. 60: Immuno-elektronenmikroskopische Lokalisation von Flightless im apikalen Bereich des Innensegments einer Photorezeptorzelle der Maus

a: Immunmarkierung eines Querschnitts durch den apikalen Bereich des Innensegments einer Photorezeptorzelle einer 21 Tage alten Maus. Die längs angeschnittene Centriole ist im proximalen Bereich markiert (schwarze offene Pfeilspitzen). **b:** Sind beide Centriolen quer angeschnitten, so konzentriert sich die Anti-Flightless Markierung vorwiegend auf eine der beiden Centriolen. Maßstrich: 300 μm .

Die Immunogold-Markierungen haben zudem gezeigt, daß Flightless auch in Zapfen-Photorezeptorzellen im Verbindungscilium, in der subciliären Domäne zwischen der Plasmamembran und axonemalen den Mikrotubuli, und an den Membranen des Außensegment lokalisiert ist.

Da Flightless ein Aktin-Bindungsprotein ist, wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aktin (mAb Klon C4) geprüft, ob Aktin im Verbindungscilium mit Flightless kolokalisiert ist. Neben der bereits bekannten Konzentration von Aktinfilamenten distal im Cilium war es möglich, mit Hilfe von ultrafeinen, mit kolloidalem Gold-gekoppelten sekundären Antikörpern (Nanogold™) in Kombination mit einer Silberverstärkung nach Danscher (1981), eine Reaktion der Antikörper gegen Aktin im gesamten Verbindungscilium darzustellen (Abb. 61 a, Chaitin et al., 1984; Chaitin und Bok, 1986; Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989). Der Cilienquerschnitt zeigt, daß Aktin ebenfalls im subciliären Bereich zwischen den Mikrotubuli-Paarungen und der Plasmamembran lokalisiert ist (Abb. 61 b). Eine Quantifizierung der Aktinmarkierung an Querschnitten ergab, daß Aktin signifikant im subciliären Bereich zwischen der Cilienmembran und den axonemalen Mikrotubuli lokalisiert ist (Abb. 62; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000).

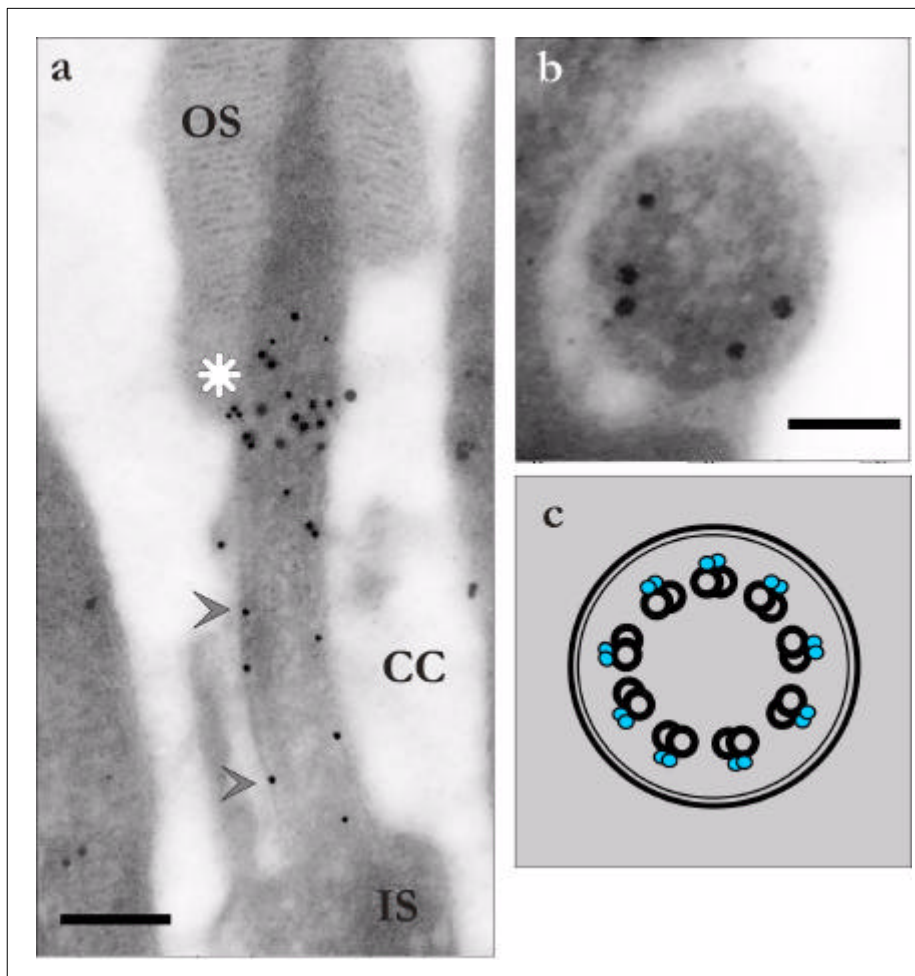


Abb. 61: Immunoelektronenoptische Lokalisation von Aktin im Verbindungscilium einer Photorezeptorzelle
a: Silberverstärkte Nanogold™-Markierung eines Longitudinalschnittes mit monoklonalen Antikörpern gegen Aktin (Klon C4). **b:** Anti-Aktin Markierung in einem Querschnitt durch das Verbindungscilium. Im Cilium erfolgt der Nachweis von Aktin nicht nur an der Basis des Außensegments (OS, weißer Stern), sondern auch entlang des gesamten Ciliums (offene graue Pfeilspitzen). **c:** schematische Darstellung der Aktin-Lokalisation (blau) im Verbindungscilium. IS: Innensegment; OS: Außensegment. Maßstrich: a: 280 nm, b: 105 nm.

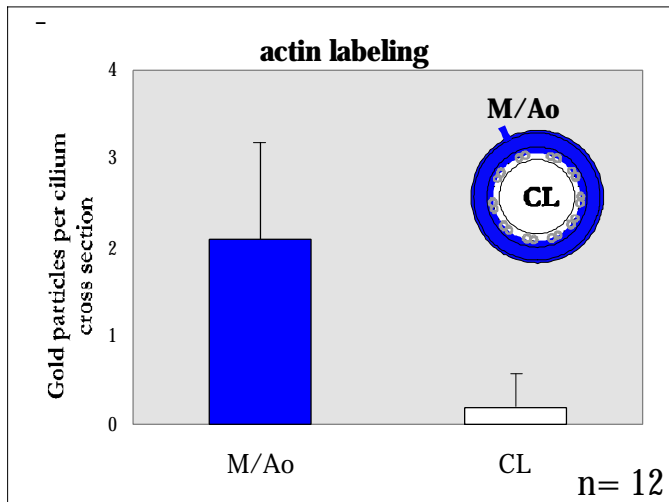


Abb. 62: Histogramm der Anzahl silberverstärkter Goldpartikel nach immuno-elektronenmikroskopischer Markierung mit Antikörpern gegen Aktin in verschiedenen Domänen des Verbindungsciliums. Der Cilienquerschnitt wurde in folgende Domänen unterteilt: **M/Ao**: Cilienmembran mit Außenseite des Axonems, **CL**: Cilienlumen, **Ao**: Außenseite des Axonems. (n= 12). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

3.4.2.6.2.2 Lokalisation von Flightless im Riechepithel und Innenohr

Das Riechepithel der Ratte liegt im hinteren Nasenraum auf einem Knorpelgewebe auf, und ist aus folgenden Zelltypen aufgebaut: Basalzellen, Stützzellen und Rezeptorzellen (Abb. 63; Menco, 1984). Im vorderen Bereich des Nasenraumes liegt auf dem Knorpelgewebe ein einschichtiges Flimmerepithel, dessen Epithelzellen apikal zahlreiche motile Cilien tragen.

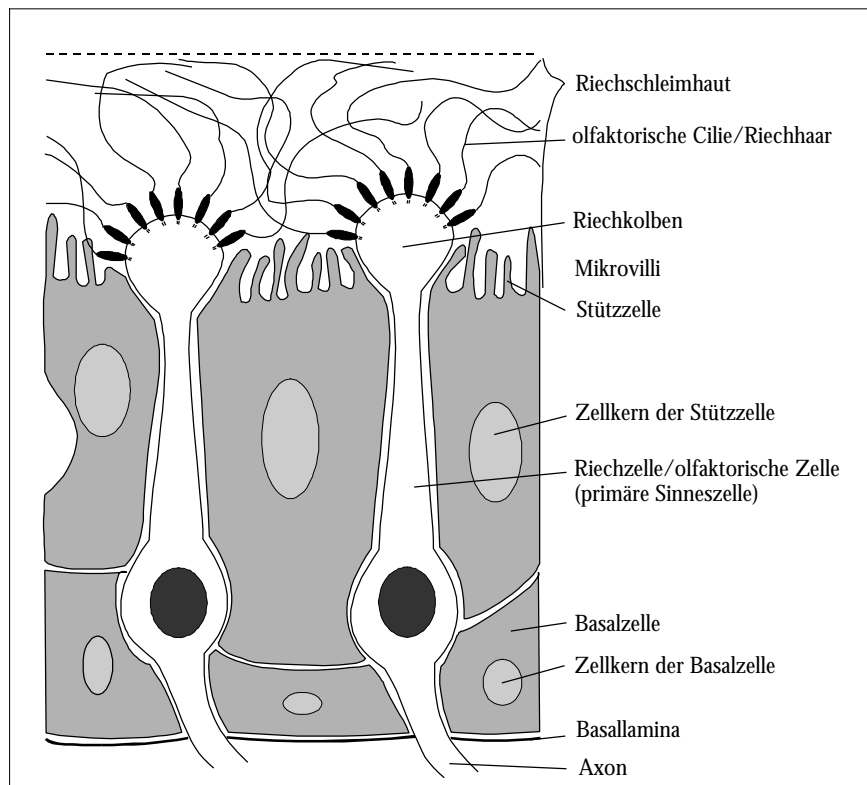


Abb. 63: Schematische Darstellung des Aufbaus des Riechepithels (verändert nach Kolb, 1991)

Longitudinale Kryostatschnitte durch das Riechepithel und Flimmerepithel der Ratte wurden mit Antikörpern gegen Centrin und Flightless doppelmarkiert. Beide Proteine sind ausschließlich in apikalen Bereichen der Epithelien präsent. Die Basalzellen und die Zellkörper der Stütz- und Rezeptorzellen, sowie basolaterale Membranareale des olfaktorischen Epithels weisen keinerlei Markierungen auf. Auch im Flimmerepithel sind in proximalen Zellschichten keine Markierungen erkennbar. Im apikalen Bereich des olfaktorischen Epithels hingegen sind mit Anti-Centrin und Anti-Flightless-Antikörpern „punktförmige“ Markierungen im Bereich der Basis der olfaktorischen Cilien zu sehen (Abb. 64 a und b). Ein Vergleich der Immunofluoreszenzmarkierungen beider Proteine und eine Übereinanderlagerung dieser in einem Bild deutet darauf hin, daß Centrin und Flightless in diesem Gewebe kolokalisiert sind (Abb. 64 c). Centrin wurde durch immuno-elektronenmikroskopische Analysen in den olfaktorischen Rezeptorzellen an der Basis der olfaktorischen Cilien, im Basalkörper und der Übergangszone lokalisiert. Vermutlich ist Flightless mit Centrin in dieser Subdomäne kolokalisiert (Wolfrum und Schmitt, in Vorbereitung).

Im Flimmerepithel sind bei Doppelmarkierung mit Anti-Centrin und Anti-Flightless Antikörpern ebenfalls „punktförmige“ Markierungen im apikalen Bereich zu sehen (Abb. 65 a und b). Eine Übereinanderlagerung beider Markierungen in einem Ausschnitt zeigt auch hier eine Kolokalisation von Centrin und Flightless. Durch Immuno-elektronenmikroskopie wurde Centrin im Flimmerepithel ebenfalls im Basalkörper und der Übergangszone der motilen Cilien lokalisiert, vermutlich ist Flightless ebenfalls in dieser Subdomäne anzutreffen (Abb. 65, c) (Wolfrum und Schmitt, in Vorbereitung).

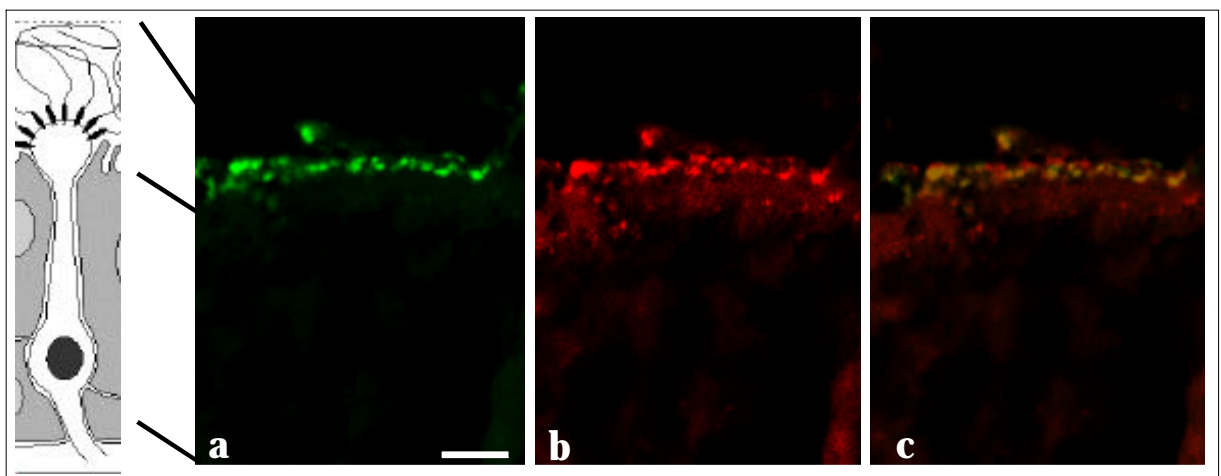


Abb. 64: Indirekte Immunofluoreszenz-Markierung von Centrin und Flightless im olfaktorischen Epithel der Ratte

Immunofluoreszenzmarkierung von Flightless und Centrin im olfaktorischen Epithel. **a:** Anti-Centrin Immunofluoreszenz (Klon 20H5). **b:** Anti-Flightless Immunofluoreszenzmarkierung. **c:** Übereinanderlagerung der beiden Markierungen in einem Bild. Flightless und Centrin sind in den olfaktorischen Vesikeln an der apikalen Oberfläche des Epithels kolokalisiert. Maßstrich: 10 µm.

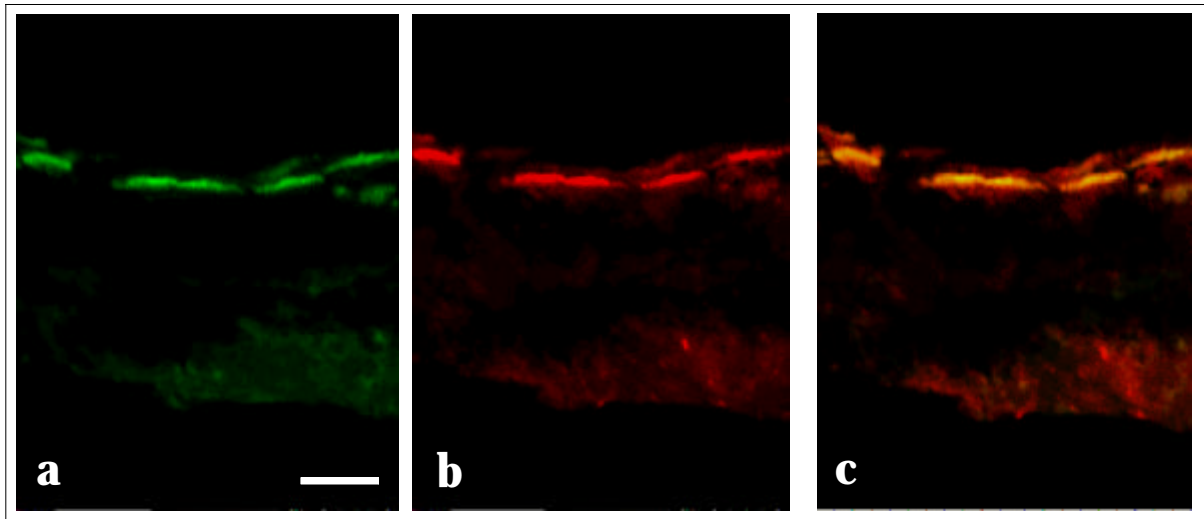


Abb. 65: Indirekte Immunofluoreszenzmarkierung von Centrin und Flightless im Flimmerepithel der Nase

a: Anti-Centrin Immunofluoreszenz (Klon 20H5). **b:** Anti-Flightless Immunofluoreszenz. **c:** Übereinanderlagerung der beiden Immunofluoreszenzmarkierungen. Anti-Flightless und Anti-Centrin Antikörper reagieren mit Epitopen im apikalen Bereich des Flimmerepithels. Maßstrich 10 μm .

Querschnitte durch die Cochlea einer Maus wurden ebenfalls mit Anti-Centrin und Anti-Flightless Antikörpern doppelmarkiert. Antikörper gegen Centrin (mA Klon 20H5) reagieren im Cortischen Organ der Säugercochlea mit den inneren und äußeren Haarzellen unterschiedlich (Schmitt und Wolfrum, in Vorbereitung). Während Anti-Centrin Antikörper im Cortischen Organ adulter Mäuse in den inneren Haarzellen nicht binden, werden in den äußeren Haarzellen die Kutikularplatte und cytoplasmatische Bereiche oberhalb und unterhalb des Zellkernes markiert (Abb. 66 a). Auch Flightless ist in den äußeren Haarzellen im Zellkörper und der Kutikularplatte lokalisiert (Abb. 66 b). Eine Übereinanderlagerung der Anti-Centrin und Anti-Flightless Markierungen zeigt eine partielle Kolo-kalisation dieser Proteine in der Kutikularplatte und im Zellkörper der äußeren Haarzelle (Abb. 66 c).

Durch Anwendung von immunohistochemischen und immuno-elektronenmikroskopischen Methoden konnte gezeigt werden, daß Flightless am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen beteiligt ist. Die Quantifizierung der immuno-elektronenmikroskopischen Markierungen von Cilienquerschnitten mit Anti-Flightless Antikörpern ergab, daß Flightless spezifisch in der subzellulären Domäne zwischen der Plasmamembran und den axonemalen Mikrotubuli des Verbindungsciliums angereichert ist. Immunmarkierungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen Aktin belegen zudem, daß in dieser Subdomäne eine Kolo-kalisation von Aktin und Flightless vorliegt. Darüberhinaus konnte die Lokalisation von Flightless im Außensegment der Photorezeptorzelle bestätigt werden. Flightless dürfte mit den Disk-Membranen assoziiert vorliegen. Durch indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen wurde Flightless auch in den sensorischen Zellen des Riechepithels und den äußeren Haarzellen der Cochlea nachgewiesen.

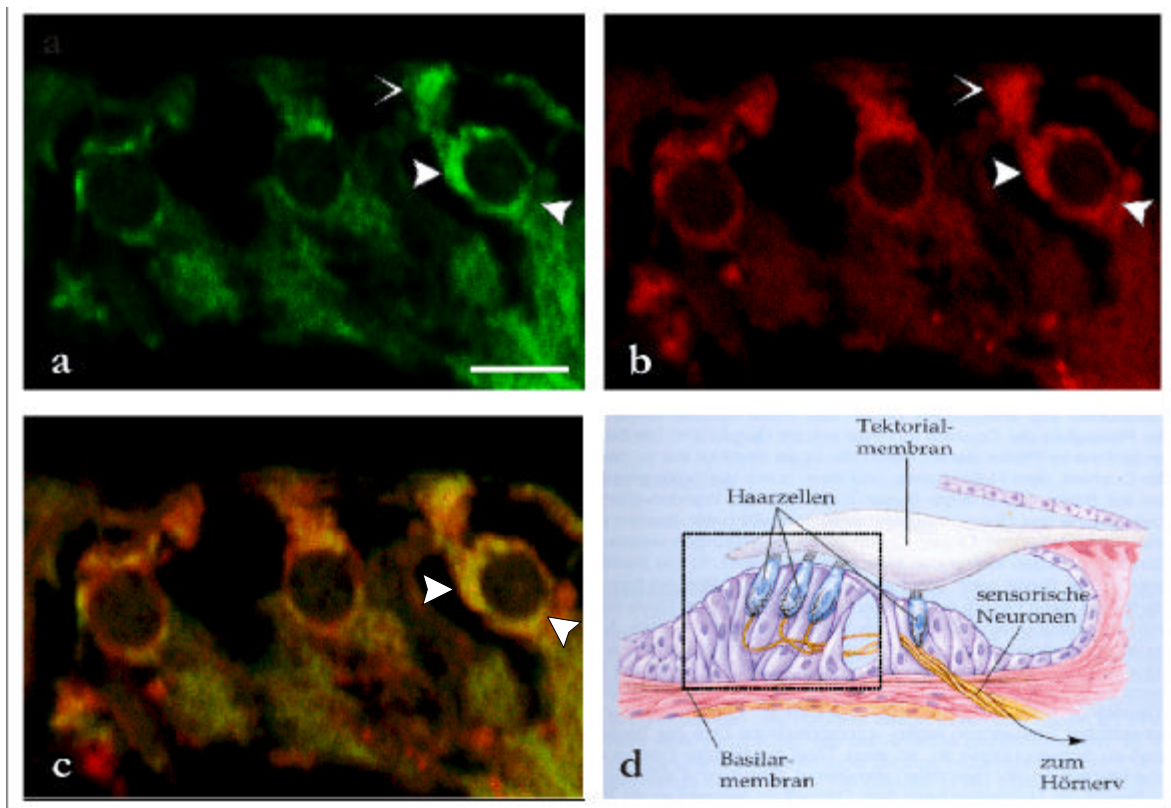


Abb. 66: Immunolokalisation von Centrin und Flightless in den Haarzellen der Cochlea

Immunmarkierung von Centrin und Flightless im Innenohr der Maus. **a:** Das Protein Centrin ist in den äußeren Haarzellen oberhalb und unterhalb des Zellkerns (weiße Pfeilspitze), sowie in der Kutikularplatte angereichert (offene weiße Pfeilspitze). Die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung erfolgte mit dem Anti-Centrin Antikörper 20H5. **b:** Nachweis von Flightless in den äußeren Haarzellen der Cochlea. **c:** Übereinanderlagerung der Centrin- und Flightless Immunmarkierung. Maßstrich 14 μm . **d:** Aufbau des sensorischen Epithels des Innenohrs (aus Campbell, 1997a). Die äußeren Haarzellen sind umrahmt, diese wurden mit dem Anti-Flightless Antiserum immunmarkiert.

3.4.2.7 Liegt Flightless Membran-assoziiert vor?

Die Zusammensetzung von Membranen kann durch biochemische Methoden analysiert werden. Strukturell bestehen Membranen aus Lipiden, Proteinen und Kohlenhydraten. Membranproteine können basierend auf den Bedingungen, mit denen sie isoliert werden, in drei Klassen eingeteilt werden (Graham und Higgins, 1998). **(1)** Peripher gebundene Proteine können durch Veränderung des pH-Wertes, oder der Ionenstärke entfernt werden. **(2)** Integrale Proteine sind in die Membran eingebettet, und können nur durch Detergenzbehandlung isoliert werden. **(3)** Eine weitere Klasse sind Proteine, die über ein Lipid in der Membran verankert sind. Dabei werden Fettsäurereste an das Protein gebunden, z. B. Myristinsäure durch eine Amidbindung an einen N-terminalen Glycinrest (N-Myristoylierung). Solche Proteine können nur isoliert werden, wenn die Lipidverankerung des Proteins enzymatisch durchtrennt wird.

Die Analyse der Aminosäuresequenz von Maus Flightless ergab mehrere Hinweise auf eine Membran-Assoziation: **(1)** LRR-Repeats können infolge ihres hydrophoben Charakters direkt mit Membranen interagieren (Kobe und Deisenhofer, 1993; 1994; 1995a; 1995b; Buchanan und Gay, 1996). Der mittlere Hydropathie-Index (GRAVY) von Mm Flip weist ebenfalls auf eine Membran-Assoziation hin. **(2)** Zudem ist ein hydrophober Aminosäureabschnitt zwischen dem Segment 1 und 2 vorhanden, der in die Lipiddoppelschicht eingebettet sein könnte. **(3)** Darüberhinaus ist eine Membran-Assoziation über einen Lipidanker durch N-terminale Myristoylierung nicht auszuschließen. Immuno-elektronenmikroskopische Analysen haben schon gezeigt, daß Maus Flightless mit den Disk-Membranen der Außensegmente der Photorezeptorzellen assoziiert vorliegt.

Zunächst wurden die Außensegmente der Photorezeptorzellen isoliert, und in einem Tris-HCl-Puffer mit geringer Ionenstärke gewaschen. Dadurch brachen die Plasmamembranen der Außensegmente auf, und die löslichen Proteine wurden abgetrennt. Die isolierten Außensegment-Membranen wurden anschließend mit verschiedenen Puffern mit steigender Ionenstärke extrahiert. Dabei wurden zuerst locker an die Membran gebundene, und periphere Proteine abgetrennt. Am Schluß lagen nur noch Transmembranproteine und fest mit den Membranen verbundene Proteine in der Probe vor. Jeweils 20 µg Protein der Pellets und Überstände der Proben wurden in einem SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Anschließend wurden in Western Blot Analysen folgende Proteine nachgewiesen: Stäbchen-Opisin, α -Tubulin, Aktin und Flightless. In Western Blot Analysen der im Licht und Dunkeln präparierten und extrahierten Proben konnten keine Unterschiede festgestellt werden.

Präparationen isolierter Außensegmente von Photorezeptorzellen (OS) enthalten Disk-Membranen und deren integrale Membranproteine, sowie peripher gebundene Proteine, Plasmamembranen und lösliche Proteine. In dieser Probe konnten alle untersuchten Proteine nachgewiesen werden (Abb. 67). Beim Nachweis von Opisin wurden neben einer Proteinbande von ca. 38 kDa noch höhermolekulare Banden detektiert. Es handelt sich um Opisin-Dimere und Opisin-Multimere. Aktin konnte als Proteinbande von ca. 42 kDa, und α -Tubulin bei ca. 55 kDa detektiert werden. Flightless wurde in den isolierten und angereicherten Außensegmenten bei dem berechneten Molekulargewicht von ca. 145 kDa detektiert.

In den nachfolgenden Proben (Tris-Wasch) ist Opisin in Sedimenten und in geringer Menge auch in den Überständen enthalten. Aktin und Tubulin wurden gleichfalls in Pellets und Überständen detektiert. Flightless hingegen wurde nur in den Sedimenten mit den pelletierten Membranen bei einem Molekulargewicht von 145 kDa detektiert.

In den Proben der Hochsalzextraktion wurde Opisin als integrales Membranprotein wie erwartet nur in den Sedimenten nachgewiesen (Abb. 67). Flightless wurde ebenfalls nur in den

Pellets bei einem Molekulargewicht von 145 kDa detektiert. Die Cytoskelettproteine α -Tubulin und Aktin wurden in den Sedimenten und Überständen nachgewiesen.

Flightless wurde in den Proben der Hochsalzextraktion mit den Anti-Flightless Antikörpern nur in den Sedimenten detektiert. Dies weist darauf hin, daß Flightless ein membran-assoziiertes Protein ist. Die Interaktion mit Membranen erfolgt vermutlich entweder über einen Lipidanker (N-Myristoylierung), oder über den hydrophoben Aminosäureabschnitt in der Linkerregion zwischen den Segmenten 1 und 2 .

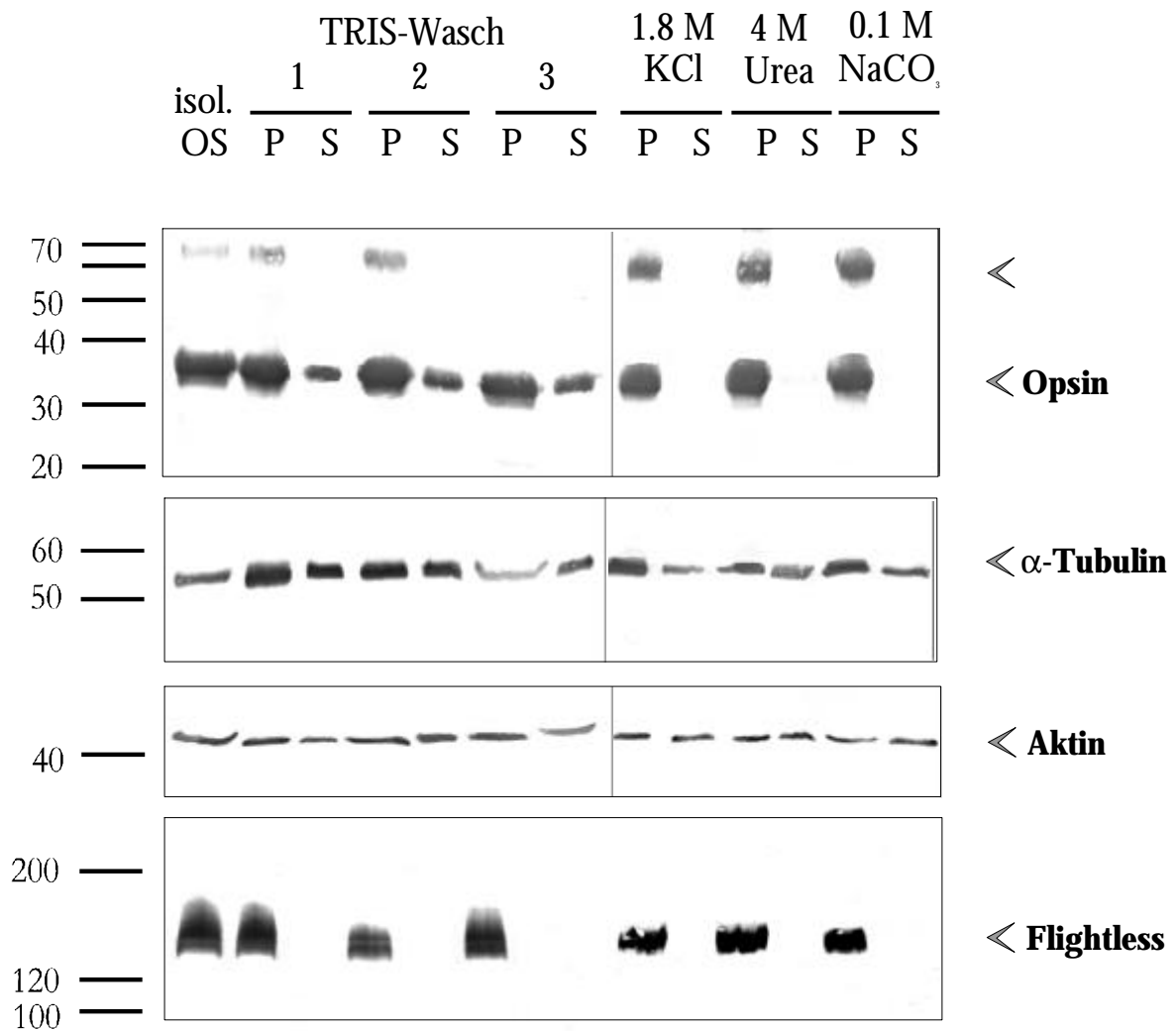


Abb. 67: Western Blot Analyse der Proben der Membranpräparation

Bei der Opsin-Western Blot Analyse wurden 2 μ g, und bei den anderen Analysen jeweils 20 μ g der Proben in einem SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran transferriert und anschließend mit Antisera gegen Opsin, α -Tubulin, Aktin und Flightless inkubiert. kDa: Molekulargewicht in Kilodalton.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Identifikation und Charakterisierung von bisher unbekanntem Strukturkomponenten des Verbindungsciliums der Photorezeptorzellen von Vertebraten. Die Kenntnis des molekularen Aufbaus des ciliären Cytoskeletts der Rezeptorzellen soll dazu beitragen, die Funktion bereits identifizierter Proteinkomponenten der Cilien zu klären. Die zunehmende Aufklärung der Zusammensetzung des ciliären Cytoskeletts der sensorischen Zellen ermöglicht aber nicht nur einen Einblick in die Funktion und Struktur des Verbindungsciliums der Photorezeptorzellen. Sondern auch ein besseres Verständnis des komplexen funktionellen Zusammenspiels der einzelnen Proteine in ciliären Sinneszellen im allgemeinen.

Um weitere Informationen über die molekulare Zusammensetzung des ciliären Cytoskeletts der Photorezeptorzellen zu erhalten, wurde eine kombinierte biochemisch-molekularbiologische Strategie angewandt. Ausgangspunkt des gewählten Ansatzes war die Annahme, daß detergent-extrahierte Cilienapparate von Photorezeptorzellen Proteine enthalten, welche am Aufbau des Cytoskeletts von Verbindungscilien beteiligt sind (Papermaster und Dreyer, 1974; Fleischmann et al., 1980; Zimmerman und Godchaux III, 1982; Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Die isolierten Cilienapparate wurden zur Herstellung eines polyklonalen Antiserums eingesetzt. Das Antiserum enthielt dann Antikörper gegen Epitope der unterschiedlichen Proteine, die am Aufbau des ciliären Apparates von Photorezeptorzellen beteiligt sind. Dies wurde nach Aufreinigung des Antiserums anhand von Western Blot Analysen und indirekten Immunfluoreszenzmarkierungen ermittelt. Die durchgeführten Analysen ergaben einen Einblick in das Reaktionsspektrum des Serums und die Spezifität der Antikörper des AX4-Antiserums. Das AX4-Antiserum wurde zur Durchmusterung einer Rattenretina cDNA-Expressionsbank eingesetzt. Die Antikörper des Antiserums reagierten mit den Expressionsprodukten von Klonen, deren cDNA-Inserts unter anderem für Fragmente von Cytoskelettproteinen des Verbindungsciliums kodierten.

4.1 Welche Vorteile birgt die angewandte biochemisch-molekularbiologische Strategie, und welche limitierenden Faktoren mußten berücksichtigt werden?

Photorezeptorzellen und deren Cilienapparate können in mehreren Schritten spezifisch isoliert und angereichert werden. Dazu wurden bereits vorhandene, gut ausgearbeitete und etablierte Protokolle zur Photorezeptorzell-Aufreinigung und Cytoskelettextraktion genutzt, und entsprechend den Anforderungen dieser Fragestellung modifiziert (Papermaster und Dreyer, 1974; Fleischmann et al., 1980; Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Die Photorezeptorzellen können aufgrund ihres hohen Lipidgehaltes und der daraus resultierenden geringen Sedimentationskonstante leicht von den übrigen retinalen Zellen durch differentielle

Dichtegradienten-Zentrifugationen abgetrennt werden (Zimmerman und Godchaux III, 1982). Darüberhinaus ist das ciliäre Cytoskelett der Photorezeptorzellen erfahrungsgemäß stabil gegenüber Detergenz-behandlung, und kann aus den Rezeptorzellen extrahiert werden (Fleischmann et al., 1980; Zimmermann und Godchaux III, 1982; Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Die Cilienapparate wurden über Dichtegradienten-Zentrifugation auf einem diskontinuierlichen Gradienten angereichert, und zur Herstellung des AX4-Antiserums eingesetzt. Die primäre Charakterisierung der ciliären Cytoskelettfraktion zeigte, daß bereits bekannte Cytoskelettproteine wie erwartet in der Präparation nachweisbar waren.

Bei der Durchmusterung der Rattenretina cDNA-Expressionsbank mit dem AX4-Antiserum, das Antikörper gegen die Epitope der unterschiedlichen Strukturkomponenten des Verbindungsciliums enthält, konnten spezifisch Klone isoliert werden, die für Proteine des Ciliums kodieren. Diese Spezifität wurde durch rein molekularbiologische Methoden bisher nicht erreicht. Die Herstellung einer subtraktiven retinalen cDNA-Bank, wie von Bowes et al. (1989) zur Identifikation des *rd*-Gens von der Maus beschrieben, ist bei dieser Fragestellung nicht anwendbar. Cytoskelettproteine sind in Photorezeptorzellen nicht nur am Aufbau des Cilienapparates beteiligt, sondern auch im Innen- und Außensegment der Rezeptorzellen lokalisiert. Denkbar wäre die Subtraktion der cDNA von Mäusen mit Retinae ohne Photorezeptorzell-Außensegmente (synthetisiert aus isolierter mRNA) von cDNA, die von mRNA aus den Retinae gesunder Mäuse hergestellt wurde. Dies jedoch würde zum Verlust von cDNA-Klonen führen, die für Cytoskelettproteine des Verbindungsciliums und des Innensegments kodieren. Eine differentielle Hybridisierung, wie sie von Swanson et al. (1997) zur Isolierung von photorezeptorspezifischen Genen eingesetzt wurde, ist ebenfalls nicht anwendbar. Cytoskelettproteine sind in ihrer Expression nicht auf bestimmte Zellen beschränkt, wie es für zahlreiche Proteine von Photorezeptorzellen schon gezeigt wurde (z. B. Swanson et al., 1997). Sondern diese sind spezifisch am Aufbau von Strukturen wie Mikrovilli oder Cilien in einer Vielzahl von Geweben beteiligt. Dies konnte am Beispiel von Myosin VIIa und der verschiedenen Centrin-Isoformen schon gezeigt werden (Wolfrum et al., 1995; Liu et al., 1997; Wolfrum et al., 1998; Wolfrum und Salisbury, 1998; Laoukili et al., 2000). Eine alternative biochemische Methode wäre eine Auftrennung der Proteine von detergenzextrahierten Cilienapparaten in einem SDS-PAGE, oder durch native Gelelektrophorese. Nachfolgend könnten die einzelnen Proteinbanden entweder durch Western Blot Analysen mit Antikörpern gegen Cytoskelettproteine identifiziert werden. Oder die Proteinbanden könnten aus dem Gel oder der Blotmembran ausgeschnitten und ansequenziert werden. Dieser Ansatz wäre aber wesentlich langwieriger gewesen, und für weitere Analysen müßten dann ebenfalls cDNA-Klone isoliert werden, welche für die jeweils interessanten Proteine kodieren.

Vergleichbare biochemische Methoden wurden von zwei Arbeitsgruppen angewandt. Horst et al. (1990) isolierten nach dem Protokoll von Fleischman et al. (1981) die Cilienapparate von Rinderphotorezeptorzellen und setzten diese zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern ein. Allerdings reagierte nur ein monoklonaler Antikörper spezifisch mit Epitopen eines hoch-molekularen Glycoproteins des Verbindungsciliums. In Hallet et al. (1996) ist die Herstellung monoklonaler Antikörper gegen Aktin-Bindungsproteine des Ciliums und der Außensegmente von Photorezeptorzellen beschrieben. Auch bei diesem Versuchsansatz reagierte nur ein monoklonaler Antikörper mit einem 115 kDa Protein, der RetGC-1 Guanylatcyclase. Das Aktin-Bindungsprotein Flightless, das im Cilium und in den Außensegmenten von Photorezeptorzellen enthalten ist, konnte durch diese Methode nicht identifiziert werden. Nur ein weiterer, rein biochemischer Ansatz von Besharse et al. (1999, Abstract) führte ebenfalls zur Identifikation von Motorprotein-Untereinheiten von cytoplasmatischem Dynein und des Dynactin-Komplexes im Cilienapparat von Rinderphotorezeptorzellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß eine kombinierte biochemisch-molekularbiologische Strategie erfolgreich zu Isolierung von Klonen eingesetzt wurde, die durch rein molekularbiologische oder rein biochemische Ansätze bisher nicht identifiziert wurden. Bei der Durchmusterung von 240 000 Phagenklonen reagierten die Antikörper des AX4-Antiserums mit den exprimierten Polypeptiden von 257 Klonen. Die Sequenzanalysen ergaben, daß acht bisher unbekannte Proteine des Verbindungsciliums in diesem Ansatz identifiziert wurden. Zwei cDNA-Klone (Klon AS42 und AS128) zeigten eine Sequenzidentität von 86% zu Hs *Flightless (FLII)*, einem Aktin-Bindungsprotein. Beide Klone kodieren für C-terminale Aminosäure-abschnitte von Rn Flip. Mehrere Autoren haben die Existenz von Aktin-Bindungsproteinen im Verbindungscilium postuliert, die das Aktincytoskelett des Ciliums durch „capping“- und „severing“-Funktionen modifizieren (Chaitin und Bok, 1986; Chaitin und Burnside, 1989; Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992). Zunächst wurden jedoch Aktinfilamente nur distal im Verbindungscilium in Kolokalisation mit α -Actinin und Myosin II identifiziert (Chaitin und Bok, 1986; Chaitin und Burnside, 1989; Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992). Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen, daß neben dem axonemalen Mikrotubuli-Cytoskelett auch Aktin und dessen akzessorische Proteine im Verbindungscilium funktionell von Bedeutung sind (z. B. Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992; Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000).

Es wurden auch Klone isoliert, die für mikrotubuli-assoziierte Proteine kodieren: Klon AS189 kodiert für einen Teilbereich von Ratten MAP4 („microtubule associated protein 4“), und Klon AS118 ist homolog zum Mikrotubuli-Bindungsprotein Maus EB2. Proteine der EB/RP-Familie interagieren mit dem Tumorsuppressor-Protein APC („adenomatous poliposis

coli protein“) und binden bevorzugt an die Plus-Enden von Mikrotubuli (Sun et al., 1995; Berrueta et al., 1998). Kürzlich wurde zudem *in vitro* gezeigt, daß Hs EB1p mit der Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein und Komponenten des assoziierten Dynactin-Komplexes interagiert (Berrueta et al., 1998; 1999). Klon AS206 kodiert für ein Fragment der Intermediärkette 2C von cytoplasmatischem Dynein, und Klon AS129 ist homolog zu Dynamitin, einer Komponente des Dynactin-Komplexes. Intermediärketten von cytoplasmatischem Dynein und eine Untereinheit des Dynactin Komplexes wurden auch von Besharse et al. (1999, Abstract) bei HPLC-Analysen isolierter Cilienapparate identifiziert. Die Analyse von Transportprozessen in strukturell homologen sensorischen Cilien bei *C. elegans* führen zu folgender Annahme: Cytoplasmatisches Dynein (DHC1b/DHC2) ist vermutlich auch im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen für einen retrograden Transport Plus-Ende gerichteter mikrotubuli-assoziiierter Proteine zurück zu Basis des Ciliums verantwortlich (Cole et al., 1998; Signor et al., 1999; Rosenbaum et al., 1999; Pazour et al., 2000). Die Intermediärkette 2C und Dynamitin könnten, wie es schon für Motorprotein-Untereinheiten bei *Chlamydomonas* und in Photorezeptorzellen von Fischen gezeigt wurde, am Basalkörper der Cilien lokalisiert sein. Dort erfolgt vermutlich der Zusammenbau der Transportkomplexe, die in beiden Systemen durch Kinesin II zum apikalen Ende der Cilien transportiert werden (Beech et al., 1996; Cole et al., 1998; Pazour et al., 2000).

Klon AS11 ist homolog zu Hs Centrin 3. Centrin wurde erstmals bei der Grünalge *Tetraselmis* als Hauptbestandteil der quergestreiften kontraktile Flagellenwurzeln nachgewiesen. Bei der Grünalge *Chlamydomonas* ist Centrin Komponente des Cilienapparates und in den Konnektiven zwischen den Basalkörpern, den Basalkörper und Flagellen enthalten (Salisbury 1978; Salisbury et al., 1987; 1989, Bazinet et al., 1990; Salisbury, 1995). Wolfrum (1995) identifizierte Centrin erstmals als Strukturkomponente des Verbindungsciliums und Basalkörper-Centriolen-Komplexes von Photorezeptorzellen. Verschiedenen Arbeitsgruppen konnten inzwischen mehrere Centrin-Isoformen bei der Maus, der Ratte und dem Menschen identifizieren: Centrin 1, Centrin 2 und Centrin 3 (z. B. Paoletti et al., 1996; Wolfrum und Salisbury 1998; Laoukili et al., 2000). Wolfrum und Salisbury (1998) zeigten, daß Centrin 1 in ciliären und nichtciliären Geweben exprimiert wird. Centrin 2 hingegen ist in seiner Expression auf ciliäre sensorische Gewebe wie Retina, Cochlea und Riechepithel beschränkt. Neueste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ergaben, daß Centrin 3 nicht nur im Basalkörper-Centriolen-Komplex, sondern auch im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen lokalisiert ist (Uwe Wolfrum persönlicher Kommentar).

Klon AS97 zeigt Homologien zum Gen, das für HSP 90 (Heat Shock Protein 90) kodiert. „Heat Shock“-Proteine können in Abhängigkeit vom pH-Wert und der Calciumkonzentration mit Centrin einen Komplex ausbilden. Es handelt sich um molekulare Chaperone, die mit

Centrosomen assoziiert vorliegen können, und im Basalkörper-Centriolen-Komplex des Innensegments enthalten sein dürften (Uzawa et al, 1995). Die Klone AS85 und AS100 kodieren für RNA-Bindungsproteine. Hollander et al. (1999) identifizierte durch Anwendung einer biochemischen Methode ebenfalls RNA-Bindungsproteine als Komponenten von detergent-extrahierten Cilienapparaten. Diese Proteine sind möglicherweise an der Regulation der hohen „Turn-over“-Raten der Proteine des Außensegments beteiligt (Hollander et al., 1999).

Im Immunoscreen wurden aber auch Klone isoliert, die nur Homologien zu EST's („expressed sequence tags“), oder keinerlei Homologien zu in Datenbanken vorhandenen Sequenzen aufwiesen. Bei letzteren handelt es sich möglicherweise um bisher unbekannte Gene von Photorezeptorzellen.

Darüberhinaus wurden im Immunoscreen Klone isoliert, die für Fragmente von bereits bekannten photorezeptorspezifischen Proteinen kodieren. Unter anderem für C-terminale Aminosäurebereiche von Stäbchen-Opisin, Arrestin, cGMP-regulierte Kationenkanäle, der Cytochrom C-Oxidase und Transducin. Die Isolierung dieser Klone, die für photorezeptorspezifische Proteine kodieren, könnte von der Spezifität des Antiserums bedingt sein. Die Spezifität des Antiserums wiederum ist von der Reinheit der zur Immunisierung eingesetzten Cilienapparate abhängig. Die Cilienapparate wurden jedoch auf der Basis von gut ausgearbeiteten und etablierten Methoden präpariert. Diese gewährleisteten erfahrungsgemäß eine hohe Reinheit der präparierten Cytoskelett-fraktion (Papermaster und Dreyer, 1974; Fleischmann et al., 1980; Zimmerman und Godchaux III 1982; Pagh-Roehl und Burnside, 1995). Dennoch können nach Papermaster und Dreyer (1974), sowie Fleischman et al. (1980) bei der langwierigen Aufreinigung des ciliären Apparates der Photorezeptorzellen geringfügige Verunreinigungen mit Proteinen der Außensegmente nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl Opisin vornehmlich kein Cilienprotein ist, wurde es in immunoelektronenmikroskopischen Analysen eindeutig im Verbindungscilium identifiziert (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Demnach wäre es auch möglich, daß neben Opisin noch weitere Außensegment-Proteine durch die cytoplasmatische Brücke des Verbindungsciliums vom Syntheseort im Innensegment in das Außensegment transportiert werden (Philip et al., 1987; Brann und Cohen, 1988; Whelan und McGinnis, 1988; Mangini und Pepperberg, 1988; Besharse und Horst, 1990; Marszalek et al., 2000). Während des ciliären Transports dürften die Außensegment-Proteine dann in Assoziation mit Cytoskelettproteinen des Verbindungsciliums vorliegen (Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Diese Proteine würden bei Aufreinigung der Cilienapparate ebenfalls isoliert werden, und als Antigen in der zur Immunisierung eingesetzten Fraktion vorgelegen haben. Daher wurden Klone, die für Fragmente von bereits bekannten Proteinen kodieren, vermutlich nicht aufgrund von

Verunreinigungen in der Cilienpräparation und einer verminderten Spezifität des AX4-Antiserums beim Immunoscreen isoliert.

Es ist davon auszugehen, daß die Gene der Photorezeptorproteine in der Retina aufgrund der kontinuierlichen Erneuerung der Außensegmente der Photorezeptorzellen sehr stark exprimiert werden. Somit liegen in der Rattenretina cDNA-Bank auch sehr viele Kopien von cDNA-Klonen dieser Gene vor. Daher ist es auch trotz eines sehr geringen Titors an spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine im AX4-Antiserum durchaus möglich, daß Klone, die für Komponenten der Transduktionskaskade kodieren, sehr häufig isoliert werden. Opsin ist mit einem Proteinanteil von mehr als 85% das prominenteste Protein im Außensegment der Photorezeptorzellen (Hall et al., 1969; Papermaster et al., 1974; Corless et al., 1976; Fleischmann et al., 1980; Molday, 1998). Daher dürften zahlreiche Opsin-mRNA-Kopien in der RNA-Präparation enthalten sein, die zur Herstellung der cDNA-Bank eingesetzt wurde. Somit sind cDNA-Klone, die für Stäbchen-Opisin kodieren, in einer retinalen cDNA-Bank deutlich überrepräsentiert. Dies wurde durch Ermittlung der prozentualen Anteile der verschiedenen Klone an der Gesamtzahl der isolierten Klone bestätigt.

Bei Durchführung des Immunoscreens wurden jedoch keine Klone isoliert, die für konventionelle Cytoskelettproteine wie Tubuline und Aktine kodieren. Dies könnte auf folgende limitierende Ursachen zurückzuführen sein. Die Antigenizität von Cytoskelettproteinen ist variabel, so daß gegen manche Proteine nur wenig oder gar keine Antikörper produziert werden. Da beim Immunoscreen aber ein hoher Antikörpertiter notwendig ist, um positive Klone vom Hintergrund zu unterscheiden, werden Proteine mit geringer Antigenizität oftmals durch stringentes Waschen von der Membran eliminiert (Huber et al., 1996). Zudem ist das Expressions-niveau mancher Gene sehr gering. Dementsprechend niedrig ist auch die Häufigkeit dieser Klone in cDNA-Banken. Dies gilt insbesondere für die Cytoskelettproteine des Verbindungsciliums. Im Vergleich zu den Proteinen des Außensegments, die einer permanenten Erneuerung unterliegen, stellt das Verbindungscilium von Stäbchen-Photorezeptorzellen eine relativ stabile Struktur dar (Eckmiller, 1997). Zudem werden Strukturkomponenten des Verbindungsciliums durch post-translationale Modifikationen stabilisiert (Sale et al., 1987). Um Klone zu isolieren, deren cDNA-Inserts für Cytoskelettproteine kodieren, mußte daher eine große Zahl an Phagenplaques durchmustert werden. Bei Expressionsbanken kommt erschwerend hinzu, daß manche Proteine in *E. coli* nicht im nativen Zustand exprimiert werden, so daß die Antikörper das Antigen nicht detektieren können (Huber et al., 1996).

Mit der angewandten biochemisch-molekularbiologischen Strategie konnten erfolgreich Klone isoliert werden, die für Proteine des Verbindungsciliums kodieren. Unter den isolierten Klonen befanden sich mikrotubuli- und aktin-assoziierte Proteine. Deren ciliäre Lokalisation wurde

durch nachfolgende Analysen bestätigt. Flightless ist ein aktin-bindungs und aktin-modifizierendes Protein, das als Proteinkomponente des Verbindungsciliums und Außensegments von Photorezeptorzellen identifiziert wurde. Daneben ist auch das Mikrotubuli-Bindungsprotein EB2 vermutlich eine weitere, funktionell wichtige Cilienkomponente, die mit dem axonemalen Grundgerüst des Verbindungscilium assoziiert vorliegt.

4.2 Welche Funktion hat Ratten EB2p als Protein-Komponente des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen?

Bindet Rn EB2p an Mikrotubuli?

Erste Lokalisationen durch indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen mit einem Antikörper gegen EB1 zeigten, daß Rn EB2p vermutlich im Verbindungscilium und Basalkörper des Cilienapparates in Assoziation mit Mikrotubuli vorliegt. Da kein Antikörper spezifisch gegen Rn EB2p zur Verfügung stand, wurden Antikörper gegen EB1p zur Lokalisation eingesetzt. Diese sind gegen einen Aminosäureabschnitt von EB1p gerichtet, der auch bei Rn EB2p konserviert vorliegt. Bisher konnte aber weder bei Rn EB2p, noch bei weiteren Proteinen der EB/RP-Famile ein Mikrotubuli-Bindungsmotiv innerhalb der Proteinsequenz lokalisiert werden. Die Sekundär-strukturanalyse von Rn EB2p ergab, daß dieses Protein vorwiegend α -helikale Aminosäure-abschnitte mit kurzen schleifenförmigen Bereichen aufweist. Die Interaktion mit Mikrotubuli basiert möglicherweise auch auf der ausgeprägten α -helikalen Struktur (Lupas, 1996). Desweiteren könnte ein neues, bisher unbekanntes Mikrotubuli-Bindungsmotiv, wie es für Hs EB1p diskutiert wird, die Assoziation an Mikrotubuli vermitteln (Berrueta et al., 1998; Tiernauer und Bierer, 2000). Die Phosphorylierungsstellen in Rn EB2p legen zudem die Vermutung nahe, daß die Mikrotubuli-Bindung von Rn EB2p, wie bei anderen Mikrotubuli-Bindungsproteinen schon gezeigt, durch Phosphorylierung reguliert wird (Rickard und Kreis, 1991).

Welche Funktionen hat Rn EB2p im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen?

Es ist anzunehmen, daß Rn EB2p wie seine Homologen bei der Hefe, zur Stabilität der Mikrotubuli des Verbindungsciliums beiträgt (Schwartz et al., 1997; Beinbauer et al. 1997). Desweiteren könnte Rn EB2p im Cilium mit dem mikrotubuli-assoziierten Motorprotein cytoplasmatisches Dynein interagieren, und damit an mikrotubuli-abhängigen Transportprozessen beteiligt sein. Da die Außensegmente der Photorezeptorzellen kontinuierlich erneuert werden, sind umfangreiche Transportprozesse vom metabolisch aktiven Innensegment durch das Verbindungscilium in das Außensegment notwendig (zusammengefaßt dargestellt in Besharse und Horst, 1990). Diese Transportprozesse erfolgen

durch mikrotubuli-assoziierte und aktin-assoziierte Motorproteine (Liu et al., 1999a; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Marszalek et al., 2000). Das Plus-Ende gerichtete mikrotubuli-assoziierte Motorprotein Kinesin II und IFT³-Partikel wurden im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen identifiziert (Beech et al., 1996; Muresan et al., 1999; Whitehead et al., 1999). Marszalek et al. (2000) konnten zeigen, daß Kinesin II am anterograden Transport zum apikalen Ende des Verbindungsciliums beteiligt ist. Das Arbeitsmodell von Cole et al. (1998), das anhand der Analysen der Transportprozesse in den Cilien von *Chlamydomonas* erstellt wurde, impliziert neben einem anterograden Transport über Kinesin II, auch einen retrograden Transport zurück zur Basis des Ciliums durch ein cytoplasmatisches Dynein. Dadurch werden Proteine und Plus-Ende gerichtete Motorproteine vom apikalen Ende wieder zurück zur Basis des Ciliums transportiert (z. B. Cole et al., 1998; Rosenbaum et al., 1999). Dieser retrograde Transport erfolgt vermutlich durch ein cytoplasmatisches Dynein DHC1b/DHC2, das phylogenetisch eine Mittelstellung zwischen cytoplasmatischem Dynein und axonemalem Dynein einnimmt (Cole et al., 1998; Signor et al. 1999, Pazour et al., 2000). Vergleichbare Transportprozesse sollen auch im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen erfolgen (z. B. Roof, 1986, Besharse, 1986; Cole et al., 1998; Rosenbaum et al., 1999; 1999; Pazour et al., 2000). Möglicherweise ist die im Immunoscreen isolierte Intermediärkette 2C Untereinheit eines ciliären cytoplasmatischen Dyneins, und RnEB2p bindet an diese Intermediärkette. Das zu RnEB2p homologe Hs EB1p interagiert über den C-Terminus mit einer Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein. Die Aminosäurereste dieses C-terminalen Abschnitts liegen auch in RnEB2p hoch konserviert vor. Bisher ist aber nicht bekannt, um welche Intermediärkette es sich handelt, und welche Aminosäurereste spezifisch diese Interaktion vermitteln. Daher ist nicht auszuschließen, daß RnEB2p über eine Interaktion mit der Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein im Cilium an retrograden Transportprozessen beteiligt ist. Diese Hypothese eines retrograden Transports im Cilium, vom Außensegment zum Innensegment der Photorezeptorzelle durch ein DHC1b/DHC2-Homolog, sollte zukünftig in Western Blot Analysen isolierter Cilienapparate mit geeigneten Antikörpern geprüft werden.

Ist Rn EB2 als Proteinkomponente des Basalkörpers an der Polymerisation der Mikrotubuli des Innensegments von Photorezeptorzellen beteiligt?

Der Basalkörper-Bereich des Verbindungscilium dient als MTOC (engl.: „microtubule organizing centre“) des Innensegments der Photorezeptorzellen. Von dort projizieren Mikrotubuli in das Innensegment der Rezeptorzelle (Troutt et al., 1990; Muresan et al., 1993).

³ IFT: engl. „intraflagellar transport“: Unter IFT versteht man den bi-direktionalen Transport (anterograder Transport zum apikalen Ende des Ciliums, und retrograder Transport zur Basis des Ciliums) von Partikeln oder Proteinkomplexen (auch bezeichnet als „rafts“) unterhalb der Cilienmembran entlang der axonemalen Mikrotubuli eines Ciliums oder Flagellums (Kozminski et al., 1993, 1995).

Durchgeführte indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen in der vorliegenden Arbeit lassen vermuten, daß Rn EB2p Strukturkomponente des Basalkörpers des Ciliums sein dürfte. Nach Berrueta et al. (1998) ist das humane Homolog EB1p als Komponente des MTOC einer Zelle bei der Polymerisation von Mikrotubuli funktionell von Bedeutung. Die Homologe Mal3p und Bim1p sind ebenfalls an der Regulation der Polymerisation der Mikrotubuli in Hefezellen beteiligt (Schwartz et al., 1997; Beinhauer et al., 1997). Diese Funktion ist bei allen bisher identifizierten Proteinen der EB/RP-Familie konserviert. Möglicherweise ist Rn EB2p auch im Innensegment der Photorezeptorzellen bei der Polymerisation der Mikrotubuli des Innensegment funktionell von Bedeutung. Diese Hypothese sollte zukünftig *in vitro* und *in vivo* durch geeignete Experimente geprüft werden.

4.3 Funktionen des Aktin-Bindungsproteins Flightless in Photorezeptorzellen

Die potentiellen Funktionen von Maus Flightless in Photorezeptorzellen werden anhand der durchgeführten Proteinstrukturanalysen, der Ergebnisse aus biochemischen und immunocytochemischen Experimenten, sowie bereits bekannter Funktionen von Hs Flip, Dm Flip, Ce Flip und Gelsolin abgeleitet.

Maus Flightless weist wie Hs Flip, Dm Flip und Ce Flip zwei funktionell unterschiedliche Abschnitte auf. Einerseits N-terminal die LRR-Domäne mit spezifischen Funktionen wie Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen (Kobe und Deisenhofer, 1993; 1994; Buchanan und Gay, 1996; Campbell et al., 2000b). Andererseits zeigen die C-terminalen Segmente 2 und 3 die typische segmentale Anordnung der Proteine der Gelsolin/Villin-Familie (Campbell et al., 1993; 1997b; 2000a, 2000b). Durch die Fusion der LRR-Domäne mit der „gelsolin-like“ Domäne sind zwei verschiedene Funktionen in einem Protein vereinigt. Infolgedessen nehmen die Flightless-Proteine auch eine Mittelstellung zwischen zwei unterschiedlichen Proteinfamilien ein (Claudianos und Campbell, 1995). In der Gelsolin/Villin-Familie bilden die Flightless-Proteine eine eigene Subfamilie aus. In der LRR-Proteinfamilie gehören die Flightless-Proteine zur Cyr1p-Klasse von Proteinen mit 23-Aminosäuren umfassenden LRR-Repeats (Abb. 68; Claudianos und Campbell, 1995; Buchanan und Gay, 1996).

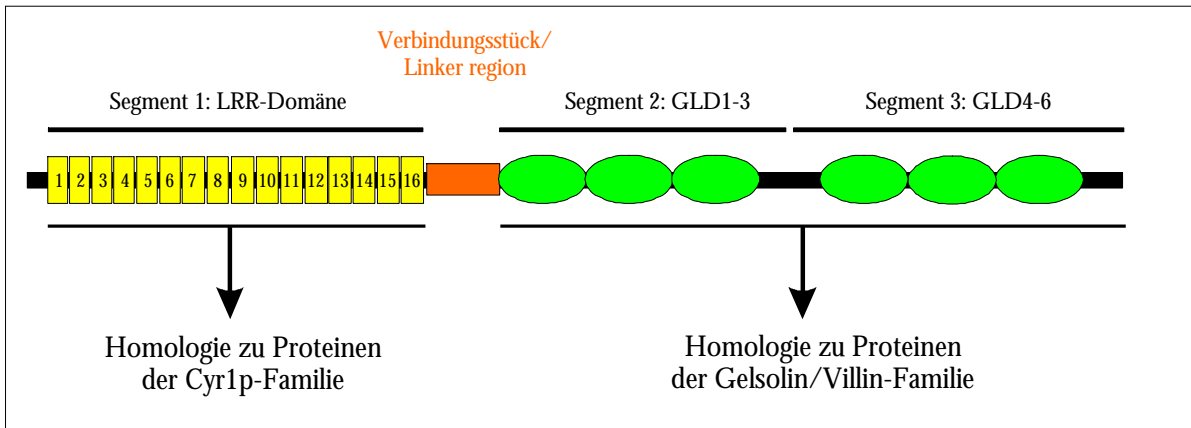


Abb. 68: Segmentstruktur und Homologien der Flightless-Proteine

Anhand der Homologie zu Gelsolin, und Proteinen der Cyr1p-Familie mit 23-Aminosäuren umfassenden LRR-Repeats, sowie durchgeführter Funktionsanalysen bei Ce Flip, Dm Flip und Hs Flip werden für die Flightless-Proteine folgende, in Abbildung 69 dargestellte Funktionen postuliert (Campbell et al., 2000a; 2000b).

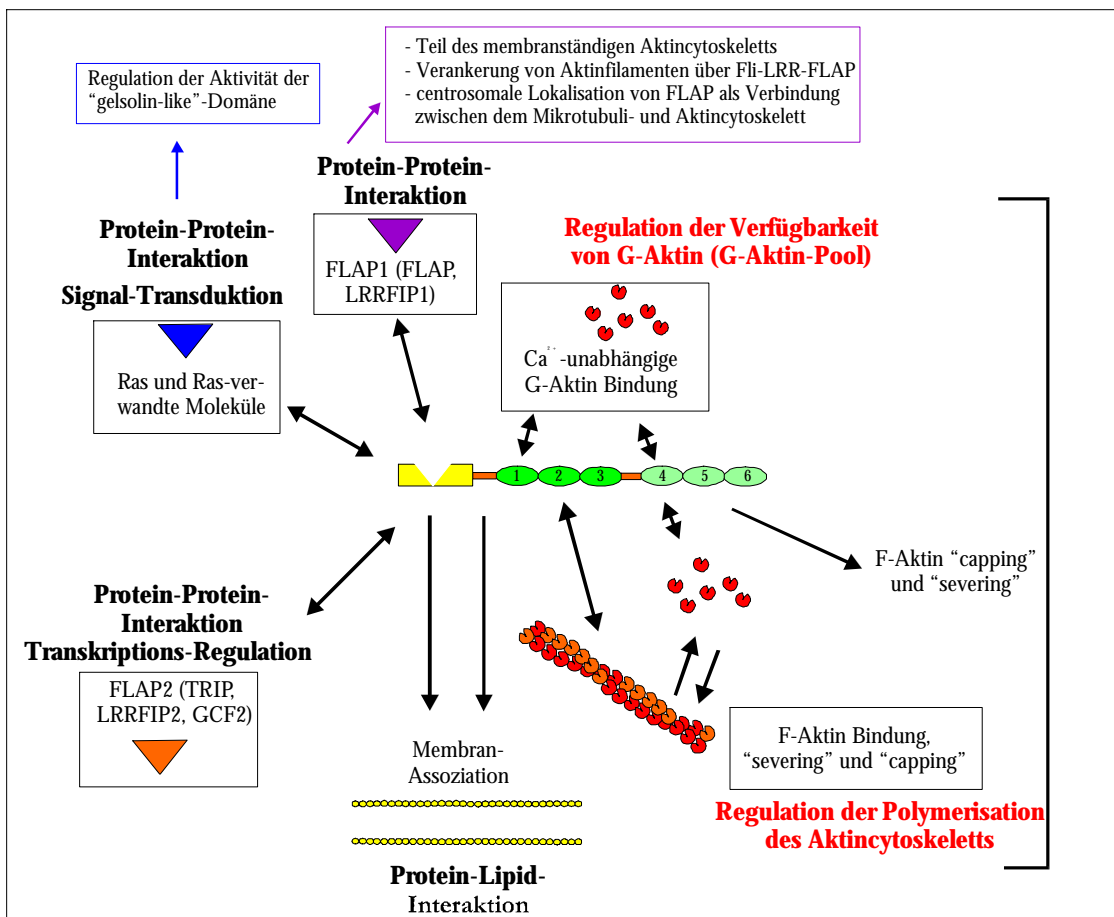


Abb.69: Funktionen der Flightless-Proteine

Die LRR-Domäne von Flightless interagiert mit FLAP1 und FLAP2, oder deren Homologie über einen konservierten Aminosäurebereich mit einer „coiled-coil“-Struktur. Desweiteren wird eine Interaktion mit Ras und Ras-verwandten Proteinen diskutiert. Die Interaktion von Mm Flip und Hs Flip mit Membranen erfolgt direkt über die LRR-Domäne, über den hydrophoben Aminosäureabschnitt (zwischen dem Segment 1 und 2, oder durch einen Lipidanker (N-Myristoylierung)). Die Segmente 2 und 3 mit Homologien zu Gelsolin sind an der Polymerisation und Regulation des Aktincytoskeletts beteiligt (verändert nach Campbell et al., 2000b).

Maus Flightless ist im Verbindungscilium mit Aktin kolokalisiert.

Das Aktin-Bindungsprotein Flightless ist am Aufbau des Cytoskeletts des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen beteiligt. Dies konnte durch Western Blot Analysen isolierter Cilienapparate, indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen und immuno-elektronenmikroskopischen Markierungen von Photorezeptorzellen mit Anti-Flightless-Antikörpern gezeigt werden. Die Quantifizierung der Flightless-Markierung von Cilienquerschnitten belegt weiter, daß Flightless spezifisch im subciliären Bereich zwischen den axonemalen Mikrotubuli und der Cilienmembran lokalisiert ist.

Darüberhinaus wurde Aktin im Verbindungscilium nachgewiesen. Aktinfilamente wurden zunächst nur distal im Cilium an der Basis der Außensegments identifiziert, kolokalisiert mit α -Aktinin und konventionellem Myosin II (Chaitin et al., 1984; Chaitin und Bok, 1986; Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989; Obata und Usukura, 1992; Usukura und Obata 1995). Schwache Aktin-Markierungen im proximalen Abschnitt des Verbindungsciliums wurden bisher als funktionell nicht relevant betrachtet (z. B. Arikawa und Williams, Fig 8). Durch den Einsatz hochsensitiver Immunmarkierung (mit Nanogold™) konnte jedoch die Lokalisation von Aktin auch in proximalen Bereich des Verbindungscilium eindeutig gezeigt werden. Diese erhöhte Reaktivität der Antikörper gegen Aktin ist vermutlich auf die höhere Sensitivität der angewandten Methode zurückzuführen (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Die Quantifizierung der Aktinmarkierung an Cilienquerschnitten zeigt, daß Aktin ebenfalls in der subciliären Domäne zwischen axonemalen Mikrotubuli und Cilienmembran lokalisiert ist. Die Lokalisation von Aktin im Verbindungscilium wird durch Western Blot Analysen axonemaler detergentextrahierter Cilienproteine bestätigt. Darüberhinaus wurden schon aktin-ähnliche Proteine im Cilium der Grünalge *Chlamydomonas* nachgewiesen (Piperno und Luck, 1979). Und im Verbindungscilium enthaltenes Myosin VIIa kann wie alle Myosine seine motile Funktion nur durch die mechanochemische ATPase-Funktion der Kopfdomäne in Interaktion mit Aktinfilamenten ausüben (Hasson und Mooseker, 1997).

In immuno-elektronenmikroskopischen und immunohistochemischen Analysen eingesetzte Antikörper gegen Aktin können nicht zwischen monomerem G-Aktin und Aktinfilamenten (F-Aktin) differenzieren. Bei Visualisierung der Aktinfilamente in einer Retina mit Rhodamin-Phalloidin, ist die Auflösung bei der lichtmikroskopischen Analyse zu gering, um filamentöses Aktin im Verbindungscilium zu sehen (Woodford und Blanks, 1989; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Vermutlich bilden die ciliären Aktinmoleküle jedoch Filamente aus, so daß wie in jeder eukaryotischen Zelle auch im Verbindungscilium ein membranständiges Aktincytoskelett vorliegt (Isenberg und Niggli, 1998). Die Aktinfilamente verlaufen vermutlich unterhalb der Plasmamembran parallel zu den axonemalen Mikrotubuli (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Über eine Assoziation von Mikrotubuli mit Aktinfilamenten ist bisher

aber nur wenig bekannt. Dennoch wurden schon in anderen Zelldomänen Verbindungen zwischen diesen beiden Cytoskelett-elementen beschrieben (z. B. Itano und Hatano, 1991; Gordon-Weeks, 1991; Henriques et al., 1995; Grolig, 1998). Nach Small et al. (1998) existieren „cross-linking“-Proteine, welche die einzelnen Aktinfilamente an den Mikrotubuli verankern, wenn diese parallel zueinander verlaufen. Die axonemalen Aktinfilamente sind vermutlich Funktionspartner für Flightless. Flightless dürfte an die Aktinfilamente binden, und diese durch Zyklen von Aktinfilament-„capping“ und -„severing“ modifizieren.

Interagiert Maus Flightless mit F- und G-Aktin?

Die Segmente 2 (GLD1-3) und 3 (GLD4-6) von Flightless sind homolog zu Aminosäureabschnitten von Gelsolin, die G- und F-Aktin binden. Bei Gelsolin ist in der GLD 1 und GLD 4 jeweils eine G-Aktin-Bindungsstelle, und in der GLD2 und GLD5 eine F-Aktin-Bindungsstelle lokalisiert (Sun et al., 1999; Robinson et al., 1999). Way et al. (1992a, 1992b) identifizierten die funktionell relevanten Aminosäurereste in diesen Bindungsstellen. Diese liegen bei Mm Flip und Hs Flip hoch konserviert vor. Bei beiden Flightless-Proteinen sind in der GLD1 im Bereich der Aktin-Bindungshelix gegenüber Gelsolin nur fünf Aminosäurereste konservativ ausgetauscht. Orloff et al. (1995), sowie Liu und Yin (1998) konnten eine Interaktion von Hs Flip mit G- und F-Aktin zeigen. Die Aminosäurereste der potentiellen G- und F-Aktin-Bindungsstellen von Mm Flip sind im Vergleich zu Hs Flip fast vollständig konserviert. Daher bindet nach Campbell et al. (2000a, 2000b) auch Mm Flip an G- und F-Aktin. Die Bindung von Maus Flightless an Aktinfilamente und G-Aktin wird momentan durch Aktin-Bindungsassays analysiert.

Kann anhand der strukturellen Homologie zu Gelsolin die Affinität der Aktinbindung abgeleitet werden?

Der Kern der GLD1 von Gelsolin enthält hydrophobe, unpolare Reste, die essentiell für die strukturelle Integrität und Funktion dieser Untereinheit sind (McLaughlin et al., 1993). Entsprechende unpolare Aminosäurereste dieser hypothetischen F1-Aktin-Oberfläche liegen an äquivalenten Positionen bei Mm Flip konserviert vor (Abb. 71, de Couet et al., 1995; Liu und Yin, 1998). Die sauren und polaren Reste in der „hydrogen-bonding-region“ des Aktin-Kontakts hingegen sind nur teilweise konserviert (de Couet et al., 1995). Der Austausch von Aminosäuren erfolgt in diesem Bereich konservativ erhaltend (Phe⁸⁷→Try; Gln⁹⁵→Leu; Try¹⁰³→Iso/Val; Gln¹¹⁸→Thr) und nicht-konservativ (Asp⁵⁰→ Leu/Valin/Try; Glu¹⁰⁷→Asn/Gly; Asp¹⁰⁹→ Arg; Asp¹¹⁰→ Asn). Bei einem nichtkonservierten Austausch werden die sauren Aminosäurereste durch einen basischen oder neutralen Rest ersetzt. Ob eine Veränderung der Seitenketten eine Veränderung der Affinität von Maus Flightless zu Aktin zur Folge hat, ist bisher unbekannt.

Die Aktin-Bindungshelix wurde in der GLD1 von Flightless bei der Sekundärstrukturanalyse an der zu Gelsolin homologen Position identifiziert. Desweiteren wurden bei Mm Flip α -helikale und β -Faltblattstrukturen homolog zu Gelsolin identifiziert. Folgerung ist, daß die "gelsolin-like"-Domänen von Flightless möglicherweise eine zu Gelsolin vergleichbare Konformation einnehmen. Dennoch können strukturelle und funktionelle Unterschiede zwischen Gelsolin und Flightless nicht ausgeschlossen werden (de Couet et al., 1995). Genaue Aussagen bezüglich der Sekundärstruktur von Flightless und der Aktinbindung sind erst nach kristallographischer Strukturanalyse möglich.

Bisher ist auch nicht bekannt, ob die Interaktion mit Aktin über die Bindungsstellen im Segment 2 oder 3 von Flightless erfolgt. Nach Robinson et al. (1999) sind bei Gelsolin auch in der GLD4-6 die Aktin-Bindungsstellen funktionell konserviert. Dies könnte auch für das Segment 3 von Flightless zutreffen. Durch Aktin-Bindungsassays wird daher im Moment *in vitro* geprüft, ob die Segmente 2 und 3 von Maus Flightless Aktinfilamente binden, oder ob diese Funktion spezifisch von einem der beiden Segmente erfüllt wird.

Die Bindung von Maus *Flightless* an G- und F-Aktin erfolgt unabhängig von Calcium und Phosphoinositiden. Bei Gelsolin wird die Interaktion mit Aktin durch mikromolare Konzentrationen an Calcium reguliert. Durch die Bindung von Calciumionen erfolgt eine Konformationsänderung des C-Terminus von Gelsolin, wodurch die Aktin-Bindungsstellen am N-Terminus freigelegt werden (McGough et al., 1998; McGough, 1998; Sun et al., 1999). Aminosäurereste, welche bei Gelsolin die Calciumbindung vermitteln, sind bei den *Flightless*-Homologen nicht konserviert (Asp⁶⁶, Glu⁹⁷, Asp/Glu¹⁰⁹, Gly¹¹⁴, Ala¹¹⁶, McLaughlin et al., 1993). Mm Flip dürfte daher wie Ce Flip calcium-unabhängig mit Aktin interagieren (Goshima et al., 1999). Auch CapZ, ein weiteres Mitglied der Gelsolin/Villin-Familie, bindet calciumunabhängig an Aktin (Schafer et al., 1996).

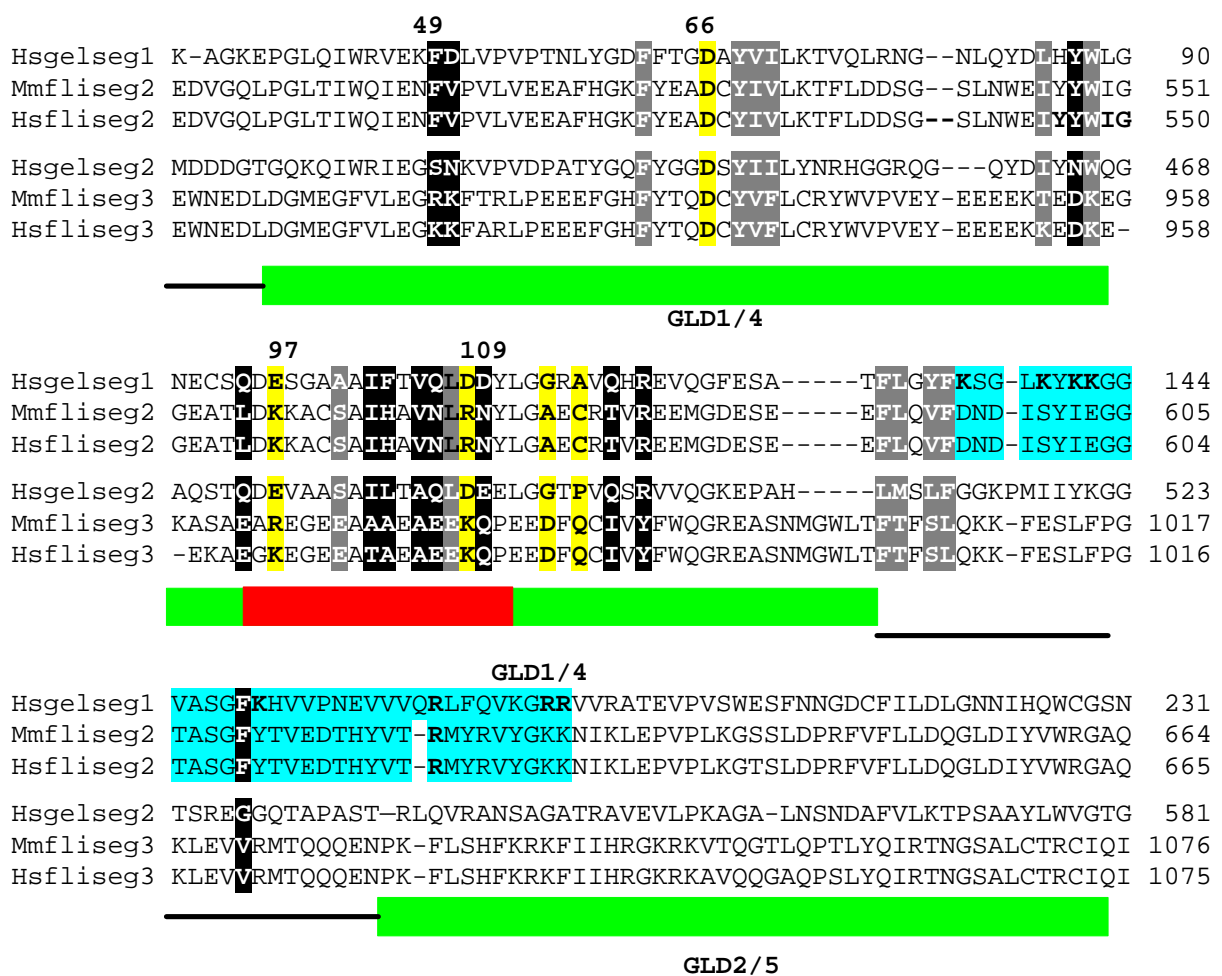


Abb. 70: Konservierungsgrad der Aktin-Bindungs-Helix und der Aminosäurereste verantwortlich für Calciumbindung.

Die Aminosäurereste Asp⁶⁶, Glu/Gln⁹⁷, Asp/Glu¹⁰⁹, Gly¹¹⁴ und Ala¹¹⁶, bezogen auf die Positionen bei Human Gelsolin im Segment 1, sowie Asp⁴⁴⁵, Glu⁴⁷⁵, Asp⁴⁸⁷, Gly⁴⁹² und Pro⁴⁹⁴ im Segment 2 von Gelsolin sind verantwortlich für die Calciumbindung (gelb hinterlegte Aminosäurereste). Bei allen *Flightless*-Proteinen ist Asp⁶⁶/Asp⁴⁴⁵ konserviert, die übrigen relevanten Aminosäurereste sind nicht konserviert. An der Position 97 wird eine saure Aminosäure gegen einen basischen Rest, an der Position 110 eine saure Aminosäure gegen eine neutrale Aminosäure ausgetauscht. Die an der Aktinbindung beteiligten Aminosäuren sind in schwarz hinterlegt, grau hinterlegt sind die unpolaren Reste. Die Aktin-Bindungshelix (AB-Helix) ist durch einen roten Balken gekennzeichnet. Der Bereich der Phosphoinositidbindung ist in hellblau hinterlegt, funktionell wichtige Arginin (R) und Lysinreste (K) sind fett eingezeichnet.

Calcium fördert die Interaktion von Gelsolin mit Aktin. Phosphoinositide hingegen wirken als Antagonisten und hemmen diese Interaktion. Die Bindung von Phosphoinositiden erfolgt bei Gelsolin über zwei benachbarte lineare Aminosäureabschnitte mit exponierten Arginin- und Lysinresten (Yu et al., 1992; Burtnick et al., 1997). Nach de Couet et al. (1995) und Campbell et al. (2000a, 2000b) sind Mm Flip und Hs Flip Phosphoinositid-regulierte Aktin-Bindungsproteine. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Aminosäuresequenz hingegen zeigt, dass für die Phosphoinositid-Bindung notwendige Aminosäuren weder in Mm Flip noch in Hs Flip konserviert sind (Abb. 70). Daher ist es zweifelhaft, ob die Interaktion von Mm Flip mit Aktin durch PIP oder PIP₂ reguliert wird.

Modifiziert Maus Flightless die Aktinfilamente im Verbindungscilium?

Das axonemale Mikrotubuli-Cytoskelett ist eine stabile Struktur, die nur geringen Modifikationen unterliegt (Sale et al., 1987). Das Aktincytoskelett unterhalb der Cilienmembran hingegen ist möglicherweise die dynamische Komponente des Ciliums, welche durch Aktin-Bindungsproteine wie Flightless modifiziert wird. In anderen Zellsystemen wurde die Modifikation von membranständigen Aktinfilamenten durch Aktin-Bindungsproteine in Anpassung auf veränderte Bedingungen schon beschrieben (Luna und Hitt, 1992; Stossel, 1993; Lauffenburger und Horwitz, 1996; Mitchinson und Cramer, 1996). Flightless könnte durch „severing“- und „capping“-Funktionen, vergleichbar zu Proteinen der Gelsolin/Villin-Familie, die Zahl und Länge der longitudinal verlaufenden Aktinfilamente im Verbindungscilium verändern (z. B. Pollard und Cooper, 1986; Vandekerckhove, 1990; Sun et al., 1999; Sun et al. 1999 Cooper und Schafer, 2000). Dies wiederum hätte Auswirkung auf die Funktion von aktin-assoziierten Motorproteinen wie Myosin VIIa, die ihre Fracht entlang von Aktinfilamenten durch das Verbindungscilium transportieren (Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000). Dies könnte in Zusammenhang mit einem veränderten Bedarf an Stäbchen-Opisin im Außensegment erfolgen, zum Beispiel bei Veränderung der Lichtbedingungen (Penn und Williams, 1986; Williams, 1998). Eine Variation des Opsingehaltes in Außensegmenten von Photorezeptorzellen in Abhängigkeit von der Lichtintensität wurde schon beschrieben (Schremser und Williams, 1995a; 1995b). Dies basiert vermutlich unter anderem auf einer veränderten Syntheserate von Opsin im Innensegment, und anterograden Transports in das Außensegment der Photorezeptorzellen (Obin et al., 1996).

Goshima et al. (1999) konnten *in vitro* zeigen, dass die „gelsolin-like“ Domänen von Ce Flip „severing“-Aktivität aufweisen, Aktinfilamente schneiden und die Zahl an Filamenten erhöhen. Hs Flip hingegen soll nach Liu und Yin (1998) über keine „severing“-Aktivität verfügen. Dennoch sind die Aminosäurereste, welche für die „severing“-Aktivität

verantwortlich sein dürften, bei allen Homologen konserviert (McLaughlin et al., 1993). Aufgrund dieses Widerspruchs sollte *in vitro* getestet werden, ob Mm Flip „severing“-Aktivität aufweist, und dadurch im Verbindungscilium die Zahl an Aktinfilamenten erhöht.

Spielen Aktinfilamente zusammen mit Flightless eine Rolle bei der Ausrichtung der Photorezeptorzellen? Photorezeptorzellen in der Säugetierretina und der Retina des Menschen sind in geringem Ausmaß zu Bewegungen in der Lage: Die Außensegmente der Stäbchen werden durch aktive Änderung ihres Winkels zum Innensegment in Richtung des optimalen Lichteinfalls ausgerichtet (Enoch, 1981). Die veränderte Ausrichtung der photorezeptiven Membran-Disks senkrecht zum Lichteinfall ermöglicht vermutlich den Ausgleich des *Stiles-Crawford*-Effektes erster Art (SCE1)². Bisher liegen aber keinerlei Daten über den Mechanismus der Ausrichtung der Außensegmente vor. Es kann allerdings davon ausgegangen werden, daß die notwendige Orientierungsbewegung vermutlich im Bereich des dünnen Verbindungsciliums der Photorezeptorzellen erfolgt (Enoch, 1981). Aktinfilamente sind möglicherweise eine aktive Komponente im Verbindungscilium. Aufgrund der Kolo-kalisation mit Flightless, werden die Aktinfilamente möglicherweise entsprechend den Anforderungen, wie in anderen Zelldomänen schon gezeigt, durch Proteine der Gelsolin/Villin-Familie modifiziert (z. B. Pestonjamp et al., 1997; Schmidt und Hall 1998; Sun et al., 1999). Darüberhinaus wäre auch ein kontraktiler Mechanismus miteinzubeziehen, der aufgrund der Interaktion von Myosinen mit Aktinfilamenten ausgeübt wird. Bisher konnten bereits zwei Myosine als Cilienkomponenten identifiziert werden (Williams et al., 1992; Liu et al. 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000).

Ist Flightless an der Morphogenese der Disk-Membranen des Außensegments beteiligt?

Bei immuno-elektronenmikroskopischen Markierungen wurde Aktin zunächst distal im Verbindungscilium lokalisiert (Chaitin und Bok, 1986; Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989). Die Aktinfilamente sind zusammen mit Myosin II und α -Aktinin in diesem Cilienabschnitt kolokalisiert (Arikawa und Williams, 1989; Williams et al., 1992). Untersuchungen von Williams et al. (1988) sowie Vaughan und Fischer (1989) zeigen, daß für eine normale Disk-Morphogenese ein intaktes Aktincytoskelett notwendig ist. Die Aktinfilamente sind dabei so ausgerichtet, daß die Minus-Enden am Axonem, die Plus-Enden hingegen an der Plasmamembran lokalisiert sind (Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Burnside, 1989). Nach Williams et al. (1992) erfolgt die Invagination der Plasmamembran bei der Disk-Morphogenese durch Zugkräfte, die durch Interaktion von Myosin II mit den Aktinfilamenten entstehen, die an der Plasmamembran befestigt sind.

² Nach dem *Stiles-Crawford*-Effekt erster Art sind schräg auf die Retina einfallende Lichtstrahlen (Randstrahlen) weniger reizwirksam als Lichtstrahlen gleicher Intensität, die senkrecht auf die Retina treffen (Stiles und Crawford, 1933; Stiles, 1939).

Bei immuno-elektronenmikroskopischen Markierungen mit Antikörpern gegen Flightless lag entgegen den Erwartungen keine spezifische Anreicherung und Kolo-kalisation von Flightless mit Aktin distal im Cilium an der Basis des Außensegments vor. Flightless ist im Verbindungscilium gleichmäßig in der subciliären Domäne zwischen den axonemalen Mikrotubuli-Paarringen und der Plasmamembran lokalisiert. Überdies liegt Flightless mit den Disk-Membranen der Außensegmente der Photorezeptorzellen assoziiert vor. Dies konnte durch Hochsalzextraktionen isolierter Außensegment-Membranen bestätigt werden. Die Assoziation von Maus Flightless an die Membranen erfolgt entweder über einen Lipidanker. N-terminal sind alle Voraussetzungen für eine post-translationale N-Myristoylierung erfüllt, und dieser Lipidanker kann nur enzymatisch getrennt werden. Proteine mit Lipidanker bleiben daher auch bei Hochsalzextraktionen mit den Membranen assoziiert (Towler et al., 1988; Grand, 1989; Magee, 1990; Chow et al., 1992; Casey, 1994). Oder die Membran-Assoziation von Mm Flip wird durch den hydrophoben Aminosäureabschnitt zwischen dem Segment 1 und 2 vermittelt.

Bisher ist nicht bekannt, wie die Verankerung der Aktinfilamente an die Plasmamembran der Photorezeptorzell-Außensegmente erfolgt. Da Mm Flip mit C-terminalen Segmenten mit Aktin interagiert, und N-terminal an Membranen assoziiert, kann folgende Hypothese erstellt werden: Die Aktinfilamente distal im Verbindungscilium werden möglicherweise über Maus Flightless an der Plasmamembran der neugebildeten Disks verankert. Die Hypothese der Membran-Assoziation von Flightless wird durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen untermauert. Anhand von *Drosophila*-Mutanten mit Defekten im Flightless-Gen wurde festgestellt, daß Flightless während der Entwicklung des *Drosophila*-Embryos Aktinfilamente an Blastoderm-Membranen verankert (Straub et al., 1996). Zudem sind bei lebensfähigen *Drosophila*-Mutanten, mit viablen Defekten im Flightless-Gen, die Myofibrillen in der indirekten Flugmuskulatur willkürlich verteilt. Vermutlich basiert dies auf dem Verlust der Funktion von Flightless, Aktinfilamente an Membranen zu verankern (Koanna und Hotta, 1978; Deak et al., 1980; Miklos und De Couet, 1990). Immunofluoreszenzmikroskopische Analysen in der vorliegenden Arbeit zeigen zudem, daß Flightless auch im Skelettmuskel mit Membranen assoziiert vorliegt. Kürzlich wurde von Davy et al. (2000) publiziert, daß Flightless auch in neuronalen Zellen der Maus membran-assoziiert vorkommt. Möglicherweise handelt es sich bei der Membran-Interaktion von Flightless um eine zentrale Funktion dieses Proteins (de Couet et al., 1995).

Interagiert Flightless im Außensegment der Photorezeptorzellen mit Aktin?

Maus Flightless wurde durch immuno-elektronenmikroskopische Markierungen und biochemische Analysen isolierter Außensegment-Membranen an den Disk-Membranen des

Außensegmente nachgewiesen. Möglicherweise verankert Maus Flightless auch im Außensegment der Photorezeptorzelle kurze Aktinfilamente an der Disk-Membran. Aktin wurde ebenfalls bei den Hochsalzextraktionen der Außensegment-Membranen in den Sedimenten nachgewiesen. Durch Anwendung von immunohistochemischen und immunoelektronenmikroskopischen Methoden konnte Aktin in den Außensegmenten von Photorezeptorzellen bisher nicht lokalisiert werden. Möglicherweise sind die Epitope von Aktin durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinen, oder infolge der hohen Packungsdichte der Außensegment-Proteine, maskiert (Valentino et al., 1985; Woodford und Blanks, 1989). Durch biochemische Methoden wurden weitere Proteine in Außensegmenten von Photorezeptorzellen identifiziert, die dort mit Aktin interagieren. Es handelt sich um die retinale Guanylatcyclase RetGC-1 und Garp's (glutamic acid rich proteins; Schrem et al., 1999 und Körschen et al., 1999). Kürzlich konnten Kajimura et al. (2000) durch elektronenmikroskopische Methoden in Kombination mit Gefrierbruchtechnik zeigen, daß drei unterschiedliche Filamenttypen an den Disk-Membranen der Stäbchen Photorezeptorzellen vorkommen. Ein Filamenttyp mit einem Durchmesser von 10-15 nm bildet auf der cytoplasmatischen Oberfläche der Disks ein Netzwerk aus. Nach Ansicht der Autoren handelt es sich um ein „spectrin-like undercoat“. Aktinfilamente weisen einen Durchmesser von 8-10 nm auf. Für die elektronenmikroskopischen Analysen wurden die Präparate mit einer dünnen Schicht von Platin-Karbon beschichtet. Da die genaue Dicke dieser Schicht den Autoren nicht bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden, daß es sich um ein Aktinfilament-Netzwerk auf der cytoplasmatischen Seite der Disk-Membranen handelt. Aktin ist möglicherweise über Flightless an den Membranen verankert, und bildet zusammen mit photorezeptorspezifischen Proteinen wie die Guanylatcyclase und GARPs Komplexe aus. Dies könnte wiederum dem engen Zusammenhalt der Proteine der Signaltransduktionskaskade dienen, um die Effektivität und Schnelligkeit der Signaltransduktionsprozesse zu gewährleisten (Körschen et al., 1999).

Interagiert Fli-LRR im Verbindungscilium und Basalkörper mit einem FLAP1-Homolog?

Indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen und immuno-elektronenmikroskopische Markierungen zeigen, daß Flightless im Verbindungscilium und Basalkörper-Centriolen-Komplexes enthalten ist. Da nach Liu et al. (1999b) der Interaktionspartner der Fli-LRR-Domäne FLAP1 nicht nur cytoplasmatisch, sondern auch centrosomen-assoziiert vorkommt, könnte die Lokalisation von Mm Flip im Basalkörper-Centriolen-Komplex indirekt über ein FLAP1-Homolog erfolgen. Dadurch würde eine funktionelle Verbindung zwischen dem Mikrotubuli-Cytoskelett des Centrosoms und dem Aktincytoskelett hergestellt werden (Liu et al., 1999b). Bisher ist nicht bekannt, ob FLAP1 direkt an Mikrotubuli bindet oder ob die Centrosomen-Assoziation indirekt über ein weiteres Protein erfolgt (Liu et al., 1999b). Mit

einem Antiserum gegen FLAP1 sollte daher geprüft werden, ob FLAP1-Homologe im Basalkörper-Centriolen-Komplex des Innen-segments der Photorezeptorzellen lokalisiert sind. Flightless ist in einer der beiden Centriolen des Basalkörper-Centriolen-Komplexes spezifisch angereichert. Eine vergleichbare Anreicherung von Proteinen in einer von beiden Centriolen eines Centrosoms wurde in der Vergangenheit schon öfter gezeigt (Salisbury, 1995; Lange und Gull, 1995). Diese Anreicherung erfolgt in der Regel in der reiferen (maturen) Centriole.

Darüberhinaus gilt es zu prüfen, ob ein FLAP1-Homolog Strukturkomponente des Verbindungscilium ist. In Western Blot Analysen detergentextrahierter Cilienproteine reagieren Anti-Flightless Antikörper unabhängig vom verwendeten Proteinextraktionspuffer in der Regel mit einer 200 kDa-Proteinbande. Bei dieser Proteinbande handelt es sich möglicherweise um Flightless, das mit einem Liganden in einem stabilen Komplex vorliegt. Dafür spricht, daß bisher identifizierte FLAP1-Homologe Molekulargewichte von ca. 60-70 kDa aufweisen. Zusammen mit Flightless ergibt dies das detektierte Molekulargewicht von ca. 200 kDa. Allerdings war es mit dem vorhandenen Anti-Flightless Antikörper nicht möglich, in Ko-Immunopräzipitation Flightless mit einem gebundenen Liganden aus Zell-Lysaten zu präzipitieren, und diese Hypothese zu untermauern. Daher sollte in Western Blot Analysen isolierter Cilienapparate mit einem Antiserum gegen FLAP1 ermittelt werden, ob FLAP1 Strukturkomponente der Cilienapparate ist. Liegt im Verbindungscilium ein Fli-LRR-FLAP1-Komplex vor, so könnte dieser eine Verankerung der longitudinal verlaufenden Aktinfilamente an die axonemalen Mikrotubuli vermitteln.

Interagiert Mm Fli-LRR mit Ras-Proteinen?

Mehrere Autoren postulieren, daß die Fli-LRR-Domäne wie die LRR-Repeats weiterer Mitglieder der Cyr1p-Proteinfamilie mit Ras-Proteinen interagiert (Claudianos und Campbell, 1995; Campbell et al., 1997b; 2000a; 2000b). Über diese Interaktion soll die „gelsolin-like“-Domäne in ihrer Aktivität reguliert werden (Claudianos und Campbell, 1995; Campbell et al., 1997b; Buchanan und Gay, 1996; Goshima et al., 1999; Campbell et al., 2000a, 2000b). Bisher konnte aber nur für *C. elegans* Fli-LRR eine Interaktion mit Ras *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden (Goshima et al., 1999). *C. elegans* Flightless ist der ursprünglichste Vertreter der Flightless-Subfamilie, und steht am nächsten zu Gruppe der Adenylatcyclasen, Alkoholdehydrogenasen, sowie zu *rsp-1/rsu-1*, die durch Ras-Proteine in ihrer Aktivität reguliert werden (zusammengefaßt in Buchanan und Gay, 1996). Möglicherweise ist diese Funktion in *Ce* Flip aufgrund der phylogenetischen Nähe zu diesen Proteinen konserviert. Liu und Yin (1998) haben *in vitro* gezeigt, daß Hs Fli-LRR nicht mit Ras-Proteinen interagiert. Allerdings wurden diese Versuche mit *in vitro* translatiertem Hs Flip durchgeführt. Nach Goshima et al. (1999) werden die LRR-Repeats von exprimiertem Fli-LRR nicht richtig gefaltet und sind daher nicht

funktionell. Auch Goshima et al. (1999) nutzen mehrere Expressionssysteme, um funktionell aktives Ce Flip zu erhalten, und berichten von Problemen bei der Expression.

Aufgrund des hohen Konservierungsgrades der Fli-LRR-Domäne bei den unterschiedlichen Homologen, sollte daher *in vivo* und *in vitro* getestet werden, ob bei Mm Flip eine Interaktion mit Ras-Proteinen erfolgt. Zum jetzigen Zeitpunkt liegen keinerlei Daten darüber vor, ob in Photorezeptorzellen von Vertebraten Ras-Proteine funktionell von Bedeutung sind. Bei *Drosophila* hingegen spielen Ras-Proteine bei der Entwicklung und Polarität von Photorezeptorzellen eine wichtige Rolle (Matsuo et al., 1999; Pazman et al., 2000).

Wie fest ist die Bindung zwischen Fli-LRR und einem Interaktionspartner?

Die PSA-Sekundärstrukturanalyse der Fli-LRR-Domäne ergab, daß im Vergleich zum Ribonuklease-Inhibitor (RI), dessen Sekundärstruktur aufgeklärt ist, eine deutliche Reduktion der strangförmigen Abschnitte erfolgt. Der RI ist aus 15 alternierend angeordneten 28 (A-Typ) und 29 (B-Typ) Aminosäureresten umfassenden LRR-Repeats aufgebaut. Strukturell wechseln β -Faltblattstrukturen mit α -Helices parallel zu einer gemeinsamen Achse ab, so daß ein offenes, nicht-globuläres Protein mit einer "hufeisenförmigen"-Struktur und konkaven Oberfläche vorliegt. (Kobe und Deisenhofer, 1993; 1994). Infolge der Reduktion der strangförmigen Abschnitte in Mm Fli-LRR ist eine vom RI abweichende Sekundärstruktur zu erwarten. Darüberhinaus sind bei Mm Fli-LRR die α -helikalen Abschnitte innerhalb eines Repeats durch einen Prolinrest an Position 16 (Helix-Terminations-Signal) verkürzt (Abb. 71; Buchanan und Gay, 1996). Dennoch dominiert bei Mm Fli-LRR die α -helikale Struktur. Nach Buchanan und Gay (1996) und Krantz et al. (1991) ist dies ein Kennzeichen für die cytoplasmatische Lokalisation eines LRR-Proteins, da nur extrazelluläre LRR-Proteine eine ausgeprägte β -Faltblattstruktur aufweisen. Die Verringerung der strangförmigen Abschnitte hat nach Buchanan und Gay (1996) eine mehr globuläre und weniger langgestreckte Konformation zur Folge. Dies wiederum beeinflußt die Stärke der Ligandenbindung der LRR-Domäne. Je gestreckter die Konformation einer LRR-Domäne ist, desto schwächer ist die Bindung zwischen der LRR-Domäne und einem Liganden (Kobe und Deisenhofer, 1995a; Buchanan und Gay, 1996).

Die Sekundärstrukturanalyse zeigt, daß Mm Fli-LRR vermutlich eine mehr globuläre Struktur als der RI aufweist. Auf der Basis der zuvor genannten Faktoren kann daher die Hypothese erstellt werden, daß zwischen Mm Flip-LRR einem Liganden eine relativ feste Bindung vorliegt. Dieser Assoziation wird möglicherweise bei der Auftrennung von retinalen Proteinen im SDS-PAGE nicht getrennt. Ein ähnliches Phänomen konnte schon bei der Proteinphosphatase 1 (PP1) dokumentiert werden, die gleichfalls in einem Komplex vorliegt,

der nicht durch SDS oder β -Mercaptoethanol getrennt werden kann (Egloff et al., 1997; Grumann et al., 2000).

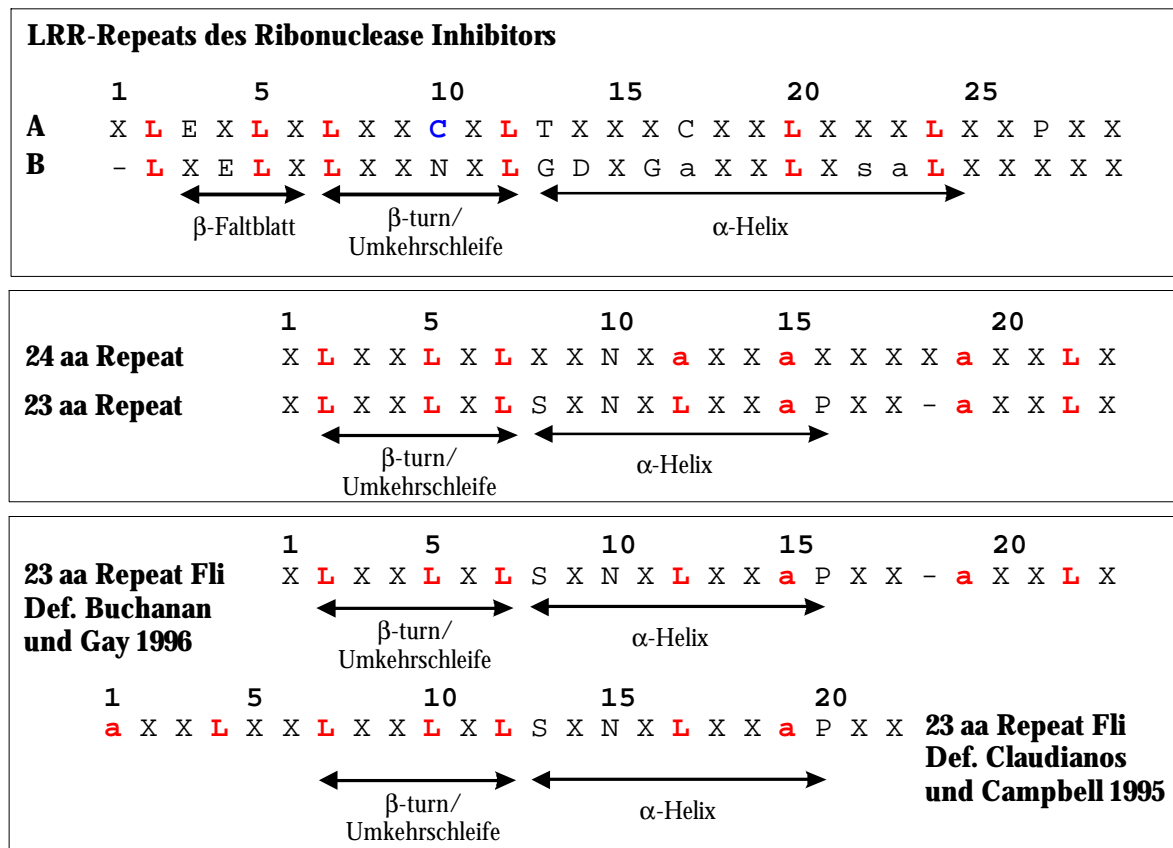


Abb. 71: Kosensussequenz der LRR-Repeats des RI im Vergleich zum 23 Aminosäure-Repeat von Flightless

Der Ribonuclease Inhibitor enthält zwei verschiedene Typen von LRR-Repeats, einen A-Typ aus 28 Aminosäureresten und den B-Typ aus 29 Aminosäureresten. Beide weisen Bereiche in β -Faltblattstruktur, Wendungen und α -helikale Abschnitte auf. Flightless-Proteine hingegen besitzen 23 Aminosäuren umfassende LRR-Repeats. Von deren Kosensussequenz existieren in der Literatur zwei Definitionen: von Claudianos und Campbell (1995), sowie von Buchanan und Gay (1996). Diese unterschieden sich aber nur in der Definition des Beginns und Endes eines Repeats. Beide Versionen zeigen, daß vermutlich keine oder nur sehr kurze strangförmige Abschnitte innerhalb der Repeats vorkommen. Die konservierten Leucinreste und aliphatischen Aminosäurereste sind in rot eingezeichnet, der Cysteinrest an Position 10 A-Typs des RI in blau.

Existieren zwei unterschiedliche „Pools“ von Flightless in Abhängigkeit vom Gewebe und dem verwendeten Proteinextraktionspuffer?

Maus Flightless wurde in Western Blot Analysen in Abhängigkeit vom Gewebe und den verwendeten Proteinextraktionspuffern bei 145 kDa und 200 kDa nachgewiesen.

- (1) In Proteinextrakten von Retinae, hergestellt mit nativen Puffern wie PBS oder Hepes, reagieren die Anti-Flightless Antikörper mit einer Proteinbande von 200 kDa. Wurde das Proteinextrakt mit detergentzhaltigen Puffern wie RIPA, modifizierter RIPA oder Hepes-Puffer mit TRIS/SDS hergestellt, so wurde Flightless bei einem Molekulargewicht von 145 kDa nachgewiesen. Bei der 200 kDa Proteinbande könnte es sich um Flightless mit

einem gebundenen Interaktionspartner handeln, wobei diese Assoziation im nativen Puffer erhalten bleibt, und bei detergentenhaltigen Puffern getrennt wird.

- (2) In Western Blot Analysen isolierter Außensegment-Membranen von Photorezeptorzellen reagieren Anti-Flightless Antikörper unabhängig vom Puffer mit einer 145 kDa-Proteinbande.
- (3) In Proteinextrakten isolierter und angereicherter Cilienapparate erfolgt in Western Blot Analysen unabhängig vom verwendeten Puffer der Nachweis einer 200 kDa-Proteinbande.
- (4) In Proteinextrakten vom Skelettmuskel und Gehirn mit nativen Puffern wird mit Anti-Flightless Antikörpern ebenfalls eine 200 kDa-Bande nachgewiesen. In Tris/SDS-haltigen Puffern reagieren die Antikörper mit einer 200 kDa und 145 kDa Proteinbande.

Diese Ergebnisse führen zu folgender Hypothese: Es existieren vermutlich zwei „Pools“ von Flightless. Eine Fraktion ist mit Membranen assoziiert. Die Membran-Assoziation dürfte durch einen N-terminalen Lipidanker oder über den hydrophoben Aminosäureabschnitt zwischen den Segmenten 1 und 2 erfolgen (Abb. 72). Bei Membran-Assoziation von Flightless bindet möglicherweise kein Ligand (FLAP1 oder FLAP2) mehr an die LRR-Domäne. Dafür spricht, daß Flightless in Western Blot Analysen isolierter Außensegment-Membranen immer als 145 kDa-Proteinbande nachgewiesen wurde. Allerdings liegen keinerlei Daten darüber vor, ob die LRR-Repeats von Proteinen der Cyr1p-Familie entweder mit Membranen oder mit einem Liganden interagieren, und sich diese Funktionen möglicherweise gegenseitig ausschließen.

Bei der zweiten Fraktion handelt es sich möglicherweise um Flightless mit einem gebundenen Liganden. Bisher identifizierte Interaktionspartner weisen Molekulargewichte von 60-80 kDa auf. Zusammen mit dem berechneten Molekulargewicht von Flightless ergeben diese das detektierte Molekulargewicht von ca. 200 kDa (Liu und Yin, 1998, Wilson et al., 1998; Campbell et al., 2000). In der Fraktion mit detergentenextrahierten Cilienapparaten wurde Flightless unabhängig vom verwendeten Proteinextraktionspuffer immer bei 200 kDa nachgewiesen. Dies unterstützt die Hypothese, daß Flightless in Zusammenhang mit dem Cytoskelett mit einem fest gebundenen Liganden vorliegt. Möglicherweise vermittelt dieser Ligand sogar die Verbindung zwischen dem axonemalen Mikrotubulicytoskelett und Aktinfilamenten im Verbindungscilium.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente lassen die Vermutung zu, daß Fli-LRR in Cytoskelettfractionen mit einem Liganden vorliegt. Es ist aber notwendig, diese Hypothese durch nachfolgende Experimente zu prüfen. Mit einem Antikörper gegen FLAP1 sollte in Western Blot Analysen getestet werden, ob in der Retina und Photorezeptorzellen ein FLAP1-Homolog exprimiert wird. RT-PCR-Analysen mit geeigneten Primerpaaren sollten zudem Auskunft über die Expression von FLAP1/2-Homologen in der Retina geben. Zudem könnten Ko-Immunopräzipitationen mit einem weiteren Antikörper gegen Flightless und

gegen FLAP1/2 durchgeführt werden, um eine Interaktion von diesen beiden Proteine zweifelsfrei zu ermitteln.

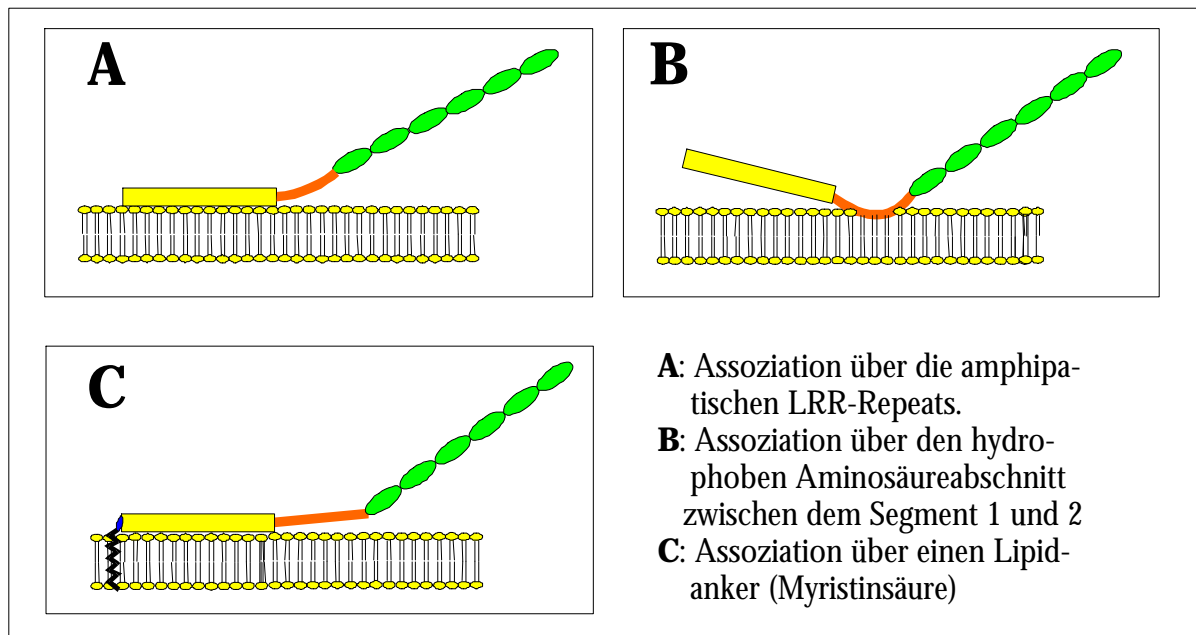


Abb. 73: Möglichkeiten der Membran-Assoziation von Flightless

Schematische Darstellung der Möglichkeiten der Membran-Assoziation von Flightless. Die Ausrichtung der „gelsolin-like“-Domäne erfolgte willkürlich und muß nicht den Tatsachen entsprechen. Die Ergebnisse der Hochsalzextraktion zeigten, daß es sich um eine stabile Interaktion handelt, vermutlich trifft **B** oder **C** zu.

In der vorliegenden Arbeit konnten zudem vier potentielle Interaktionspartner der Mm Flightless-LRR-Domäne in der Testis identifiziert werden. Dies erfolgte anhand eines cDNA-Screens mit einer cDNA-Sonde gegen den hochkonservierten α -helikalen „coiled-coil“-Bereich der FLAP1- und FLAP2-Proteine. Sequenzanalysen ergaben, daß es sich vermutlich um FLAP2-Homologe handelt. Nachfolgende Durchmusterungen einer retinalen Maus cDNA-Bank mit dieser Sonde führten bisher aber zu keinem positiven Ergebnis. Möglicherweise ist das Expressionsniveau der FLAP1/FLAP2-Homologe in Photorezeptorzellen gegenüber der Testis sehr niedrig, so daß eine große Zahl an Plaques durchmustert werden muß um Klone zu isolieren, die für diese Proteine kodieren.

Eine Differenz zwischen dem apparenten und berechneten Molekulargewicht kann auch auf post-translationalen Modifikationen eines Proteins beruhen. Die Analyse der Aminosäuresequenz von Maus Flightless hat gezeigt, daß vermutlich Modifikationen dieses Proteins nach der Translation erfolgen. Eine N-terminale Glycosylierung von Flightless ist trotz zahlreicher N-Glycosylierungsstellen unwahrscheinlich, da es sich um ein cytoplasmatisches Protein handelt (Marshall, 1972; Pless und Lennarz, 1977; Bause, 1983). Zudem ist bisher kein Protein bekannt, dessen N-Glycosylierung eine Differenz von ca. 80 kDa zwischen dem berechneten und apparenten Molekulargewicht bewirkt. Darüberhinaus

sind in Mm Flip zahlreiche potentielle Phosphorylierungsstellen enthalten. Gelsolin wird phosphoryliert. Allerdings ist die funktionelle Relevanz dieser Modifikation bisher unbekannt (Yin et al., 1980; de Corte et al., 1997; Sun et al., 1999).

In Northern Blot Analysen wurde in der Retina, dem Gehirn und der Testis entsprechend zu Campbell et al. (1997b) *Flightless*-mRNA bei ca. 4,4 kb nachgewiesen. Da keine höhermolekularen Transkripte detektiert wurden kann ausgeschlossen werden, daß es sich bei der 200 kDa-Proteinbande um eine alternativ gespleißte, höhermolekulare Form handelt. Im Skelett- und Herzmuskel wurden aber niedermolekulare mRNA detektiert. Dabei handelt es sich möglicherweise um Degradationsprodukte, da diese Banden von Campbell et al. (1997b), sowie Liu und Yin (1998) im Skelettmuskel nicht detektiert wurden. Zwar weisen *Flightless*-Transkripte der Maus und des Menschen alternative Polyadenylierungssignale am 3'-Ende auf, so daß auch etwas kürzere Transkripte vorkommen dürften. Dennoch entstehen durch die alternative Polyadenylierung nur um 100-200 Basenpaare kürzere Transkripte (Campbell et al., 1997b; 2000a; 2000b). In der Milz konnte kein mRNA-Transkript von *Flightless* detektiert werden. Neben einer partiellen Degradation der mRNA könnten auch zu wenig *Flightless*-mRNA-Transkripte aufgrund einer sehr geringen Turnover-Rate in der Milz vorliegen, so daß diese nicht detektiert werden konnten. Überdies ist es möglich, daß in diesem Gewebe keine Expression von *Flightless* erfolgt, und ein anderes Mitglied der Gelsolin/Villin-Familie die Funktion von *Flightless* übernimmt. Arai et al. (1999) konnten bei der Analyse des Expressionsmusters von verschiedenen Vertretern der Gelsolin/Villin-Familie in unterschiedlichen Geweben der Maus zeigen, daß Mitglieder dieser Proteinfamilie nicht ubiquitär in allen Geweben exprimiert werden.

Wird Flightless in weiteren sensorischen Geweben exprimiert?

Western Blot Analysen der sensorischen Gewebe des Innenohrs und olfaktorischen Epithels haben gezeigt, daß *Flightless* auch dort exprimiert wird. Die Anti-*Flightless*-Antikörper reagieren in diesen sensorischen Geweben ebenfalls spezifisch mit einer 200 kDa Proteinbande. Bei indirekter Immunofluoreszenzmarkierung mit Antikörpern gegen *Flightless* wurde das Protein im Riechepithel in den Basalkörpern und in der Übergangszone der Cilien der olfaktorischen Rezeptorzellen lokalisiert. Im Innenohr konnte *Flightless* in den Haarzellen durch indirekte Immunofluoreszenzmarkierung lokalisiert werden. Im Gegensatz zu Centrin, das in Form von Filamenten das Cytoplasma der äußeren Haarzellen durchzieht, handelt es sich bei *Flightless* vermutlich wie bei Myosin VIIa um ein Protein, das mit dem membranständigen Aktincytoskelett der Haarzellen interagiert (Wolfrum et al., 1998). Allerdings sind weitere indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen von Querschnitten durch

Haarzellen des Innenohrs und immuno-elektronenmikroskopische Analysen notwendig, um diese Lokalisation zu bestätigen.

Führen Mutationen im Gen, das für Flightless kodiert, zu Denerationserscheinungen sensorischer Gewebe?

Hs *Flightless II* wurde von Campbell et al. (1997b) auf dem Chromosom 17p an der Position 11.2 lokalisiert. Diese Lokalisation steht in keinem direkten Zusammenhang zu bereits bekannten Mutationen, die zu retinalen Degenerationen führen können. Allerdings liegt das Flightless-Gen in der SMS kritischen Region (Chen et al., 1997). SMS (Smith Magenis Syndrom) ist ein humanes Krankheitssyndrom, das statistisch gesehen bei einer von 25.000 Lebendgeburten auftritt, und sich in einer weiten Bandbreite von physischen Defekten, Entwicklungsdefekten sowie abnormalem Verhalten der Patienten äußert. Beschrieben wurde das Syndrom erstmals von Smith et al. (1986), der bei Patienten neben Muskel- und Herzproblemen unter anderem auch Taubheit und Veränderungen im Auge feststellte. Bei SMS erfolgen Deletionen von einem oder mehreren Genen an der Position 17p11.2. Die Deletionen liegen in unterschiedlichen Abschnitten eines 1 MB großen Bereichs, und umfassen mindestens 700 bp. Daraus erklärt sich auch das heterogene Krankheitsbild (Chen et al., 1997; Seranski et al., 1999). Aufgrund dessen wird es schwierig sein, einem bestimmten Phänotyp die Deletion eines Gens zuzuordnen. Zudem sind meist größere Abschnitte mit mehreren Genen deletiert (Seranski et al., 1999). Daher kann über eine Rolle von Flightless bei der Degeneration sensorischen Geweben zum jetzigen Zeitpunkt keine Aussage gemacht werden. Aber die Aufklärung der spezifischen Funktionen von Flightless in Photorezeptorzellen könnte in der Zukunft auch einen Einblick in Defekte in sensorischen Zellen ermöglichen, die möglicherweise auf Mutationen im Flightless-Gen beruhen.

5 Schlußbetrachtung und Ausblick

Durch Anwendung einer kombinierten biochemisch-molekularbiologischen Methode konnten in der vorliegenden Arbeit bisher unbekannte Cytoskelett-Proteine des Verbindungsciliums identifiziert werden. Einerseits wurden mikrotubuli-assoziierte Proteine wie EB2, MAP4 eine Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein und Dynamitin (Untereinheit des Dynactin-Komplexes) isoliert. Andererseits konnte das Aktin-Bindungsprotein Flightless, das centrosomale Protein Centrin 3, und Klone die für HSP90 und RNA-Bindungsproteine kodieren mit dem AX4-Antiserum isoliert werden. Diese Proteine dürften an den Funktionen des Verbindungsciliums, unter anderem am Transport von Proteinen vom Innensegment in das Außensegment der Photorezeptorzellen beteiligt sein.

Die mikrotubuli-assoziierten Proteine EB2 und MAP4 tragen vermutlich zur Stabilisierung des axonemalen Mikrotubuli-Grundgerüsts bei. EB2 bindet im Verbindungscilium an die axonemalen Mikrotubuli, oder interagiert mit einer Intermediärkette von cytoplasmatischem Dynein. Die im Immunoscreen identifizierte Intermediärkette 2C hingegen könnte Untereinheit der ciliären Variante von cytoplasmatischem Dynein (DHC1b/DHC2C), und somit an retrograden Transportprozessen im Verbindungscilium zum Zellkörper hin beteiligt sein (Abb. 73). DHC1b wurde in sensorischen Cilien bei *C. elegans* als retrogrades mikrotubuli-assoziiertes Motorprotein identifiziert (Signor et al., 1999). Ultrastrukturell handelt es sich bei den sensorischen Cilien von *C. elegans* um membranumgebene, nichmotile axonemale Strukturen, aufgebaut aus neun Mikrotubuli-Paarringen und einer variablen Zahl an zentralen Mikrotubuli, aber ohne Dyneinarme und Radialspeichen wie in motilen Cilien (z. B. Cole et al., 1998; Signor et al., 1999). Vergleichbare Strukturmerkmale zeigt auch das Verbindungscilium der Photorezeptorzellen. Forschungsarbeiten haben gezeigt, daß der anterograde Transport bei Cilien von *C. elegans*, *Chlamydomonas*, und im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen, durch Kinesin II erfolgt (z. B. Cole et al., 1998; Signor et al., 1999; Marszalek et al., 2000). Daher liegt die Vermutung nahe, daß in Photorezeptorzellen wie bei *Chlamydomonas* der retrograde ciliäre Transport durch cytoplasmatisches Dynein vermittelt wird. Modelle über intraciliäre Transportprozesse bei *Chlamydomonas* und *C. elegans* können durchaus auf motile Vorgänge im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen übertragen werden (z. B. Rosenbaum et al., 1999; Pazour et al., 2000).

Flightless ist Strukturkomponente des Verbindungsciliums und liegt mit den Membranen des Außensegments assoziiert vor. Diesem Protein kommt vermutlich auch eine duale Funktion zu. Einerseits bindet es Aktinfilamente, und verankert diese an den Disk-Membranen des Außensegments. Andererseits liegt es im Verbindungscilium in der subciliären Domäne zwischen der Plasmamembran und den Mikrotubuli-Paarringen vor. Dort verankert es möglicherweise die Aktinfilamente an den axonemalen Mikrotubuli über die FLAP-Fli-LRR-

Assoziation (Abb. 73). Durch Modifikation der Aktinfilamente des Verbindungsciliums können zudem Transportwege für aktin-assoziierte Motorproteine geschaffen werden. Die Identifikation eines weiteren Aktin-Bindungsproteins im Verbindungscilium und Außensegment der Photorezeptorzellen weist auf die Bedeutung des bisher nur wenig beachteten Aktincytoskeletts in diesen sensorischen Zellen hin.

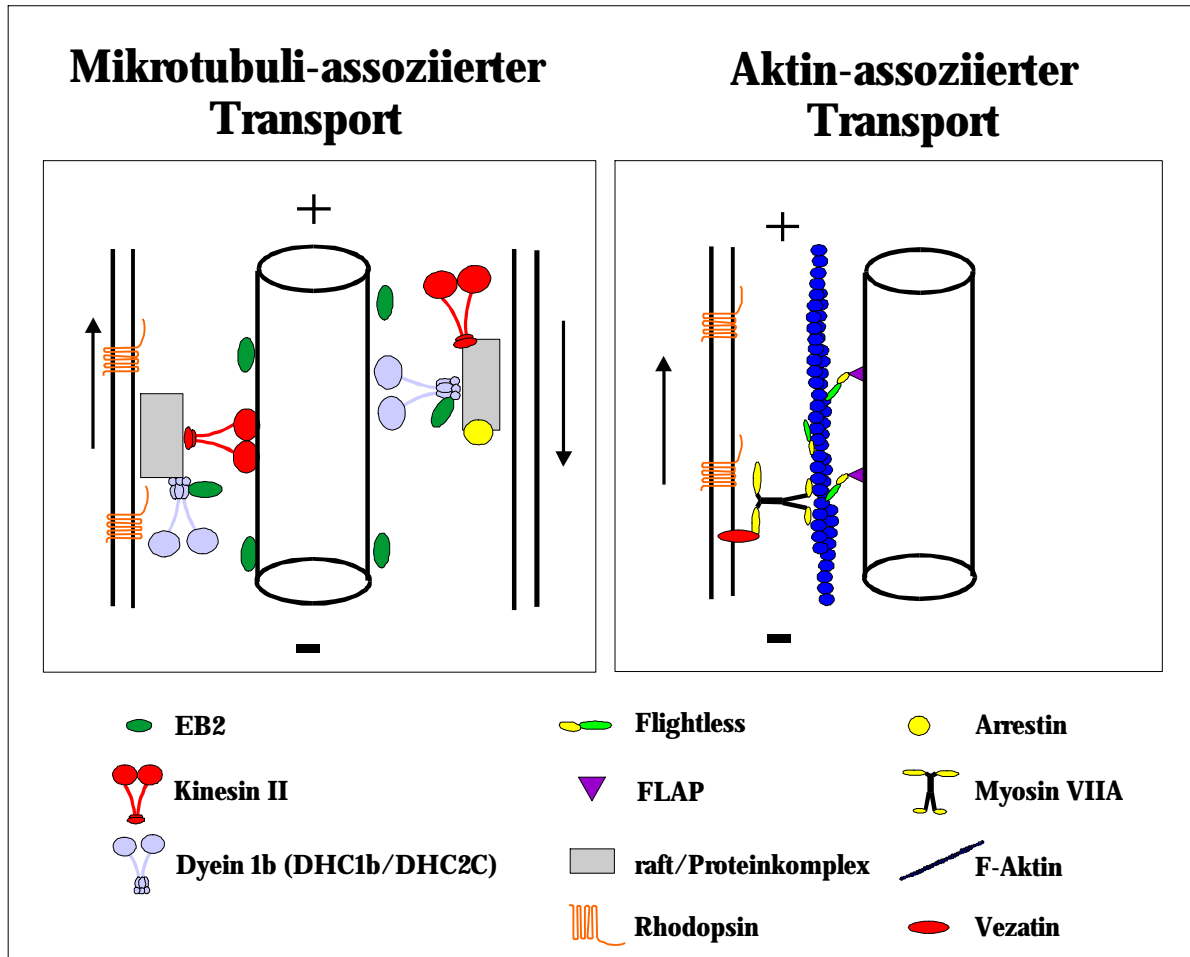


Abb. 73: Transportprozesse im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen

Zur weiteren Analyse der Funktion von Flightless in Photorezeptorzellen ist zunächst geplant, ein Antiserum herzustellen, das in Ko-Immunopräzipitationen eingesetzt werden kann. Dieses Antiserum sollte gegen einen Aminosäureabschnitt gerichtet sein, der bei allen Flightless-Proteinen konserviert vorliegt. Ein solcher Aminosäurebereich wurde von Davy et al. (2000) identifiziert (CSHFKRKFIIH). Es handelt sich um die Aminosäurereste 1005-1014 von Mm Flip in der GLD4. Zudem sollte erneut versucht werden, die drei Segmente von Maus Flightless getrennt zu exprimieren, um die spezifischen Funktionen dieser Teilbereiche zu ermitteln. Während dieser Dissertation wurden die drei Segmente subkloniert. Allerdings war eine Expression dieser Teilbereiche im bakteriellen System in *E. coli* nicht möglich. Daher sollte ein alternatives System, eventuell SF9-Zellen, Säugerzellen oder Hefezellen getestet und zur Protein-expression eingesetzt werden. Die Segmente 2 und 3 von Flightless sollten mit einem

geeigneten „tag“ wie FLAG, HA oder GFP exprimiert werden. Dadurch wären Immunopräzipitationen und ein Nachweis in Western Blot Analysen mit einem Antikörper gegen das entsprechende „Tag“ möglich. Anschließend könnte dann die Bindung dieser Segmente von Flightless an Aktinfilamente und G-Aktin analysiert werden. Die Bindung an G-Aktin kann anhand von Aktin-Sepharose (mit gebundenem G-Aktin), und die Bindung an F-Aktin durch den Einsatz von *in vitro* polymerisierten Aktinfilamenten, in Ko-Sedimentationsexperimenten analysiert werden. Überdies könnte durch verlängerte Inkubationszeiten und geeignete Puffer vergleichbar zu Goshima et al. (1999) geprüft werden, ob die Segmente 2 und 3 von Maus Flightless „severing“-Aktivität aufweisen. Darüberhinaus wäre eine Analyse der Funktion von Flightless in Säugerzellen denkbar. Der Einfluß von Aktin-Bindungsproteinen auf die Ausbildung des Aktincytoskeletts kann durch Überexpression in z. B. COS-7 Zellen analysiert werden.

Um Liganden der Fli-LRR-Domäne zu identifizieren, wurden während dieser Dissertation EST's mit hohen Identitäten zur α -helikalen „coiled-coil“-Region von FLAP1 und FLAP2 identifiziert und vom IMAGE Konsortium (England) erhalten. Die cDNA-Inserts dieser EST-Klone wurden isoliert, und zur Herstellung von DIG-markierten cDNA-Sonden eingesetzt. Mit diesen cDNA-Sonden wurde die Rattenretina und Rattentestis cDNA-Bank durchmustert, und vier Klone mit Homologien zu FLAP2 (TRIP) isoliert. Diese Klone sollten weiter charakterisiert und wenn nötig die vollständige kodierende Sequenz kloniert werden.

Desweiteren ist geplant, ein spezifisches Antiserum gegen Rn EB2p herzustellen, um die zelluläre und subzelluläre Lokalisation dieses Proteins im Verbindungscilium zu bestätigen. Dieses Antiserum könnte dann in weiteren Experimenten wie Western Blot Analysen und Immuno-präzipitationen eingesetzt werden, um die Funktion von Rn EB2p im Verbindungscilium zu charakterisieren. Zudem sollte mittels „GST-Pull-Down-Assays“ geprüft werden, ob EB2 mit Intermediärketten von cytoplasmatischem Dynein und Komponenten des Dynactin-Komplexes interagiert.

Klone, welche nur Homologien zu EST's und keine Homologien zu in Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen aufzeigten, sollten regelmäßig erneut Datenbankrecherchen unterzogen werden, da unter diesen durchaus noch Klone vertreten sein könnten, die für bisher unbekannte Proteine des Verbindungsciliums kodieren. Darüberhinaus sollten bisher unbearbeitete Klone des Primärscreens mit einem Sondenmixes gegen bereits isolierte Klone getestet werden. Negativ-getestete Klone könnten durchaus für weitere unbekannte Cilienproteine kodieren.

6 Zusammenfassung

Photorezeptorzellen sind aus funktionell und morphologisch unterschiedlichen Kompartimenten aufgebaut: Einem lichtsensitiven Außensegment, das über ein nichtmotiles modifiziertes Cilium mit dem metabolisch aktiven Innensegment verbunden ist. Die Membranen des Außensegments werden kontinuierlich erneuert. Diese Prozesse erfordern die Translokation von Proteinen der Signaltransduktionskaskade vom Synthesort im Innensegment in das Außensegment. Der intrazelluläre Transport der Proteine erfolgt durch das Verbindungscilium als einzige direkte cytoplasmatische Brücke zwischen den beiden Kompartimenten. Die Cytoskelettproteine des Verbindungsciliums sind maßgeblich an diesen Transportprozessen, sowie an der Ausbildung der Disk-Membranen und Funktion des Ciliums als Diffusionsbarriere beteiligt. Trotz dieser, für die Aufrechterhaltung der Photorezeptorzelle wichtigen Funktionen, sind bislang nur wenige molekulare Strukturkomponenten des Verbindungsciliums bekannt und funktionell charakterisiert. Um weitere Proteinkomponenten des Ciliums zu identifizieren, wurde eine biochemisch-molekularbiologische Strategie angewandt. Detergenzextrahierte Cilienapparate von Rinderphotorezeptorzellen wurden zur Immunisierung eines Kaninchens eingesetzt. Das affinitätsgereinigte Antiserum, mit Antikörpern gegen Epitope der unterschiedlichen Proteine des Verbindungsciliums, wurde anschließend zur Durchmusterung einer Rattenretina cDNA-Expressionsbank verwendet. Positive Klone wurden isoliert, sequenziert, und deren 3'- und 5'-terminale cDNA-Sequenzen in Datenbankrecherchen analysiert. Neben Klonen, die für Fragmente von bereits bekannten photorezeptorspezifischen Proteinen kodieren, Klonen mit Homologien zu EST's, und Klonen ohne Homologien zu in Datenbanken enthaltenen Einträgen, wurden 8 cDNA-Klone isoliert, die für bisher unbekannte Cytoskelettproteine des Verbindungsciliums kodieren. Zwei dieser Proteine wurden näher charakterisiert: Das Mikrotubuli-Bindungsprotein EB2p und das Aktin-Bindungsprotein Flightless (Flip). Indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen mit Antikörpern gegen EB1p, die mit EB2p kreuzreagieren, wurden EB-Proteine im Verbindungscilium und Basalkörper der Rezeptorzellen lokalisiert. Funktionell trägt Rn EB2p vermutlich zur Stabilisierung der axonemalen Mikrotubuli bei, und dürfte durch Interaktion mit cytoplasmatischem Dynein an retrograden Transportprozessen im Verbindungscilium beteiligt sein. Das Aktin-Bindungsprotein Flightless ist ein cytoplasmatisches Protein mit einer N-terminalen LRR-Domäne, die Protein-Protein- und Protein-Lipid-Interaktionen vermittelt. C-terminal weist Flip zwei Segmente mit Homologien zu Gelsolin auf. Indirekte Immunofluoreszenzmarkierungen und immuno-elektronenmikroskopische Analysen zeigen, daß Flip im Verbindungscilium in der subzellulären Domäne zwischen den axonemalen Mikrotubuliparringen und der Plasmamembran lokalisiert ist. Im Außensegment der Photorezeptorzellen liegt Flip an den Disk-Membranen assoziiert vor. Flip verfügt vermutlich über zwei Funktion: Membran-assoziiert dürfte es Aktinfilamente an den Membranen der Außensegmente verankern. Im Verbindungscilium hingegen könnte es die ciliären Aktinfilamente modifizieren, die

Transportwege für aktin-assoziierte Motorproteine sind. Flip und EB2p sind möglicherweise an den intrazellulären Transportprozessen durch das Verbindungscilium beteiligt.

Die in der vorliegenden Arbeit angewandte Methode konnte erfolgreich zur Isolierung bislang unbekannter Proteine des Verbindungsciliums eingesetzt werden. Darüberhinaus wurde Flip auch in den ciliären Sinneszellen des Riechepithels und den mechanorezeptiven Haarzellen des Innenohrs identifiziert. Erkenntnisse über die molekulare Zusammensetzung des ciliären Cytoskeletts von Photorezeptorzellen können daher auch auf andere ciliäre Sinneszellen angewandt werden. Dies ermöglicht einen besseren Einblick in die allgemeine Funktion cilärer Cytoskelettstrukturen sensorischer Zellen.

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Ampe C und Vandekerckhove JS (1999). Actins. In: Kreis T, Vale R (Eds.). *Guidebook to the cytoskeletal and motor proteins*. Oxford, Oxford Univ. Press, 2nd Ed., 11-14.
- Arai M und Kwiatkowski DJ (1999). Differential developmentally regulated expression of gelsolin family members in the mouse. *Developmentally Dynamics*. **215**, 297-307.
- Arikawa K und Williams DS (1989). Organization of actin filaments and immunolocalization of alpha actinin in the connecting cilium of rat photoreceptors. *The Journal of Comparative Neurology*. **288**, 640-646.
- Bause E (1983). Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem. J.* **209**, 331-336
- Baron AT, Greenwood TM, Bazinet CW, Salisbury JL (1992). Centrin is a component of the pericentriolar lattice. *Biol. of the Cell*, **76**, 383-388.
- Barrong SD, Chaitin MH, Fliesler SJ, Possin, DE, Jacobson, SG, Milam AH (1992). Ultrastructure of connecting cilia in different forms of retinitis pigmentosa. *Arch. Ophthalmol.*, **110**, 706-710.
- Bazinet CW, Baron AT, Salisbury JL (1990). Centrin: A calcium-binding protein associated with the centrosome. In: *Stimulus Response Coupling: The role of intracellular calcium-binding proteins*. Smith VL, Dedman JR (Eds.), CRC Press, 39-55.
- Beech PL, Pagh-Roehl K, Noda Y, Hirokawa N, Burnside B, Rosenbaum JL (1996). Localization of kinesin superfamily protein to the connecting cilium of fish photoreceptors. *J. Cell Sci.* **109**, 889-897.
- Beinhauer JD, Hagan IM, Hegemann JH, Fleig U (1997). Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule-integrity and maintenance of cell shape. *J. Cell Biol.*, **139**, 717-728.
- Berrueta L, Kraeft S.-K, Tirnauer JS, Schyler SC, Chen LB, Hill, DE, Pellman, D, Bierer BE (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 10596-10601.
- Berrueta L, Tirnauer JS, Schyler SC, Pellman D, Bierer BE (1999). The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Current Biology*, **9**, 425-428.
- Besharse JC, Hollyfield JG, Rayborn ME (1977). Turnover of rod photoreceptor outer segments. II. Membrane addition and loss in relationship to light. *J. Cell. Biol.* **75**, 507-527.
- Besharse JC und Pfenninger KH (1980): Membrane assembly in retinal photoreceptors. I. Freeze fracture analysis of cytoplasmic vesicles in relationship to disc assembly. *J. Cell Biol.*, **87**, 451-463.
- Besharse JC, Forestner Dm, Defoe DM (1985). Membrane assembly in retinal photoreceptors. III. Distinct membrane domains of the connecting cilium of developing rods. *J. Neurosci.*, **5**, 1035-1048.
- Besharse JC (1986). Phosphosensitive membrane turnover. Differentiated membrane domains and cell-cell interaction. In: *The Retina: A model for cell biological studies*. Part I, Eds. Adler R und Farber D; Academic Press, New York, 297-353.
- Besharse JC und Horst CJ (1990). The photoreceptor connecting cilium. A model for the transition zone. In: *Ciliary and flagellar membranes*, edited by R.A. Bloodgood, Plenum Publishing Cooperation 1990; Kapitel 15, 389-417.

- Besharse JC, Janson MM, Liang MY, (1999). Cytosolic dynein in ciliary axonemes and outer segments of photoreceptors. ARVO Abstract Book, 2130.
- Bok D (1985). Retinal photoreceptor pigment epithelium interactions. Friedenwald Lecture. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **26**, 1659.
- Bost-Usinger, L, Chen RJ, Hillman D, Park H, Burnside B (1997). Multiple kinesin family members expressed in teleost retina RPE include a novel C-terminal kinesin. Exp. Eye Res., **64**, 781-794.
- Bowes C, Danciger M, Kozak CA, Farber DB (1989). Isolation of candidate cDNA for the gene causing retinal degeneration in the rd mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **86(24)**, 9722-9726.
- Bowser R, Müller H, Govindan B, Novick P (1992). Sec8p and Sec15p are components of a plasma membrane associated 19.5S particle that may function downstream of Sec4p to control exocytosis. J. Cell Biol., **118**, 1041-1056.
- Brann MR und Cohen LV (1988). Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. Science, **235**, 585-587.
- Bretscher A und Weber K (1980). Villin is a major protein of microvillus cytoskeleton which binds to both G and F-actin in a calcium-dependent manner. Cell, **20**, 839-847.
- Buchanan SG und Gay NJ (1996). Structural and functional diversity in the leucine rich repeat family of proteins. Biophys. Mol. Biol., **65**, 1-44.
- Buchanan SGSC, Dornan S, Gay, NJ (1998). Promotor sequence and expression of the leucine-rich repeat gene LRR47: evidence for cytoplasmic and nuclear localization in Drosophila embryos and cells. Gene, **211**, 235-244.
- Burtnick LD, Koepf EK, Grimes J (1997). The crystal structure of plasma gelsolin: implications for actin severing, capping, and nucleation. Cell, **90**, 661-70.
- Campbell HD, Schimansky T, Claudianos C, Ozsarac N, Kasprak AB, Cotsell JN, Young IG, De Couet HG, Miklos GLG (1993). The Drosophila melanogaster flightless-I gene involved in gastrulation and muscle degeneration is conserved in Caenorhabditis elegans and human. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **90**, 11386-11390.
- Campbell NA (1997a) Biologie, Spektrum Verlag
- Campbell HD, Fountain S, Young IG, Claudianos C, Hoheisel JD, Chen KS, Lupski JR (1997b). Genomic structure, Evolution and expression of human FLII, a gelsolin and leucine-rich-repeat family member: overlap with LLGL. Genomics, **42**, 46-54.
- Campbell HD, Fountain S, Young IG, Weitz S, Lichter P, Hoheisel JD (2000a). Fliih, the murine homologue of *Drosophila melanogaster* flightless I gene: nucleotide sequence, chromosomal mapping and overlap with Llglh. DNA Seq., **11(1-2)**, 29-40.
- Campbell HD, Young IG, Matthaei KI (2000b). Mammalian homologues of the Drosophila melanogaster flightless I gene involved in early development. Current Genomics, **1**, 59-70.
- Casey PJ (1994). Lipid modifications of G proteins. Curr. Opin. Cell. Biol, **6**, 219-229.
- Chaitin MH, Schneider BG, Hall MO, Papermaster DS (1984). Actin in the photoreceptor connecting cilium: Immunocytochemical localization to the site of outer segment disk formation. J. Cell. Biol, **99**, 239-247.
- Chaitin MH und Bok D (1986). Immunoferritin localization of actin in retinal photoreceptors. IOVS, **27**, 1764-1767.
- Chaitin MH und Burnside B (1989). Actin filament polarity at the site of rod outer segment disk morphogenesis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **30**, 2461-2469.

- Chaitin MH und Coelho N (1992). Immunogold localization of myosin in the photoreceptor connecting cilium. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **33**, 3103-3108.
- Chang GQ, Hao Y, Wong F (1993). Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds and rhodopsin mutant mice. *Neuron*, **11**, 595-605.
- Chen KS, Gunaratne PH, Hoheisel JD, Young IG, Miklos GLG, Greenberg F, Shaffer LG, Campbell HD, Lupski JR (1995). The human homologue of *Drosophila melanogaster* flightless I gene (fliI) maps within the Smith-Magenis Microdeletion critical region in 17p11.2. *Am. J. Hum. Genet.*, **56**, 175-182.
- Chen KS, Manian P, Koeth T, Potocki L, Zhao Q, Chinault AC, Lee CC, Lupski JR (1997). Homologous recombination of a flanking repeat gene cluster is a mechanism for a common syndrome. *Nature Genetics*. **17**, 154-163.
- Chou PY, Fasman GD (1978a). Empirical predictions of protein structure. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 251-276.
- Chou PY, Fasman GD (1978b). Prediction of secondary structure of proteins from their amino acid sequence. *Adv. Enzymol.*, **47**, 45-148.
- Chow M, Der CI, Buss JE (1992). Structure and biological effects of lipid modifications on proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **4**, 629-636.
- Claudianos C und Campbell HD (1995). The novel flightless-I gene brings together two gene families, actin-binding proteins related to gelsolin and leucine-rich-repeat proteins involved in ras signal transduction. *Mol. Biol. Evol.*, **12(3)**, 405-414.
- Clothia C und Finkelstein AV (1990). The classification and origins of protein folding patterns. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 1007-1039.
- Cole DG, Diener DR, Himelblau AL, Beech PL, Fuster JC, Rosenbaum JL (1998). *Chlamydomonas* kinesin II-dependent intraflagellar transport (IFT): IFT-particles contain proteins required for ciliary assembly in *Caenorhabditis elegans* sensory neurons. *J. Cell Biol.* **141**, (4), 993-1008.
- Collicelli J, Field J, Ballester R, Chester N, Young D, Wigler M (1990). Mutational mapping of RAS-responsive Domains of the *Saccharomyces cerevisiae* adenylate cyclase. *Molec. Cell Biol.* **10**, 2539-2543.
- Cooper JA und Schafer DA (2000). Control of actin assembly and disassembly at filament ends. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12(1)**, 97-103.
- Corless JM, Cobbs, WH, Costello MJ, Robertson JD (1976). On the asymmetry of frog retinal rod outer segment disk membranes. *Exp. Eye Res.*, **23**, 295-324.
- Cutler ML, Bassin RH, Zanonil L, Talbot N (1992). Isolation of *rsp-1*, a novel cDNA capable of suppressing v-Ras transformation. *Mol. Cell Biol.* **12**, 3750-3756.
- Danscher G (1981). Localization of gold in biological tissue: a method for light and electron microscopy. *Histochemistry* **71**, 81-88.
- Davy DA, Ball EE, Matthaei KI, Campbell HD, Crouch MF (2000). The flightless I protein localizes to actin based structures during embryonic development. *Immunol. Cell.* **78** (4), 423-429.
- Deak II, Bellamy PR, Bienz M, Dubuis Y, Fenner E, Gollin M, Rähmi A, Ramp T, Rheinhardt CA, Cotton B (1980). Mutations affecting the indirect flight muscles of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **69**, 61-80.
- de Couet HG, Fong, KSK, Weeds AG, McLaughlin PJ, Miklos GLG (1995). Molecular and mutational analysis of a gelsolin-family member encoded by the flightless I gene of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **141**, 1049-1059.

- de Corte V, Gettesmann J, Vandekerkhove J (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate actin-binding proteins. *FEBS Lett.*, **401**, 191-196.
- Del Priore LV, Lewis A, Tan S, Carley WW, Webb, WW (1987): Fluorescence light microscopy of F-actin in retinal rods and glial cells. *IOVS*, **28**, 633-639.
- Eakin RM und Westfall JA (1964). The development of photoreceptors in the stirnotgan of the treefrog hyla regila, *Embryologica*, **6**, 84-98.
- Eckmiller MS und Toman A (1998). Association of kinesin with microtubules in diverse cytoskeletal systems in the outer segments od rods and cones. *Acta Anat.*, **162**, 133-141.
- Eckmiller MS (1997). Morphogenesis and renewal of cone outer segments. In: *Progress in Retinal and Eye Research*; **Vol. 16, No. 3**, 401-441.
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PTW, Barford D (1997). Structural basis for the regocnition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1: *EMBO J.*, **8**, 1876-1887.
- Enoch JM (1981). Retinal receptor orientation and photoreceptor optics. In: Enoch JM, Tobey FL (Eds.). *Vertebrate Photorceptor optics*. Berlin Heidelberg New York. Springer Verlag, 125-168.
- Fariss RN, Molday RS, Fisher SK, Matsumoto B (1997). Evidence from normal and degenerating photoreceptors that two outer segment integral membran proteins have separate transport pathways. *J. Comp. Neurol.*, **387**, 148-156.
- Fariss RN, Zong-Yi L, Milam AH (2000). Abnormalities in rod photoreceptors, amacrine cells, and horizontal cells with Retinitis pigmentosa. *Am. J. Ophthalmol.*, **129**, 215-223.
- Felsenstein J (1993). *PHYLIP - phylogeny inference package*. University of Washington, Seattle.
- Field J, Xu HP, Michaelli T, Ballester R, Sass P, Wigler M, Colicelli J (1990). Mutations of the adenylyl cyclase gene blocks ras function in *Saccharomaces cerevisiae*. *Science*, **247**, 464-466.
- Finidori J, Friederich E, Kwiatkowski DJ, Louvard D (1992). In vivo analysis of functional domains from villin and gelsolin. *J. Cell Biol.*, **116**, 1145-1155.
- Fleischmann D, Denisevich M, Raveed D, Pannbacker RG (1980). Association of Guanylate cyclase with the axoneme of retinal rods. *Bichimica et Biophysica Acta*, **29257**, 176-186
- Fleischmann D (1981). Rod guanylate cyclase located in axonemes. *Curr. Top. Membr. Transp.* **15**, 109-119.
- Fong KSK und De Couet HG (1999). Novel proteins interacting with the leucine-rich repeat domain of human flightless-I identified by the yeast two-hybrid system. *Genomics*, **58**, 146-157.
- Grand RJA (1989). Acylation of viral and eukaryotic proteins. *Biochem. J.*, **258**, 625-638.
- Greenberg F, Lewis RA, Potocki I, Glaze D, Parke J, Killian J, Murphy MA, Williamson D, Brown F, Dutton R, McCluggage C, Friedman E, Sulek M, Lupski JR (1997). Multi-disciplinary clinical study of Smith Magenis Syndrome (deletion 17p11.2). *Am. J. Med. Gen.*, **62**, 247-254.
- GreinerJV, Weidman TA, Bodley HD, Greiner CAM (1981). Ciliogenesis in photoreceptor cells of the retina. *Exp. Eye Res.*, **33**, 433-446.
- Gordon-Weeks PR (1991). Evidence for microtubule capture by filipodial actin filaments in growth cones. *Neuroreport*, **2**, 573-576.
- Goshima M, Kariya K, Yamawaki-Kataoka Y, Okada T, Shibatohege M, Shima F, Kataoka T (1999). Characterization of a novel Ras-binding protein Ce-Fli-1 comprising leucine-rich

- repeats and gelsolin-like domains. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **257**, 111-116
- Grolig F (1998). Nuclear centering in *Spirogyra*: force integration by microfilaments along microtubules. *Planta*, **204**, 54-63.
- Grumann A, Schmitt A, Wolfrum U, Klumpp S (2000). Protein phosphatase type-1 associated with the ciliary axoneme of mammalian photoreceptor cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **Suppl. 50**, **Vol 79**, 36.
- Hall MO, Bok D, Bacharach ADE (1969). Biosynthesis and assembly of the rod outer segment membrane system. Formation and fate of visual pigment in the frog retina. *J. Mol. Biol.*, **45**, 297-406.
- Hallet MA, Delaat JL, Arikawa K, Schlamp CL, Kong F, Williams DS (1996). Distribution of guanylyl cyclase within photoreceptor outer segments. *J. Cell Sci.*, **109**, 1803-1812.
- Hasson T und Mooseker MS (1997). The growing family of myosin motors and their role in neurons and sensory cells. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **7**, 615-623.
- Harlow E und Lane D (1988). *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Hartwig JH und Kwiatkowski DJ (1991). Actin binding proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **3**, 87-97.
- Henriquez JP, Cross D, Vial C, Maccioni RB (1995). Subpopulation of tau interact with microtubules and actin filaments in various cell types. *Cell Biochem. Funct.*, **13**, 239-250.
- Hirokawa N (1998). Kinesin and Dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*, **279**, 519-526.
- Hollander BA, Liang M.-Y, Besharse, JC (1999). Linkage of a nucleolin-related protein and casein kinase II with the detergent stable photoreceptor cytoskeleton. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **43**, 114-127.
- Homyk T Jr und Sheppard DE (1977). Behavioural mutants of *Drosophila melanogaster*. I. Isolation and mapping of mutations with decrease flight ability. *Genetics*, **87**, 95-110.
- Horst CJ, Forestner DM, Besharse JC (1987). Cytoskeletal-membrane interactions: between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium. *The Journal of Cell Biology*, **Vol. 105**, (No. 6, Pt2), 2973-2987.
- Horst CJ, Johnson LV, Besharse JC (1990). Transmembrane assemblage of the photoreceptor connecting cilium and motile cilium transition zone contain a common immunologic epitope. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **17**, 329-344.
- Hong D.-H, Pawlyk BS, Shang J, Sandberg MA, Berson EL, Li T (2000). A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RGPR)- deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 3649-3654.
- Huber A, Sander P, Wolfrum U, Groell C, Gerdon G, Paulsen R (1996). Isolation of genes encoding photoreceptor-specific proteins by immunoscreening with antibodies against blowfly rhabdoms. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*. **35**, 69-76.
- Hunter DG, Fishman GA, Metha RS, Kretzer FL (1986). Abnormal sperm and photoreceptor axonemes in Usher's syndrome. *Arch. Ophthalmol.*, **104**, 385-389.
- Isenberg G und Niggli V (1998). Interaction of cytoskeletal proteins with membrane lipids. *Nt. Rev. Cytol.*, **178**, 73-125.
- Itano N und hatano S (1991). F-actin bundling protein from *Physarium polycephalum* - purification and its capacity for co-bundling of actin-filaments and microtubules. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **19**, 244-254.

- Kajamura N, Harada Y, Usukura J (2000). High-resolution freeze-etching replica images of the disk and the plasma membrane surfaces in purified bovine rod outer segments. *J. Electron Microscopy*, **49(5)**, 691-697.
- Kajava AV, Vassart G, Wodak SJ (1995): Modeling of the three dimensional structure of proteins with the typical leucine-rich repeats. *Structure*, **3**, 867-877.
- Kamada S, Kusano H, Fujita H, Ohtsu, M, Koya RC, Kuzumaki N, Tsujimoto Y (1998). A cloning method for caspase substrates that uses the yeast two hybrid system: cloning of the antiapoptotic gene gelsolin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 8532-8537.
- Kataoka T, Broek D, Wigler M (1985). DNA-Sequence and characterisation of the *S. cerevisiae* gene encoding adenylate cyclase. *Cell*, **43**, 493-505.
- Kauzmann W (1958). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* **14**, 1-63.
- Koanna T und Hotta Y (1978). Isolation and characterization of flightless mutants in *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. And Exp. Morphol.*, **45**, 123-143.
- Kobe B und Deisenhofer J (1993). Crystal structure of porcine ribonuclease inhibitor, a protein with leucine-rich repeats. *Nature*, **366**, 751-756.
- Kobe B und Deisenhofer J (1994). The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. *TIBS*, **19**, 415-421.
- Kobe B und Deisenhofer J (1995a). A structural basis of the interaction between leucine rich repeats and protein ligands. *Nature*, **374**, 183-186.
- Kobe B und Deisenhofer J (1995b). Proteins with leucine-rich repeats. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **5**, 409-416.
- Kolb GMH (1991). *Vergleichende Histologie. Cytologie und Mikroanatomie der Tiere.* Springer Verlag
- Körschen HG, Beyermann M, Müller F, Heck M, Vantler M, Koch KW, Kellner R, Wolfrum U, Bode C, Hofmann KP, Kaupp UB (1999). Interaction of glutamic-acid rich proteins with the cGMP signalling pathway in rod photoreceptors. *Nature*, **400**, 761-766.
- Kozak M (1991). Structural features in eukaryotic mRNA that modulate the initiation of translation. *J. Biol. Chem.* **266**, 19876-19880.
- Kozminski KG, Johnson KA, Forscher P, Rosenbaum JL (1993). A motility in the eukaryotic flagellum unrelated to flagellar beating. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 5519-5523.
- Kozminski KG Beech PL, Rosenbaum JL (1995). The *Chlamydomonas* kinsein-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J. Cell Biol.*, **131**, 1517-1527.
- Krstić RV (1988). *Die Gewebe des Menschen.* Springer Verlag.
- Kubota R, Noda S, Wang Y, Minoshima S, Asekaewa S, Kudoh J, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu N (1997). A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, **41**, 360-369.
- Kwiatkowski DJ, Janmey PA, Mole J, Yin HL (1985). Isolation and properties of two actin-binding domains in gelsolin. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15232-15238.
- Kwiatkowski DJ, Stossel TP, Orkin SH, Mole JE (1986). Plasma and cytoplasmic gelsolins are encoded by a single gene and contain a duplicated actin-binding domain. *Nature*, **323**, 455-458.
- Kwiatkowski DJ, Mehl R, Izumo S, Nadel-Ginard, B, Yin HL (1988). Muscle is the major source of plasma gelsolin. *J. Biol. Chem.*, **263**, 8239-8243.

- Kyte J und Doolittle RF (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.*, **157**, 105-132.
- Lauffenburger DA und Horwitz AF (1996). Cell migration: A physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.
- Lange BH, Gull K (1995). A molecular marker for centriole maturation in the mammalian cell cycle. *J. Cell. Biol.*, **130** (4), 919-927.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 682-685.
- Laoukili J, Perret E, Middendorp S, Houcine O, Guennou C, Marano, F, Bornens M, Tournier, F (2000). Differential expression and cellular distribution of centrin isoforms during human ciliated cell differentiation in vitro. *J. Cell Sci.* 2000, **113** (8), 1355-1364.
- Lauffenburger DA und Horwitz AF (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-369.
- Liebmann PA (1987). The molecular mechanism of visual excitation and its relation to the structure and composition of rod outer segment. *Annu. Rev. Physiol.*, **49**, 765-791.
- Liu K, Wenegieme EF, Lu P, Chen C, Yin HL (1997). Gelsolin binding to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate is modulated by calcium and pH. *J. Biol. Chem.* **272**, 20443-20450.
- Liu YT, Rozelle AL, Yin HL (1998). The gelsolin family of actin filament severers and cappers. In: *G proteins, Cytoskeleton and Cancer*. Edt: Kohama MHK, Austin TX; RG Landes Company, 19-35.
- Liu X, Udovichenko IP, Brown SD, Steel, KP, Williams DS (1999a). Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J. Neurosci.*, **19**, 6267-6274.
- Liu YT, Sun HQ, Yin HL (1999b). The flightless I (FL I) leucine-rich repeat binding partner FLAP, is a centrosome-associated protein. *Mol. Biol. Cell*, 10 (Abstract Book), Nr. 99, Abstract Nr. 114, 20a: Centrosomes and kinetochores.,
- Luna EJ und Hitt AL (1992). Cytoskeletal-membrane interactions. *Science*, **258**, 955-964.
- Lupas A (1997). Predicting coiled-coil regions in proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**, 388-393.
- Magee AI (1990). Lipid modification of proteins and its relevance to protein targeting. *J. Cell Sci.*, **97**, 581-584.
- Mangani NJ und Pepperberg DR (1988). Immunolocalization of 48k in rod photoreceptors. *IOVS*, **29**, 1221-1234.
- Mangini und Garner (1991). Arrestin is a PEST protein. *Invest. Ophthalmol., Vis. Sci.*, **32**, 1150.
- Marino M, Braun L, Cossart P, Ghosh P (2000). A framework for interpreting the leucine-rich repeats of the *Listeria* internalins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**(16), 8784-8788.
- Marks PW, Arai M, Bandura JL, Kwiatkowski DJ (1998). Advillin (p92): a new member of the gelsolin/villin superfamily of actin regulatory proteins. *J. Cell Sci.*, **111**, 2129-2136.
- Marra MA, Hillier L, Waterston RH (1998). Expressed sequence tags - ESTablishing bridges between genomes. *Trends Genet.*, **14**, 4-7.(1998).
- Marshall RD (1972). Glycoproteins. *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 673-702.
- Marszalek JR, Liu X, Roberts EA, Chui D, Marth JD, Williams DS, Goldstein LSB (2000). Genetic evidence for selective transport of opsin and arrestin by kinesin -II in mammalian photoreceptors. *Cell*, **102**, 172-187.
- Marszalek JR und Goldstein LSB (2000). Understanding the functions of kinesin-II. *Biochim. Biophys Acta*, **1496**, 6267-6274.

- Matesic DF, Philip NJ, Marray JM, Liebman PA (1992). Tubulin in bovine rod outer segments. *J. Cell Sci.*, **103**, 157-166.
- Matsuo T, Takahas E, Yamamoto D (1999). The canoe protein is necessary in adherens junctions for development of ommatidial architecture in the drosophila compound eye. *Cell Tiss. Res.* **298** (3), 397-404.
- Matsusaka T (1974). Membrane particles of the connecting cilium. *J. Ultrastruct. Res.* **48**, 305-312.
- Matsusaka T (1976). Cytoplasmic fibrils of the connecting cilium. *J. Ultrastruct. Res.*, **54**, 318-324.
- McGough A (1998). Actin binding proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **8**(2), 166-176.
- McGough A, Chiu W, Way A (1998). Determination of the gelsolin binding site on F-actin. Implications for severing and capping. *Biophys. J.*, **74**, 764-772.
- McLaughlin PJ, Gooch JT, Mannherz H.-G, Weeds AG (1993). Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature*, **364**, 685-692.
- Meerschaert K, De Corte V, De Ville Y, Vandekerkhove J (1998). Gelsolin and functionally similar actin-binding proteins are regulated by lysophosphatic acid. *EMBO J.*, **17**(20), 5923-5932.
- Menco BP (1984). Ciliated and microvillous structures of rat olfactory and nasal respiratory epithelia. A study using ultra-rapid cryo-fixation followed by freeze-substitution or freeze-etching. *Cell Tissue Res*, **235**(2), 225-41
- Miklos G und de Couet G (1990). The mutations previously designated as Flightless-I³, Flightless-I⁰ and STANDBY are members of the W-2 lethal complementation group at the base of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* **6**, 133-151.
- Mitchinson TJ und Cramer LP (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, 1996, **84**, 371-379.
- Molday SM (1998): Photoreceptor membrane proteins, phototransduction, and retinal diseases. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **39**, 2493-25143.
- Morrison EE, Wardleworth JM, Askham JM, Markham AF, Meredith DM (1998) EB1, a protein which interacts with the APC-tumor suppressor, is associated with microtubule cytoskeleton throuout the cell cycle. *Oncogene*, **17**, 3417-3477.
- Muresan V, Joshi HC, Besharse JC (1993). γ -tubulin in differentiated cell types: localization in the vicinity of basal bodies in retinal photoreceptors and ciliated epithelia. *J. Cell Sci.*, **104**, 1229-1237.
- Muresan V und Besharse JC (1994). Complex intermolecular interactions maintain a stable linkage between the photoreceptor connecting cilium axoneme and plasma membrane. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **28**, 213-230.
- Muresan V, Bendala-Tufanisco E, Hollander BA, besharse JC (1997). Evidence for kinesin-related proteins with the axoneme of retinal photoreceptors. *Exp. Eye. Res.*, **64**, 895-903.
- Nakamura S, Sakurai T, Nonomura Y (1994). Differential Expression of bovine adseverin in adrenal gland revealed by in situ hybridisation. *J.Biol. Chem.*, **269**, 5890-5896.
- Nir I, Sagie G, Papermaster DS (1987). Opsin accumulation in photoreceptor inner segment plasma membranes of dystrophic RCS rats. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **28**, 62-69. 1987
- Noda KR, Wang Y, Minoshima S, Asakawa S, Kudoh J, Mashima Y, Oguchi Y, Shimizu, N (1997). A novel myosin-like protein (myocilin) expressed in the connecting cilium of the

- photoreceptor: molecular cloning, tissue expression, and chromosomal mapping. *Genomics*, **41** (3), 360-369.
- Obata S und Usukura J (1992). Morphogenesis of the photoreceptor outer segment during postnatal development in the mouse (BALB/c) retina. *Cell Tiss. Res.*, **269**, 39-48.
- Obin MS, Jahngen-Hodge J, Novell T, Taylor A (1996). Ubiquitinylation and ubiquitin-dependent proteolysis in vertebrate photoreceptors (and rod outer segments). *J. Biol. Chem.*, **271**, 14473-14484.
- Orloff GJ, Allen PG, Miklos GLG, Campbell HD, Kwiatkowski DJ (1995). Human flightless-I has actin binding ability. *Mol. Biol. Cell*, **6** (S), 139a.
- Orozco JT, Wedaman KP, Signor D, Brown H, Rose L, Scholey JM (1999). Movement of motor and cargo along cilia. *Nature*, **398**, 674.
- Pagh-Roehl K, Wang E, Burnside B (1991). Posttranslational modification of tubulin in teleost photoreceptor cytoskeletons. *Cell Mol. Neurobiol.*, **11**, 593-610.
- Pagh-Roehl K und Burnside B (1995). Preparation of teleost rod inner and outer segments. In: *Cilia and Flagella*, Edt. Dentler W und Witban GB, Academic Press, Kapitel 13.
- Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M (1996). Most of centrin is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *Journal of Cell Science*, **109**, 3089-3102.
- Papermaster DS und Dreyer WJ (1974). Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry*, **13**(11), 2438-2444.
- Paunino T, Kangas H, Kiuru S, Palo J, Syvanen AC (1997). Tissue distribution and levels of gelsolin-mRNA in normal individuals and patients with gelsolin-related amyloidosis. *FEBS Lett.*, **406**, 49-55.
- Pazman C, Mayes CA, Fanto M, Hayes SR, Mlodzik M (2000). Rasputin, the *Drosophila* homologue of the RasGAP SH3 binding protein, functions in Ras- and Rho-mediated signaling. *Development*, **127** (8), 1715-1725.
- Pazour GJ, Dickert BL, Vucica Y, Seely ES, Rosenbaum JL, Witman GB, Cole DG (2000). *Chlamydomonas* IFT88 and its mouse homologue, polycystic kidney disease gene Tg737, are required for assembly of cilia and flagella. *J. Cell Biol.*, **151**, 709-718.
- Penn JS und Williams TP (1986). Photostasis regulation of daily photon catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Exp. Eye Res.*, **44**, 915-928.
- Pearson WR und Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *PNAS*. **85**, 2444-2448.
- Pendergast GC und Ziff EB (1991) Mbh1: a novel gelsolin/severin related protein which binds actin *in vitro* and exhibits nuclear localization *in vivo*. *EMBO J.*, **10**, 757-766.
- Perrimon N, Smouse D, Miklos GLG (1989). Developmental genetics of loci at the base of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **121**, 313-331.
- Pestonjamasp KN, Pope RK, Wulfschuh JD, Luna EJ (1997). Supervillin (p205): a novel membrane-associated F-actin binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J. Cell Biol.*, **139**, 1255-1269.
- Philip NJ, Chang W, Long K (1987). Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEBS Lett.*, **225**, 127-132.
- Piperno G und Luck DJL (1979). An actin-like protein is a component of axonemes from *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.*, **254**, 2187-2190.

- Pless DD und Lennarz WJ (1977). Enzymatic conversion of proteins to glycoproteins. Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. **74**, 134-138.
- Pollard TD, Cooper JA (1986). Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Annu. Rev. Biochem., **55**, 987-1035.
- Pope B, Maciver S, Weeds A (1995). Localization of calcium sensitive actin monomer binding site in gelsolin to segment 4 and identification of calcium binding sites. Biochemistry, **34**, 1583-1588.
- Reed R und Maniatis T (1985). Intron sequences involved in lariat formation during pre-mRNA splicing. Cell,**41**, 95-105.
- Reed R und Maniatis T (1986). A role for exon sequences and splice-site proximity in splice site selection. Cell, 46, 681-690.
- Reed AL, Yamazaki H, Kaufman JD, Rubinstein Y, Murphy B, Johnson AC (1998). Molecular cloning and characterization of a transcription regulator with homology to GC-binding factor.J. Biol. Chem., **273**, 21594-21602.
- Remé CE, Wolfrum U, Imsand C, Hafezi F, Williams TP (1999). Photoreceptor autophagy: Effects of light history on number and opsin content of degradativ vacuoles. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., **40(10)**, 2398-2404.
- Roberts TM und King KL (1991). Centripetal flow and directed assembly of the major sperm protein (MSP) Cytoskeleton in the amoeboid sperm of the nematode *Ascaris suum*. Cell Motil. Cytoskelet., **20**, 228-241.
- Roberts TM und Stewart M (1997). Nematode sperm: amoeboid movement without actin. Trends Cell Biol., **7**, 368-373.
- Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S (1999). Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. Science, **286(5446)**, 1939-42.
- Röhlich P (1975). The sensory cilium of retinal rods is analogous to the transitional zone of motile cilia. Cell. Tiss. Res., **161**, 421-430.
- Roof DJ (1986). Turnover of vertebrate photoreceptor membranes. In: Stieve H (Eds.). The molecular mechanisms of photoreception. Berlin, Springer Verlag, 287-302.
- Rosenbaum JL, Cole DG, Diener DR (1999). Intraflagellar transport: the eyes have it. J. Cell Biol. **144**, 385-388.
- Sambrook RJ, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring
- Sanger F, Nicklen S, Coulsen A (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **87**, 1003-1007.
- Sale WS, Besharse JC, Piperno, G (1987). Distribution of acetylated alpha-tubulin in retina and in vitro-assembled microtubules. Cell Motility and the cytoskeleton, **9**, 243-253.
- Salisbury JL (1978). Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green algae. Science, **202**, 975-976.
- Salisbury JL, Sanders MA, Hapst I (1987). Flagellar root contraction and nuclear movement during flagellar regeneration of *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol, **105**, 1799-1805.
- Salisbury JL (1989). The algal flagellar apparatus. In: Algae as Experimental Systems. Alan R Liss Inc., 19-39.
- Salisbury JL (1995). Centrin, Centrosomes and mitotic spindle poles. Curr. Opin. Cell. Biol., **7**, 39-45.

- Schafer DA, Hug C, Cooper JA (1995). Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments. *J. Cell Biol.*, **128**(1-2), 61-70.
- Schmidt A und Hall MN (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Dev. Biol.*, **14**, 305-338.
- Schrem A, Lange C, Beyermann M, Koch KW (1999). Identification of a domain in guanylyl cyclase activating protein 1 that interacts with a complex of guanylyl cyclase and tubulin in photoreceptors. *J. Biol. Chem.*, **274**, 6244-6249.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP (1998). SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 5857-5864.
- Schultz J, Copeley RR, Doerks T, Ponting CP, Bork P (2000). SMART: A web-based tool for the study of geetically mobile domains. *Nucleic Acid Res.*, **28**, 231-234.
- Schremser JL und Williams TP (1995a). Rod outer segment renewal as a mechanism for adaptation to a new Intensits enviroment, I: rhodopsin levels and ROS length. *Exp. Eye Res.*, **61**, 17-24.
- Schremser JL und Williams TP (1995a). Rod outer segment renewal as a mechanism for adaptation to a new Intensits enviroment, II: Rhodopsin synthesis and packing density. *Exp. Eye Res.*, **61**, 25-32.
- Schwartz K, Richards K, Botstein D (1997). BIM1 encodes a microtubule-binding protin in Yeast. *Mol. Biol. Cell*, **8**, 2677-2691.
- Schneider BG, und Craig E (1990). Na⁺, K⁺-ATPase of the photoreceptor: selective expression of a₃ and b₂ isoforms. *Exp. Eye Res.*, **51**, 553-564.
- Seranski P, Heiss NS, Dhorne-Pollet S, Radelof U, Korn B, Hennig S, Backes E, Schmidt S, Wiemann S, Schwarz CE, Lehrach H Poustka A (1999). Transcription mapping in a medulloblastoma breakpoint interval and Smith Magenis Syndrome cadidate region: identification of 53 transcriptional units and new candidate genes. *Genomics*, **56**, 1-11.
- Sherman YM und Goldberg AL (1992). Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in Escherichia coli. *EMBO J.*, **11**, 71.
- Signor D, Wedaman KP, Orozco JT, Dwyer ND, Bargmann CI, Rose LS, Scholey JM (1999). Role of a class DHC1b Dynein in retrograde transport of IFT motors ans IFT raft particles along cilia, but not dendrites, in chemosensory neurons of living *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.*, **147**, 519-530.
- Sjöstrand FS (1959). Fine structure of cytoplasm: The organisation of membranous layers. *Rev. Mod. Phys.*, **31**, 301-318.
- Small JV, Rottner K, Kaverina KI, Anderson KI (1998). Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1404**, 271-281.
- Smith ACM, McGravan L, Robinson J, Waldstein G, Macfarlane J, Zonana J, Reiss J, Lahr M, Allen L, Magenis E (1986). Interstitial deletion of (17)(p11.2p11.2) in nine patients. *Am. J. Med. Genet.*, **24**, 393-414.
- Soto-Prior A., Lavigne-Rebillard M., Lenoir M, Ripoll C., Rebillard G., Vago P, Pujol R., Hamel CP (1997). Identificaton of preferentially expressed cochlear genes by systematic sequencing of rat cochlea cDNA libray. *Mol. Brain Res.*, **47**, 1-10.
- Spencer M, Detwiler, PB, Bunt-Milam, AH (1988). Distribution of membrane proteins in mechanical dissociated retinal rods. *IOVS*, **29**, 1012-1020.
- Steinberg RH, Fischer SK, Anderson DH (1980). Disc morphogenesis in vertebrate photoreceptors. *J. Comp. Neurol.*, **190**, 501-518.

- Stiles WS und Crawford BH (1933). The luminous efficiency of rays entering the eye pupil at different points. Proc. R. Soc. Lond. B, **112**, 428-450.
- Stiles WS (1939). The directional sensitivity of the retina and the spectral sensitivities of rods and cones. Proc. R. Soc. Lond. B, **127**, 64-105.
- Stossel TP (1993). On the crawling of animal cells. Science, **260**, 1086-21094.
- Straub KL, Stella MC, Leptin M (1996). The gelsolin-related *flightless I* protein is required for actin distribution during cellularization in *Drosophila*. J. Cell Sci. **109**, 263-270.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). APC binds to the novel Protein EB1. Cancer Res., **55**, 2972-2977.
- Sun HQ, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL (1999). Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. J. Biol. Chem., **274**, 33179-33182.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW (1995). APC binds to the novel protein EB1. Cancer Res., **55**, 2972-2977.
- Suzuki N, Choe HR, Nishida Y, Yamawaki-Kataoka Y, Ohnishi S, Tamaoki Y, Kataoka T (1990). Leucine rich repeats and the carboxy terminus are required for interaction of yeast adenylate cyclase with Ras proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **87**, 8711-8715.
- Swanson DA, Freund CL, Steel JM, Xu S, Ploder L, McInnes RR, Valle D (1997). A differential hybridisation scheme to identify photoreceptor-specific genes. Genome Res., **7**, 513-521.
- Tai AW, Cuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH (1999). Rhodopsin carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein via its light chain, Tectex-1. Cell, **97**, 877-887.
- Tiernauer JS, O'Toole E, Berrueta L, Bierer B, Pellman D (1999). Yeast Bim1p promotes the G1-specific dynamics of microtubules. J. Cell Sci., **115**, 993-1007.
- Tiernauer JS und Bierer BE (2000). EB1 proteins regulate microtubule-dynamics, cell polarity and chromosome stability. J. Cell Biol., **149**, 761-766.
- Tokuyasu K und Yamada E (1959). The fine structure of the retina studied with the electron microscope. IV. Morphogenesis of outer segments of retinal rods. J. Biophys. Biochem. Cytol., **6**, 225-230.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res., **22**, 4673-4680.
- Towler DA, Gordon JJ, Adams SP, Glaser L (1988). The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. Annu. Rev. Biochem., **57**, 69-99
- Travis GH (1998). Mechanisms of cell death in the inherited retinal degenerations. Am. J. Hum. Genet., **62**, 503-508.
- Troutt LL, Wang E, Pagh-Roehl K, Burnside B (1990). Microtubules nucleation and organization in teleost photoreceptors: microtubule recovery after elimination by cold. J. Neurocytol., **19**, 213-233.
- Tsuda T und Cutler ML (1993). Human rsu-1 is highly homologous to mouse rsu-1 and localizes to human chromosome 10. Genomics, **18**, 461-462.
- Usher CH (1913/14). On the inheritance of Retinitis pigmentosa, with notes of cases. R. Lond. Ophthalmol. Hosp. Rep. **19**, 130-236.
- Usukura J und Obata S (1995). Morphogenesis of photoreceptor outer segments in retinal development. Prog. Retin. Eye Res., **15**, 113-125.

- Uzawa M, Grams J, Madden B, Toft D, Salisbury JL (1995). Identification of a complex between centrin and heat shock proteins in CSF-arrested *Xenopus* oocytes and dissociation of the complex following oocyte activation. *Developmental Biology*, **171**, 51-59.
- Valentino KL, Winter J, Reichard LF (1985). Application of monoclonal antibodies to neuroscience research. *Ann. Rev. Neurosci.*, **8**, 483-488.
- Vandekerckhove JS (1990). Actin binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **2**, 41-50.
- Vaughan DK und Fischer SK (1987). The distribution of F-actin in cells isolated from vertebrate retinas. *Exp. Eye Res.* **44**, 393-406.
- Vaughan KT, Tynan SH, Faulkner NE, Echeverri CJ, Vale RB (1990). Colocalization of cytoplasmic dynein with dynactin and CLIP-70 at microtubule distal ends. *J. Cell Sci.*, **112**, 1437-1447.
- Way M und Weeds AG (1988). Nucleotide sequence of pig plasma gelsolin: comparison of protein sequence with human gelsolin and other actin-severin proteins show strong homologies and evidence for large internal repeats. *J. Mol. Biol.* **203**, 1127-1133.
- Way M, Pope B, Weeds, AG (1992a). Are conserved sequences in segment 1 of gelsolin important for binding actin? **116**, 1135-1143.
- Way M, Pope B, Weeds, AG (1992b). Evidence for functional homology in the F-actin binding domains of gelsolin and α -actinin: implications for the requirements of severing and capping. *J. Cell. Biol.*, **119**, 835-842-
- Weeds A und Maciver S (1993). F-capping protein. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **5**, 63-69.
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Leveilliers J, Weston MD, Kelley PM, Kimberling WJ, Waagenar M, Levi-Acobas F, Larget-Piet D, Munnich A, Steel KP, Brown SDM, Petit C (1995). Deletive Myosin VIIa gene responsible for Usher syndrome 1B. *Nature*, **374**, 60-61.
- Whelan JP and McGinnis JF (1988): Light-dependent subcellular movement of photoreceptor proteins. *J. Neurosci. Res.*, **20**, 263-270.
- Whitehead JL, Wang SY, Bost UL, Hoang E, Frazer KA, Burnside B (1999). Photoreceptor localization of the KIF3A and KIF3B subunits of the heterotrimeric microtubule motor kinesin II in vertebrate retina. *Exp. Cell Res.*, **69**, 491-503.
- Williams DS, Linberg KA, Vaughan DK, Fariss RN, Fisher SK (1988). Disruption of microfilament organization and deregulation of disk membrane morphogenesis by cytochalasin D in rod and cone photoreceptors. *J. Comp. Neurol.* **272**, 161-176.
- Williams DS, Hallett MA, Arikawa K (1992). Association of myosin with the connecting cilium of rod photoreceptors. *Journal of Cell Science*, **103**, 183-190.
- Williams TP (1998). Light history and photostasis. What is a „normal“ rat retina? In: Williams TP, Thistle AB eds., *Photostasis and related phenomena*. New York Plenum Press; 17-32.
- Wilson SA, Brown EC, Kingsman AJ, Kingsman SM (1998). TRIP: A novel double stranded RNA binding protein which interacts with the leucine rich repeat of flightless I. *Nuc. A. Res.*, **26 (15)**, 3460-3467.
- Wilson PJ und Forer A (1997). Effects of nanomolar taxol on Crane-Fly spermatocyte spindles indicate that acetylation of kinetochore microtubules can be used as a marker of poleward tubulin flux. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **37**, 20-32.
- Witman GB (1990). Introduction to cilia and flagella. In: Bloodgood RA 8Eds): *Ciliary and flagellar membranes*. Plenum Publishing Dcoorporation, 1-30.

- Wolfrum U (1995). Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinae. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **32**, 55-64.
- Wolfrum U und Salisbury JL (1998). Expression of centrin isoforms in the mammalian retina. *Experimental Cell Research*, **242**, 10-17.
- Wolfrum U, Liu X, Schmitt A, Udovichenko IP, Williams DS (1998). Myosin VIIa as a common component of cilia and microvilli. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **40**, 261-271.
- Wolfrum U und Schmitt A (1999). Evidence for myosin VIIa driven rhodopsin transport in the plasma membrane of the photoreceptor connecting cilium. In: Hollyfield JG, Andersson RE, LaVail M (eds.), *Retinal degeneration diseases and experimental therapy*. Plenum Press, New York, pp 3-14.
- Wolfrum U und Schmitt A (2000). Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil. Cyto.*, **46**, 95-107.
- Woodford BJ und Blanks JC (1989). Localization of actin and tubulin in developing and adult mammalian photoreceptors. *Cell Tiss. Res.*, **256**, 495-505.
- Yin HL und Stossel TP (1979). Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature*, **281**, 583-586.
- Yin HL, Zaner KS, Stossel TP (1980a). Ca²⁺ control of actin gelation. Interaction of gelsolin with actin filaments and regulation of actin gelation. *J. Biol. Chem.*, **255**, 9494-9500.
- Yin HL, Hartwig JH, Maruyama K, Stossel TP (1980b). Ca²⁺ control of actin filament length. Effects of macrophage gelsolin on actin polymerization. *J. Biol. Chem.*, **256(18)**, 9693-7.
- Yin HL, Iida K, Janmey PA (1988). Identification of a polyphosphoinositide-modulated domain in gelsolin which binds to the sides of actin filaments. *J. Cell Biol.*, **106(3)**, 805-12.
- Yin HP und Stull JT (1999). Proteins that regulate dynamic actin remodeling in response to membrane signaling minireview series. *J. Biol. Chem.*, **274**, 32529-32530.
- Young RW (1967). The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J. Cell Biol.*, **33**, 3-17.
- Young RW und Droz B (1968). The renewal of protein in retinal rods and cones. *J. Cell Biol.*, **39**, 169-184.
- Young RW und Bok D (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J. Cell Biol.*, **42**, 392-403.
- Young (1976). Visual cells and the concept of renewal. *Invest. Ophthalmol.*, **15**, 700-725.
- Yu FX, Sun HQ, Janmey PA, Yin HL (1992). Identification of a polyphosphoinositide-binding sequence in an actin monomer-binding domain of gelsolin. *J. Biol. Chem.* **267**, 14616-14621.
- Zimmermann WF und Godchaux III W (1982). Preparation and characterization of sealed bovine rod cell outer segments. *Methods in Enzymology*, **81**, 52-57.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin 5´-triphosphat
AX4	Anti-Axonema-Antiserum 4
BB	Basalkörper
BCA	4,4´-Dicarboxy-2,2´ Biquinolinsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl Phosphat
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
CaCl ₂	Calciumchlorid
C	Centrosom
CC	”connecting cilium”, Verbindungscilium
Ce Flip	<i>C. elegans</i> Flightless Protein
Ce	<i>C. elegans</i>
CW	”ciliary rootlet”: Cilienwurzel
CTP	Cytidin 5´-Triphosphat
CuSO ₄	Kupfersulfat
cDNA	zur RNA komplementäre DNA
DAPI	4,6-Diamodino-2-prenylindol
dNTP	2-Desoxy-Nukleosid-5´-Triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMP	Dimethylaminomethylphenol
DTT	Dithiothreitol
DMSO	Dimethylsuloxid
DNA	Didesoxynukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
DIG	Digoxigenin
Dm Flip	<i>Drosophila melanogaster</i> Flightless Protein
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
EB1	end binding protein 1
EB2	end binding protein 2
ECL	”enhanced chemi-luminescence”
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EBSS	Earles Balanced Salt Solution
Fa	Firma
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung: 9,81m/s ²
GTP	Guanosintriphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GSH	Glutathion S-´
GTP	Guanosintriphosphat
HCl	Salzsäure
Hs Flip	Human Flightless Protein
Hs	<i>Homo sapiens</i>
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
IS	Innensegment
kb	kilobasen
kDa	kilo-Dalton
KCl	Kaliumhydrochlorid

KH ₂ PO ₄	Kalium-Dihydrogenphosphat
M	Mol
mM	Millimol
mA	Milliampere
mAb	monokloner Antikörper
MB	Megabasen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
mRNA	"messenger" RNA
Mm Flip	<i>Mus musculus</i> Flightless Protein
Mm	<i>Mus musculus</i>
NaCl	Natriumhydrochlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaF	Natriumfluorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxyd
NBT	2,2-Di-p-nitrophenyl 5,5'-diphenyl-3,3-[3,3'-dimethoxy-4,4'-diphenyl-ditetrazoliumchlorid]
NFDM	"non fat dry milk"
N	Nukleus
dNTP	Nukleinsäuretriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleinsäuretriphosphat
NP-40	Nonided P40; Octyphenoxy-Polyethoxy-Ethanol
OD	Optische Dichte
OS	Außensegment
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-Fluorid
PRC	"photoreceptor cells", Photorezeptorzellen
RT	Reverse Transkriptase
Rn Flip	<i>Rattus norvegicus</i> Flightless Protein
Rn	<i>Rattus norvegicus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RPE	retinales Pigmentepithel
SDS	Sodiumdodecylsulfate (Natriumdodecylsulfate)
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ST	"synaptic terminal"; Synapsenregion
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TBS	Tris buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)
UTP	Uridin 5'-Triphosphat
UV	Ultraviolet
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
ZnCl ₂	Zinkchlorid

8.2 Liste von EST's, die bei verschiedenen Organisationen bezogen wurden

Kürzel	Name	Organisation	Infos
840	Mncb-0840	National Institute of Infectious Diseases Japan	<i>Mus musculus</i> EST, der homolog ist zu Hs <i>flightless</i> gen, über DraII/DraIII in den Vektor pME18S-FL3 kloniert, umfaßt ca. 4,1 kb
827	Mncb-0827	National Institute of Infectious Diseases Japan	<i>Mus musculus</i> EST, der homolog ist zu Hs <i>flightless</i> gen, über DraII/DraIII in den Vektor pME18S-FL3 kloniert, umfaßt ca. 4,1 kb
390479	390479	Image Konsortium	Mouse EST, der homolog ist zum 5'-Bereich von Hs <i>flightless</i> -Gen. Über die Restriktionsschnittstellen NotI und EcoRI in den Vektor pT7T3D-Pac (Pharmacia) kloniert.
1278			kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/XhoI
1285			kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/XhoI
14			kloniert über die Restriktionsschnittstellen EcoRI/XhoI
2738-E20	1093627		kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/NotI
3140-H15	1248062		kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/NotI
3140-D15	1247966		kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/NotI
3177-D14	1262173		kloniert über die Restriktionsschnittstellen Eco RI/XhoI

8.3 Genebank-Acession-Nummern der LRR-Domain-Proteine

Kürzel	Name	Organismus	Genebank	PCGENE
Dmchao	chaoptin	<i>D. melanogaster</i>	M19013	Dmchaop
Dmtartan	tartan	<i>D. melanogaster</i>	U02078	Dmtar
Dmtoll	toll	<i>D. melanogaster</i>	M19969	Dmtollp
Hsbgs	human bone small	<i>H. sapiens</i>	J04599	Hsbgip
Hsfib	fibromodulin	<i>H. sapiens</i>	X72913	Hsfibp
Hrsu-1	rsu-1	<i>H. sapiens</i>	L12535	Phrsp1
Hsomp	oligodendrocyte-myelin glycoprotein	<i>H. sapiens</i>	X51694	Hsomp
Hspg1b	patelet glycoprotein 1b alpha chain	<i>H. sapiens</i>	J02940	Hsplgp
Hsrai	ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI)	<i>H. sapiens</i>	M36717	Hsrai
Hslum	Lumican precursor (LUM) Keratan sulfate Proteoglycan)	<i>H. sapiens</i>	P51884	Hslum
hsilgf	insulin-like growth factor binding protein complex acid labile precursor	<i>H. sapiens</i>	P35858	Hsilgf
Hsgarp	Garp protein precursor (Garpin)	<i>H. sapiens</i>	Q14392	Hsgarp
Hsa2gp	Leucine rich alpha-2-Glycoprotein (LRG)	<i>H. sapiens</i>	P02750 S45673	Hsa2gp
Hscar	Carboxypeptidase N 83 kDa chain	<i>H. sapiens</i>	P22792	Hscar
Hscpn	carboxypeptidase CP-N	<i>H. sapiens</i>	J05158	Phscp
Hscsp	chondiotin sulfate proteoglycan II	<i>H. sapiens</i>	M14219	
Hspgp	platetet glycoprotein 1b	<i>H. sapiens</i>	J02940	Hsplgp

Hsgly	platelet glycoprotein V precursor(GPV) (CD42D)	<i>H. sapiens</i>	P40197	Hsgly
Mmrsp-1	rsp-1	<i>M. musculus</i>	X63039	Pmmrsp1
Mmgly	platelet glycoprotein V precursor (GPV) (CD42P)	<i>M. musculus</i>	O08742	Mmglyp
Rnilgf	insulin-like growth factor binding protein complex acid labile precursor	<i>R. norvegicus</i>	P35859	Rnilgf
Rngly	platelet glycoprotein V precursor(GPV)	<i>R. norvegicus</i>	O08770	Rngly
SsRnaseI	ribonuclease inhibitor, Rnase-I	<i>S. scruofa</i>	PIR A31857	
Blrp	leucine-rich glycoprotein	<i>B. taurus</i>	S45673	Blrpp
YR71	Hypothetical 118.2 kD Protein F43C1.1 in Chromosome III.	<i>C. elegans</i>	Q09564	YR71
Yds22	Yspsds22 (mitotic transition protein)	<i>S. pombe</i>	M57495	Yds22p
ACSP	Adenylat Cyclase (ATP Pyrophosphat-Lyase)	<i>S. pombe</i>	P14605	Spac
scereac	Adenylatcyclase	<i>S. cerevisiae</i>	M12057	Pscercc
scad	Alkoholdehadrogenase	<i>S. cerevisiae</i>	S50459	Scad
Scad	glucose repressible alcohol dehydrogenase	<i>S. cerevisiae</i>	P31384	Grad
scccr4	CCR4 protein	<i>S. cerevisiae</i>	S50459	Pscercc/S cac2
Scac	Adenylate cyclase(ATP Pyrophosphatase Lyase)	<i>S. cerevisiae</i>	P08678	
skac	Adenylatcyclase	<i>S. kluyvieri</i>	X56042/ P23466	Pscereac
athrlpk	receptor-like protein kinase	<i>A. thaliana</i>	M84660	atrlk / Pathapk
rlk5	Receptor-like protein kinase precursor	<i>A. thaliana</i>	P47735	atrlk
GRL101	G-protein coupled receptor precursor	<i>L. stagnalis</i>	P46023	Grl101
llglrr	insulin-like growth factor binding protein complex acid labile precursor	<i>Papio hamadryas</i>	O02833	Philgf
Paac	Adenylate cyclase(ATP Pyrophosphatase Lyase)	<i>P. anserina</i>	Q01513	Paac
Ncac	Adenylate cyclase(ATP Pyrophosphatase Lyase)	<i>N. crassa</i>	Q01631	Ncac
Umac	Adenylate cyclase(ATP Pyrophosphatase Lyase)	<i>U. maydis</i>	P49606	Umac

8.4 Genebank-Acession-Nummern der Vertreter der Gelsolin/Villin-Familie

Kürzel	Name	Organismus	Genebank	PCGENE
Hsflip	Human Homolog of <i>Drosophila</i> flightless I	<i>H. sapiens</i>	U01184	Hsfl/Hsfli
HscapG	Macrophage capping Protein G	<i>H. sapiens</i>	NM004930	Hscapg
HsMcp	macrophage capping protein	<i>H. sapiens</i>	M94345	Hscap
Hsgelol	Gelsolin	<i>H. sapiens</i>	X04412	Hsgel/Hsgel2
Hsvil	Villin	<i>H. sapiens</i>	X12901	Hsvil/Phsvil
HscapZ1	capping protein	<i>H. sapiens</i>	M94345	Hscapz1
Hscap	capping protein	<i>H. sapiens</i>	M94346	Hscap

Hssvil	Supervillin	<i>H. sapiens</i>	NM003174	Hssvil
HsMcp	macrophage capping protein	<i>H. sapiens</i>	M94345	HscapG
Mmgelsol	Gelsolin	<i>M. musculus</i>	J04953	Mmgel/Mmgel 2
Mmadsev	Adseverin	<i>M. musculus</i>	U04354	Mmadsev
Mmvil	Villin	<i>M. musculus</i>	M98454	Mmvil
Mmssvil	Supervillin	<i>M. musculus</i>	O60611	Mmssvil
MmMbh1	Mbh1	<i>M. musculus</i>	X54511	Mmbgh1
MmgCap39	gCap39	<i>M. musculus</i>	NM_007599	MmcapG
Rnflip	<i>R. norvegicus</i> flightless	<i>R. norvegicus</i>	-	Rnflii/Rnfli2
SsGelsol	Gelsolin	<i>S. scruofa</i>	M36927	Ssgel
Dmflip	<i>Drosophila melanogaster</i> flightless I	<i>D. melanogaster</i>	U00182 U28044	Dmfli/Pdmfli
Dmquail	<i>Drosophila</i> villin-like protein	<i>D. melanogaster</i>	U10070	quail
Dmelsol	Gelsolin	<i>D. melanogaster</i>	L08794	Dmgel
Ceflip	Ce-Fli-1: <i>C. elegans</i> flightless	<i>C. elegans</i>	U01183	Cefli/Pcefli
Ddpvil	Protovillin	<i>D. discoideum</i>	X74387	Ddpv/Ddvil
Ddsever	Severin	<i>D. discoideum</i>	PIR A28517	Ddsever/Ddse v
Ppfrag	Fragmin	<i>P. polycephalum</i>	PIR S06287	Ppfrag/Ppfrag p
Ecgalsol	Gelsolin	<i>E. caballus</i>	U31699	Ecge l
Gggeslol	Gelsolin	<i>G. gallus</i>	AW355519	Ch vil
Xlgelsol	Gelsolin	<i>X. laevis</i>	BE680706	Xlgel
HacGel	Gelsolin	<i>H. americanus</i>	Z29534	Hacgel/Phacge l
Ggvil	Villin	<i>G. gallus</i>	J03781	Ggvil

8.5 Liste der Proteinmotive von Mmflip mit Angabe der Position und Sequenz

Nr.	Name	Anzahl	Position	Sequenz	Übereinstimmung
1	N-Glycosylation site	7	41-44	rwkl N rtglc	5.138e-03
2			133-136	nmlvl N lshng	
3			149-152	nqlfi N ltdll	
4			224-228	legls N lsdvd	
5			252-256	slrrl N lssnq	
6			275-279	hletl N gsalc	
7			1064-1066	yqirt N gsalc	
8	Tyrosine sulfation site	4	600	dndis Y ieggt	
9			946	wvpve Y eeeek	
10			1154	gaqkp Y dddae	
11			1160	dddae Y mkhts	
12	cAMP- und cGMP-abhängige Proteinkinase	4	436-437	rrrkd S aqdvq	1.572e-03

	Phosphorylierungss telle				
13			864-867	kvkrd T rlektdq	
14			915-918	egrkf T rlpee	
15			1046-1050	gkrkv T qgtlq	
16	Protein Kinase C phosphorylierungss telle	14	34-36	vkamt S lrwlk	1.423e-02
17			80-82	lsslp S lraiv	
18			90-92	varan T qrtqs	
19			208-211	lhln T qrtqs	
20			247-250	lytlp S lrrln	
21			301-304	klyln S nkldf	
22			578-581	gaecr T vreem	
23			669-671	atlsy T tkarl	
24			792-794	wlgrk S prlvr	
25			860-862	qgqgl S gkvkr	
26			867-869	kvkrd T ektdq	
27			1179-1180	gyfav T akcsd	
28			1220-1221	veikl S lkacq	
29			1261-1263	fhaws T frqaq	
30	Casein Kinase II Phosphorylierungss telle	21	16-19	rgvdl S gbdkk	1.482e-02
31			107-110	klddl T slegl	
32			217221	qsnlp T dvdls	
33			226-230	glsnl S dvdls	
34			231-235	sdvdl S cndlt	
35			317-321	gigkl T sleef	
36			318-321	igklt S leefm	
37			354-558	knrlv T lpeai	
38			436-440	rrrkd S aqdvq	
39			474-478	pggkg T rgdqq	
40			533-537	yivlk T fldds	
41			578-582	gaecr T vreem	
42			599-603	fdndi S yiegg	
43			611-615	asgfy T vedth	
44			640-644	vplkg S sldpr	
46			768-771	mrlmq S ldtr	
47			1024-1027	evvrm T qqenp	
48			1090-1092	escfs S pfese	
49			1109-1111	wvvra S dpdea	
50			1123-1125	ediln T mfdgs	
51			1213-1215	vgtqt S qveik	
52	Tyrosin Kinase Phosphorylierungs- stelle	4	238-244	cndlt R vpecl	min. 4.074e-04 max. 4.083e-04
53			522-528	yedc Y ivlkt	
54			1151-1159	gaqkp Y dddae	
55			1167-1175	snekg Y favte	
56	N-Myristoylation	14	12-17	lpfvr G vdlsg	1.3973-02

sites					
57			308-314	kldfd G lpsgi	
58			404-410	qlrla G gkgtr	
59			470-476	darap G gkgtr	
60			496-502	ftedv G qlpgl	
61			550-556	iywi G geatl	
62			603-609	isyie G gtag	
63			604-610	syieg G tagf	
64			661-666	iywr G aqatl	
65			732-737	klykv G qelcg	
66			804-809	aalkl G qelcg	
67			856-861	eavlq G qglsg	
68			1065-1069	qirt G salct	
69			1209-1213	vymwv G tqtsq	
70	Amidierungsstelle	4	626-629	rmyrv Y gkkni	8.636e-04
71			788-791	dvsiv L grksp	
72			913-916	egfvl E grkft	
73			1044-1046	kfiyh R grkrv	
74	"Cell Attachement" Sequenz	1	475-477	ggkgt RGD qglek	1.955e-04
75	Leucine Zipper Motiv	1	109-130	ddlsv LDWSHNQLTECPRELE NAKNML vlnls	7.006e-05
76	Glycosaminoglycan attachement site, Prosite (PS00002)	1	312-315	SGIG	
77	Myc type "helix- loop-helix Dimerisierungs Motiv Prosite PS00038	1	351-366	NRLVTLPEAIHFLTEI	4.878e-06
78	hydrophober Aminosäureab- schnitt	1	403-418	LAGASPATVAAAAAVG	

8.6 Proteindomänen von Mmflip

Domäne	Position	Sequenz	E-value
LRR 1	3-25	TGVLPFVRGVDLSGNDFKGGYFP	3,1e+02
LRR 2	26-48	ENVKAMTSLRWLKLNERTGLCYLP	34
LRR 3	49-72	EELAAALQKLEHLSVSHNHLTTL	0,022
LRR 4	73-98	HGELSSLPSLRAIVARANSLKNSGVP	7,0e+02
LRR 5	99-120	DDIFKLDDLSVLDWSHNQLTECP	7,8e+02
LRR 6	121-144	RELENAKNMLVLNLSHNGIDSIP	0,019
LRR 7	146-168	QLFINLTDLLYLDLSENRLLESLP	6,7
LRR 8	169-196	QMRRLVHLQTLVLNNGPLLHAQLRQLP	3,6e+02
LRR 9	197-217	AMMALQTLHLRNTQRTQSNLP	1,6e+02
LRR 10	218-240	TSLEGLSNLSDVDLSCNDLTRVP	2
LRR 11	241-257	ECLYTLPSLRRLNLSSN	47
LRR 12	258-280	QIAELSLCIDQWVHLETNLNLSRN	0,0034
LRR 13	281-303	QLTSLPSAICKLTKLKKLYLNSNKLDFDGLP	4,6
LRR 14	304-326	SGIGKLSLEEFMAANNLELIP	2,3e+02
LRR 15	327-357	ESLCRCPKLKKLVLNKNRLVTLP	5,6
LRR 16	358-381	EAIHFLTEIQVLDVRENPSLVMPP	2,0e+02
Linkerregion	382-499	KLADRRTAEWYNIDFSLQNQLRLAGASPATVAA AAAVGSGSKDPLARKMRLRRRKDSAQDVQAK QVLKGMSDVAQEKNKNQEEESIDARAPGGKG TRGDQGLEKPRLDYSEFFTEDVGQL	
GLD-Type 1	500-598	PGLTIWQIENFVPVLVEEAFHGKIFYEADCYI VLKTFLLDDSGSLNWEIYYWIGGEATLDKKAC SAIHAVNLRNYLGAECRTVREEMGDESEEF LQVFDND	4.17e-25
GLD-Type 2	618-709	YVTRMYRVYGGKKNIKLEPVPLKGSLLDPRFV LLDQGLDIYVWRGAQATLSYTTKARLFAEKI NKNERKGAIEITLLVQGKEPPGFWNLLVGD	2.65e-18
GLD-Type 3	745-838	YRLSVEHKKRPKVELMPGMRLQLSLDTRC VYILDCWSDVSIWLGRKSPRLVRAAALKLGQ ELCGMLHRPRHTVVSRSLEGTEAQVFKAKF KNW	3.72e-22
GLD-Type 4	905-1038	DGMEGFVLEGRKFTRLPEEEFGHFYTQDCYV FLCRYWVPVEYEEEEKTEDKEGKASAEAREG EEAAAEAEKQPEEDFQCIVYFWQGREASNM GWLTFTFSLQKKFESLFPKGLEVVVMTQQENP KFLSHFKRK	6.04e-02
GLD-Type 5	1055- 1149	PTLYQIRTNGSALCTRCIQINTDSSLLNSESCFSS PFESEDNQGIVYPWVVRASDPDEAKLAEDILN TMFDGYSKQVINEGEEPENFFWVGIGA	6.97e-04
GLD-Type 6	1164- 1259	SLFRGSNEKGYFAVTEKCSDFCQDDLADDDI MLLDNGQEVYMWVGTQTSQVEIKLSLKACQ VYIQDTRSKEHERPRRLRLVRKGNEQRAFT RCFAW	1.08e-18

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Angelika Schmitt
Geburtsdatum:	02.04.1969
Geburtsort:	Karlsruhe
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	Deutsch

Schulische Ausbildung:

1975-1979	Nebenius Grundschule Karlsruhe
1979/1980	Uhlandschule/Hauptschule
1980-1987	Nebenius Realschule Karlsruhe
1987/1988	Friedrich List Wirtschaftsgymnasium Karlsruhe
1988-1990	Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe
Abitur	08.05.1990

Hochschulstudium

TH Karlsruhe	
Studium der Biologie/Lehramt	<u>Zwischenprüfung:</u> 11.10.1993
<u>Schwerpunkte:</u> Zoologie, Botanik, (Genetik)	Gesamtnote: gut

Studium der Geographie/Lehramt	<u>Staatsexamen:</u> November 1996
<u>Schwerpunkte:</u> Landschaftsökologie;	Gesamtnote: gut
Klimatologie; Wirtschaftsgeographie	
Staatsexamensarbeit in Zoologie mit dem <u>Thema:</u>	
”Centrinexpression in ciliären Sinneszellen von	
Säugetieren”	

Anstellung als wiss. Hilfskraft am Zoologischen Institut I	November 1996 - April 1997
Bearbeitung von zellbiologischen/ biochemischen Fragestellungen	
Vorarbeiten zum Promotionsthema	

Beginn der Promotion an der TH Karlsruhe

Zoologisches Institut I	ab 01.05.1997
Zell- und Neurobiologie	
Prof. Dr. R. Paulsen/ Dr. Uwe Wolfrum	
<u>Thema der Dissertation:</u> Isolierung und	
Charakterisierung bisher unbekannter	
Cytoskelettproteine des Verbindungs-ciliums von	
Vertebraten-Photorezeptorzellen	
Betreuung von Praktikas:	
Zoologisches Anfängerpraktikum	
Morphologie der Wirbeltiere	
Zellbiologisches Praktikum	
Gastaufenthalt im Labor von Prof. J.L. Salisbury	September/Oktober 1997
an der Mayo Klinik, Rochester, MN; U.S.A.	

Fortsetzung der Promotion an der Universität

Mainz

Zoologisches Institut Abtl. I

Experimentelle Morphologie

Prof. Dr. Uwe Wolfrum

ab März 1999

Promotionsprüfung

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich meine Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe mit dieser Promotionsarbeit am Institut für Zell- und Neurobiologie Karlsruhe begonnen und habe mit meinem Betreuer Prof. Uwe Wolfrum an die Johannes Gutenberg Universität Mainz gewechselt. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den.....2000