

Molekulare Charakterisierung der
Centrin-Isoformen
in der Retina von Säugetieren

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

von
Andreas Gießl
geboren am 21.03.1972
in Gelnhausen

Mainz, Oktober 2004

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 24.11.2004

Die Neigung der Menschen, kleine Dinge für wichtig zu halten, hat schon viel Großes hervorgebracht.

Georg Christoph Lichtenberg (1742-1799)
deutscher Naturwissenschaftler und Schriftsteller

Anmerkungen

In die vorliegende Arbeit wurden Daten integriert, die im Rahmen der Betreuung der Diplomarbeit von Philipp Trojan „Charakterisierung funktioneller Domänen von Centrin-Isoformen“ gewonnen wurden.

Die Namen oder Symbole (d.h. die Kurzform) von Genen wurden kursiv und die von Proteinen normal geschrieben. In Namen von verschiedenen Proteinen aus verschiedenen Spezies wurde der erste Buchstabe zur Unterscheidung groß geschrieben und der zweite klein.

Das Zitieren und Erstellen des Literaturverzeichnisses wurde entsprechend der Vorgaben des Verlagshauses Springer durchgeführt.

Einige der in dieser Arbeit enthaltenen Abbildungen wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt und für Veröffentlichungen in wissenschaftlichen Zeitschriften verwendet. Um die Bezeichnungen und Abkürzungen in allen Abbildungen konsistent zu halten, wurden diese daher durchgängig in Englisch erstellt.

Die Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation wurden durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) in Form von Sachbeihilfen im Rahmen des Schwerpunktprogramms „Molekulare Sinnesphysiologie“ (Wo 548/3) und durch die FAUN-Stiftung Nürnberg gefördert.

Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

Teile der vorliegenden Dissertation wurden auf internationalen Kongressen vorgestellt und in folgenden Zeitschriften veröffentlicht:

Publikationen

Originalarbeiten:

Gießl A, Pulvermüller A, Trojan P, Park JK, Choe H-W, Ernst OP, Hofmann KP,

Wolfrum U (2004) Differential expression and interaction with the visual G-Protein transducin of centrin isoforms in mammalian photoreceptor cells. J. Biol. Chem. (in press: www.jbc.org)

Schmidt M*, Gießl A*, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T (2003) How does the eye breath? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply of the vertebrate retina. J. Biol. Chem. 278: 1932-1935 (*both authors contributed equally to the work)

Wolfrum U, Gießl A, Pulvermüller A (2002) Centrins in vertebrate photoreceptor cells. Adv. Exp. Med. Biol. 514: 179-203

Pulvermüller A, Gießl A, Heck M, Wottrich R, Schmitt A, Ernst OP, Choe H-W, Hofmann KP, Wolfrum U (2002) Calcium dependent assembly of centrin/G-protein complex in photoreceptor cells. Mol. Cell Biol. 22: 2194-2203

Begutachtete Buchkapitel:

Gießl A, Trojan P, Pulvermüller A, Wolfrum U (2004) Centrins, potential regulators of transducin translokation in photoreceptor cells. In: Williams DS (ed) Cell biology and related disease of the outer retina. World Scientific Publishing Company Pte. Ltd., Singapore 122-195

Kongressbeiträge

Wolfrum U, Gießel A, Pulvermüller A, Trojan P, Hofmann KP (2004) Centrins as potential regulators of light-induced transducin translocation. ARVO 3639/B100

Gießel A, Pulvermüller A, Trojan P, Hofmann KP, Wolfrum U (2004) Ca²⁺-dependent interaction of centrin isoforms with the visual G-protein Transducin. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin

Trojan P, Pulvermüller A, Gießel A, Ernst O, Hofmann KP, Wolfrum U (2004) Casein-kinase II as a potential light-dependent regulator of centrins in vertebrate photoreceptor cells. Tagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Berlin

Trojan P, Gießel A, Pulvermüller A, Hofmann KP, Wolfrum U (2003) Light-dependent phosphorylation of Centrins in vertebrate retina. Tagung Cell Biology and Development, Bonn

Gießel A, Trojan P, Pulvermüller A, Hofmann KP, Wolfrum U (2003) Ca²⁺-dependent Interaction of Centrin Isoforms with the Visual G-Protein Transducin. Symposium des Neurobiologischen Arbeitskreises, Mainz

Trojan P, Gießel A, Pulvermüller A, Hofmann KP, Wolfrum U (2003) Light-dependent phosphorylation of centrins in vertebrate retina. Europ. J. Cell Biol. 82 [Supplement] 53:76.

Gießel A, Schmidt M, Laufs T, Hankeln T, Wolfrum U, Burmester T (2003) How does the eye breathe? Neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. FASEB summer research conferences "The biology and chemistry of vision", Tucson, Arizona p28

Wolfrum U, Gießel A, Schmidt M, Laufs T, Hankeln T, Burmester T (2003) How does the eye breathe? Evidence for neuroglobin-mediated oxygen supply in the mammalian retina. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. E-Abstract 3266

-
- Giebl A, Trojan P, Schmitt A, Kubicki K, Lotz K, Wolfrum U (2002) Molecular analysis of centrin isoforms in vertebrate tissues. Symposium des Neurobiologischen Arbeitskreises, Mainz
- Giebl A, Pulvermüller A, Heck M, Schmitt A, Ernst O P, Choe H-C, Hofmann KP, Wolfrum U (2002) Ca²⁺-dependent assembly of centrin/G-protein complex in photoreceptor cells EMBO/EMBL Conference on centrosomes and spindle pole bodies, Heidelberg p114
- Giebl A, Reidel B, Schmitt A, Kubicki K, Wolfrum U (2002) Molecular characterization of the centrin isoforms in sensory cells. EMBO/EMBL Conference on centrosomes and spindle pole bodies, Heidelberg p68
- Giebl A, Pulvermüller A, Heck M, Wottrich R, Schmitt A, Ernst OP, Choe H-W, Hofmann KP, Wolfrum U (2002) Ca²⁺-dependent assembly of centrin/transducin complex in mammalian photoreceptors. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., E-Abstr. 1958
- Giebl A, Pulvermüller A, Heck M, Wottrich R, Schmitt A, Ernst OP, Choe H-W, Hofmann KP, Wolfrum U (2001) Calcium-dependent assembly of centrin/G-protein complex in mammalian photoreceptors. Symposium des Neurobiologischen Arbeitskreises, Mainz
- Giebl A, Schmitt A, Huntley BK, Kubicki K, Wolfrum U (2001) Molecular characterization of the centrin cytoskeleton in sensory cells. Symposium des Neurobiologischen Arbeitskreises, Mainz
- Giebl A, Pulvermüller A, Heck M, Schmitt A, Ernst OP, Choe H-W, Hofmann KP, Wolfrum U (2001) Ca²⁺-dependent assembly of centrin/G-protein complex in mammalian photoreceptors. Biol. Cell 93:232
- Giebl A, Schmitt A, Huntley B, Kubicki K, Wolfrum U (2001) Molekular characterization of the centrin cytoskeleton in sensory cells. In: Elsner N, Kreutzberg GW (eds) Göttingen Neurobiology Report 2001 Georg Thieme Verlag Stuttgart, pp 536
- Giebl A, Wolfrum U, Schmitt A, Wottrich R, Nagel K, Huntley BK, Kubicki K (2000) Molecular characterization of the centrin cytoskeleton in sensory cells. Europ. J. Cell Biol. [Supplement] 79:36
-

Danksagung

Verzeichnisse

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. DAS CYTOSKELETT EUKARYOTISCHER ZELLEN ZWISCHEN DYNAMIK UND STABILITÄT	1
1.1.1. Das Aktin-Netzwerk	2
1.1.2. Intermediärfilamente	3
1.1.3. Mikrotubuli.....	3
1.2. DAS NANOFILAMENT CENTRIN	6
1.3. MORPHOLOGIE UND HISTOLOGIE DES SÄUGERAUGES.....	16
1.4. AUFBAU DER PHOTOREZEPTORZELLEN	19
1.5. STRUKTUR UND FUNKTION DES CILIENAPPARATES VON PHOTOREZEPTORZELLEN	22
1.6. PHOTOTRANSDUKTION DER PHOTOREZEPTOREN.....	23
2. ZIEL DER ARBEIT	28
3. MATERIAL UND METHODEN	31
3.1. MATERIAL.....	31
3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	31
3.1.2. Versuchstiere	31
3.1.3. Soft- und Hardware	32
3.1.4. Laborgeräte.....	32
3.1.5. Verwendete Antikörper	34
3.1.6. Oligonukleotid-Primer.....	35
3.1.7. Bakterienstämme und Vektoren	37
3.2. METHODEN	38
3.2.1. Präparationen von Geweben	38
3.2.1.1. Präparation der verwendeten Gewebe von Maus und Ratte.....	38
3.2.1.2. Isolierung von Rinderretinae.....	38
3.2.2. Biochemische Methoden	39
3.2.2.1. Herstellung von Proteinextrakten.....	39
3.2.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung.....	40
3.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	40
3.2.2.4. Western Blot Analyse	43

3.2.2.5.	Immunodetektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran	44
3.2.2.6.	„ <i>Overlay Assay</i> “ mit rekombinanten Proteinen.....	45
3.2.2.7.	Koimmunopräzipitation	46
3.2.2.8.	GST-„ <i>Pull-Down Assay</i> “	46
3.2.2.9.	Herstellung von Antikörpern gegen Maus Centrin 2, 3, und 4.....	47
3.2.2.10.	Aufreinigung von Antisera mittels Affinitätschromatographie.....	48
3.2.2.11.	Prä-Adsorption der Centrin-Antikörper	49
3.2.3.	Phosphorylierungsexperimente.....	50
3.2.3.1.	Phosphorylierung von Proteinen in Rinderretinaextrakten	51
3.2.3.2.	Phosphorylierung rekombinanter Centrine durch Rinderretinaextrakte.....	52
3.2.3.3.	<i>Ex vivo</i> -Phosphorylierung von Centrin in explantierten Rattenretinae	52
3.2.4.	Molekularbiologische Methoden	53
3.2.4.1.	Isolierung von hochmolekularer RNA	53
3.2.4.2.	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	54
3.2.4.3.	Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR).....	55
3.2.4.4.	Auftrennung der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese.....	56
3.2.4.5.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> Bakterien	57
3.2.4.6.	Herstellung und Transformation kompetenter <i>E. coli</i> Bakterien.....	57
3.2.4.7.	Klonierung von PCR-Produkten mit dem TOPO TA Cloning™ Kit.....	60
3.2.4.8.	Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien.....	62
3.2.4.9.	Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA.....	62
3.2.4.10.	Aufreinigung von DNA aus der Agarose-Gelelektrophorese.....	63
3.2.4.11.	Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor.....	63
3.2.4.12.	Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen.....	64
3.2.4.13.	Aufreinigung und Trennung von GST-Fusionsproteinen.....	65
3.2.4.14.	Herstellung eines GFP-Fusionsproteins für eukaryotische Zellen	66
3.2.5.	Zellkultur	67
3.2.5.1.	Allgemeine Zellkulturtechniken.....	67
3.2.5.2.	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	67
3.2.5.3.	Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Calciumphosphat-Methode.....	69
3.2.6.	Lichtmikroskopie.....	70
3.2.6.1.	Fixierung von Geweben und Zellen	70
3.2.6.2.	Einbettung und Schneiden der Präparate.....	70
3.2.6.3.	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen	71
3.2.7.	Elektronenmikroskopie.....	72
3.2.7.1.	Fixierung und Einbettung des Gewebes für Immunogoldmarkierung	72
3.2.7.2.	Anfertigung von Ultradünnschnitten.....	72
3.2.7.3.	Immunogoldmarkierung.....	72
3.2.7.4.	Silberverstärkung nach Danscher (1981).....	73
3.2.7.5.	Kontrastierung der Schnitte.....	74

4. ERGEBNISSE	75
4.1. ANALYSE DER EXPRESSION DER CENTRIN-ISOFORMEN IN DER RETINA VON <i>RATTUS NORVEGICUS</i> UND <i>MUS MUSCULUS</i> AUF TRANSKRIPTIONSEBENE.....	75
4.1.1. Klonierung der Centrin-Isoformen 2 bis 4 aus Maus-Gewebe	80
4.1.2. Rekombinante Expression der Centrin-Isoformen.....	82
4.1.3. Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern gegen MmCen2p, MmCen3p und MmCen4p ...	84
4.1.4. Analyse der Spezifität der Antikörper gegen die Centrin-Isoformen	85
4.1.5. Expressionsanalyse der Centrin-Isoformen in der Retina.....	87
4.2. LOKALISATION DER CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4 IN PHOTOREZEPTORZELLEN	89
4.2.1. Lokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in HeLa-Zellen.....	93
4.3. CENTRIN-PHOSPHORYLIERUNG IN DER RETINA.....	95
4.3.1. <i>Ex vivo</i> Phosphorylierungen explantierter Rattenretinae	97
4.3.2. <i>In vitro</i> Phosphorylierungen rekombinanter Maus-Centrine mittels Rinderretinaextrakten.....	98
4.3.3. <i>In vitro</i> Phosphorylierungen rekombinanter Maus-Centrine	100
4.3.4. Reduktion der Centrin-Phosphorylierung in explantierten Rattenretinae durch..... Proteinkinase-Inhibitoren	101
4.3.5. Koloalisation der CKII mit Centrin in der Retina.....	102
4.4. INTERAKTIONSPARTNER VON CENTRINEN.....	103
4.4.1. Identifikation von Centrin-Interaktionsproteinen in Säugerretinae	105
mit Ca ²⁺ -aktiviertem Centrin	105
4.4.2. Centrin/Transducin-Komplex	108
4.5. SUBZELLULÄRE LOKALISATION VON CENTRIN UND TRANSDUCIN.....	115
5. DISKUSSION	120
5.1. GEWEBSSPEZIFISCHE EXPRESSION DER CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4.....	121
5.2. UNTERSCHIEDLICHE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DEUTET..... AUF UNTERSCHIEDLICHE FUNKTIONEN DER CENTRIN-ISOFORMEN HIN	126
5.3. LICHTABHÄNGIGE POSTTRANSLATIONALE MODIFIKATIONEN VON CENTRINEN.....	131
5.4. IDENTIFIKATION VON CENTRIN-INTERAKTIONSPROTEINEN IN SÄUGETIERRETINAE	135
5.5. DER CENTRIN/TRANSDUCIN-KOMPLEX IN DER SÄUGERRETINA.....	137
5.6. WELCHE ROLLE SPIELT DER CENTRIN/G-PROTEIN-KOMPLEX IN PHOTOREZEPTORZELLEN?.....	142
5.7. SCHLUSSBETRACHTUNGEN UND AUSBLICKE IN DER CENTRIN-FORSCHUNG	147
6. ZUSAMMENFASSUNG	156
7. LITERATURVERZEICHNIS	158
8. ANHANG	180
8.1. ZUSÄTZLICHE ABBILDUNGEN UND ALIGNMENTS.....	180
8.2. ABKÜRZUNGEN	187
8.3. LEBENS LAUF	190
8.4. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	191

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES SPINDELPOLKÖRPERS VON <i>S. CEREVISIAE</i>	4
ABBILDUNG 1.2	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CENTROSOMS VON VERTEBRATEN	5
ABBILDUNG 1.3	PHYLOGENETISCHE VERWANDTSCHAFT VERSCHIEDENER CENTRINE	
	UND DAS CENTRIN STRUKTURMOTIV VON MAUS-CENTRIN 1	9
ABBILDUNG 1.4	CENTRINLOKALISATION IN VERSCHIEDENEN ZELLTYPEN	11
ABBILDUNG 1.5	VERGLEICH VON MAUS-CENTRIN-ISOFORMEN	12
ABBILDUNG 1.6	AUFBAU DER DNA UND mRNA DER MAUS-CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4	15
ABBILDUNG 1.7	AUFBAU DES SÄUGERAUGES UND PHOTOGRAPHIE VON RÁMON Y CAJAL	17
ABBILDUNG 1.8	DER AUFBAU DER SÄUGETIERRETINA	18
ABBILDUNG 1.9	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES CILIENAPPARATES EINER PHOTOREZEPTORZELLE	21
ABBILDUNG 1.10	LICHTABSORPTION DURCH RHODOPSIN MIT DER AKTIVIERUNG	
	DER cGMP-PHOSPHODIESTERASE IN STÄBCHEN	24
ABBILDUNG 1.11	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER DUNKEL- UND	
	HELL-ADAPTIERTEN PHOTOREZEPTORZELLE	26
ABBILDUNG 3.1	BIOCHEMISCHE STRATEGIE ZUR VALIDIERUNG DER	
	LICHTABHÄNGIGEN PHOSPHORYLIERUNGEN DER CENTRINE IN DER RETINA	50
ABBILDUNG 3.2	SCHEMA DER TOPO-ISOMERASEN-METHODE UND KARTE DES	
	SEQUENZIERUNGSVEKTORS PCR [®] 2.1-TOPO	61
ABBILDUNG 3.3	SCHEMA DES FUNKTIONSPRINZIPS DES GATEWAY-SYSTEMS	66
ABBILDUNG 4.1	EXPRESSIONSANALYSEN VON DEN CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4 IN ADULTEN RATTEN-	
	UND MAUSRETINAE MITTELS RT-PCR	77
ABBILDUNG 4.2	EXPRESSIONSANALYSEN VON DEN CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4	
	AUS GEHIRNGEWEBE VON ADULTEN RATTE MITTELS RT-PCR	78
ABBILDUNG 4.3	AMINOSÄURESEQUENZ-ALIGNMENT DER MAUS-CENTRIN KLONE 2 BIS 4	81
ABBILDUNG 4.4	SDS-POLYACRYLAMID GEL ANALYSE MIT REKOMBINANT EXPRIMIERTEN	
	MAUS-CENTRINEN 1 BIS 4 UND MAUS-CALMODULIN	82
ABBILDUNG 4.5	WESTERN BLOT ANALYSE DER VIER VERSCHIEDENEN REKOMBINANTEN	
	MAUS-CENTRIN-ISOFORMEN MIT DEM MAB PAN-CENTRIN (CLONE 20H5)	83
ABBILDUNG 4.6	ANALYSE ZUR KREUZREAKTIVITÄT DER CENTRIN-ISOFORM-ANTIKÖRPER	
	pMmC1 BIS pMmC4 GEGEN DIE REKOMBINANTEN CENTRIN-ISOFORMEN	85
ABBILDUNG 4.7	NACHWEIS DER SPEZIFITÄT DER PRÄ-ADSORBIERTEN ISOFORM-ANTIKÖRPER	86
ABBILDUNG 4.8	WESTERN BLOT ANALYSEN MIT SPEZIFISCHEN PRÄ-ADSORBIERTEN	
	AFFINITÄTSGEREINIGTEN PAB GEGEN DIE VIER CENTRIN-ISOFORMEN	88
ABBILDUNG 4.9	LOKALISATION VON CENTRINEN IN EINER RATTENRETINA DURCH	
	INDIREKTE IMMUNOFLUORESCENZANALYSEN MIT DEM MAB PAN-CENTRIN (CLONE 20H5)	90

ABBILDUNG 4.10	SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4 IN MAUSRETINAE DURCH IMMUNOFLUORESZENZANALYSEN	91
ABBILDUNG 4.11	IMMUNOELEKTRONENOPTISCHE LOKALISATION VON CENTRIN 3	92
ABBILDUNG 4.12	INDIREKTE IMMUNOFLUORESZENZANALYSE VON HE LA-ZELLEN MIT PRÄ-ADSORBIERTEN SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPERN pMmC1 BIS 4 UND γ -TUBULIN	94
ABBILDUNG 4.13	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER <i>OMIGA</i> ANALYSEN DER MAUS-CENTRIN-ISOFORM-PROTEINE 1 BIS 4	96
ABBILDUNG 4.14	LICHTABHÄNGIGE PHOSPHORYLIERUNG VON CENTRINEN IN EXPLANTIERTEN RETINAE VON ADULTEN RATTEN	97
ABBILDUNG 4.15	LICHTABHÄNGIGE <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG REKOMBINANTER CENTRIN-ISOFORMEN 1-4 IN RINDERRETINAEKTRAKTEN	99
ABBILDUNG 4.16	<i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG REKOMBINANTER CENTRIN-ISOFORMEN DURCH DIE CKII..	100
ABBILDUNG 4.17	INHIBITION DER CENTRIN-PHOSPHORYLIERUNG DURCH CKII-INHIBITOR	101
ABBILDUNG 4.18	KOLOKALISATION VON CENTRINEN MIT CKII IM VERBINDUNGSCILIUM VON STÄBCHEN PHOTOREZEPTORZELLEN	103
ABBILDUNG 4.19	ANALYSE EINES „ <i>OVERLAY ASSAYS</i> “ MIT RINDERRETINAEKTRAKTEN	106
ABBILDUNG 4.20	IDENTIFIKATION VON β -TRANSDUCIN MITTELS „ <i>OVERLAY</i> “-STRATEGIE	107
ABBILDUNG 4.21	KOIMMUNOPRÄZIPITATION VON G_T - <i>HOLO</i> MIT CENTRIN-ANTI KÖRPERN	109
ABBILDUNG 4.22	CA^{2+} -ABHÄNGIGE KOIMMUNOPRÄZIPITATION VON TRANSDUCIN MIT CENTRIN-ANTI KÖRPERN AUS RINDERRETINAEKTRAKTEN	110
ABBILDUNG 4.23	GST-CENTRIN „ <i>PULL-DOWN ASSAYS</i> “ VON TRANSDUCIN	112
ABBILDUNG 4.24	INDIREKTE IMMUNOFLUORESZENZANALYSE DER LICHTSTIMULIERTEN TRANSLOKATION VON $G_T\alpha$ AUF KRYOSTATSCHNITTEN VON MÄUSERETINAE	115
ABBILDUNG 4.25	VERGLEICH DER LICHTSTIMULIERTEN TRANSLOKATION VON TRANSDUCIN IN ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN AUFNAHMEN UND IMMUNOFLUORESZENZ-ANALYSEN IN MÄUSERETINAE	117
ABBILDUNG 4.26	IMMUNOELEKTRONENMIKROSKOPISCHE KOLOKALISATION VON TRANSDUCIN UND CENTRIN IM GLEICHEN KOMPARTIMENT DES VERBINDUNGSCILIUMS IN EINER STÄBCHEN PHOTOREZEPTORZELLE	118
ABBILDUNG 5.1	TRANSFEKTION VON HE LA-ZELLEN MIT GFP-MM CEN2 UND INDIREKTE IMMUNOFLUORESZENZ MIT β -G-PROTEIN-ANTI KÖRPERN	129
ABBILDUNG 5.2	SCHEMATISCHE ILLUSTRATION DER UNTERSCHIEDLICHEN LOKALISATION DER CENTRIN-ISOFORMEN 1 BIS 4 IN SPEZIALISIERTEN PHOTOREZEPTORZELLEN UND IN NICHT-SPEZIALISIERTEN EUKARYOTISCHEN ZELLEN	130
ABBILDUNG 5.3	CA^{2+} -INDUZIERT E BARRIERE-HYPOTHESE („ <i>BARRIER HYPOTHESIS</i> “)	144
ABBILDUNG 5.4	CA^{2+} -GRADIENT-HYPOTHESE („ <i>CA^{2+}-GRADIENT HYPOTHESIS</i> “)	145
ABBILDUNG 5.5	HYPOTHESE DER REGULIERUNG DES CENTRIN/TRANSDUCIN-KOMPLEXES DURCH CA^{2+} -AUFNAHME UND PHOSPHORYLIERUNG VON CENTRINEN	148

ABBILDUNG 5.6	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MM _{CEN1P} -DELETIONSKONSTRUKTE MIT PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN	152
ABBILDUNG 5.7	GST-CENTRIN „PULL-DOWN ASSAY“ MIT REKOMBINANT HERGESTELLTEN G-PROTEIN UNTEREINHEITEN	154
ABBILDUNG 8.1	AMINOSÄURESEQUENZANALYSE DER MAUS-CALMODULIN-KLONE	180
ABBILDUNG 8.2	LICHTSTIMULIERTE TRANSLOKATION VON ARRESTIN IN MAUSRETINAE	181
ABBILDUNG 8.3	NACHWEIS DER SPEZIFITÄT DES MAB HsCETN2.4	181
ABBILDUNG 8.4	INDIREKTE IMMUNOFLUORESCENZANALYSE VON HELA-ZELLEN MIT DEM PRÄ-ADSORBIERTEN SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER pMMC2	182
ABBILDUNG 8.5	INDIREKTE IMMUNOFLUORESCENZANALYSE MIT DEM MAB HsCETN2.4 EINES KRYOSTATSCHNITTES DURCH EINE RATTENRETINA	182

Tabellenverzeichnis

TABELLE 3.1	AUFLISTUNG DER WICHTIGSTEN VERWENDETEN GERÄTE	32
TABELLE 3.2	PRIMÄRE ANTIKÖRPER	34
TABELLE 3.3	SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER	35
TABELLE 3.4	VERWENDETE OLIGONUCLEOTID-PRIMER FÜR SEQUENZIERUNGEN	35
TABELLE 3.5	AUFLISTUNG DER VERWENDETEN OLIGONUCLEOTID-PRIMER FÜR RT-PCR- UND PCR-ANALYSEN UND KONSTRUKT-HERSTELLUNG	36
TABELLE 3.6	VERWENDETE BAKTERIENSTÄMME, ZELLKULTURSTÄMME UND VEKTOREN	37
TABELLE 3.7	ZUR SELEKTION VON BAKTERIEN VERWENDETE ANTIBIOTIKA	37
TABELLE 3.8	ZUSAMMENSETZUNG DER VERWENDETEN TRENN- UND SAMMELGELE	42
TABELLE 4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER DURCHGEFÜHRTEN EXPRESSIONS ANALYSEN DER VIER CENTRIN-ISOFORMEN MITTELS RT-PCR IN RODENTEN	79
TABELLE 8.1	„ACCESSION NUMBERS“ (AN) DER VERWENDETEN SEQUENZEN IM PHYLOGRAMM ABB. 1.3 ...	183
TABELLE 8.3	ALIGNMENT DER VERWENDETEN AMINOSÄURESEQUENZEN IN ABBILDUNG 1.3	184
TABELLE 8.4	IUPAC/IUB-SYMBOLLE FÜR NUKLEINSÄUREN	186
TABELLE 8.5	IUPAC/IUB-SYMBOLLE FÜR AMINOSÄUREN	186

Einleitung

1. Einleitung

Eine Pflanzenzelle besitzt, im Gegensatz zur tierischen Zelle, zur Wahrung ihrer Struktur eine stabilisierende und formgebende, aber relativ starre Zellwand aus Cellulose und anderen Polymeren. Bedingt durch die zumeist beweglichere tierische Lebensweise kommt solch eine Struktur für die tierische Zelle nicht in Frage. Die Beweglichkeit von Zellen ist eine der bedeutendsten Errungenschaften der Evolution. Im Verlauf der Entwicklung mehrzelliger Organismen kam es durch Wanderungen einzelner Zellen oder auch Zellverbände in Embryonen zur Ausbildung von einfachen Organen. In Organismen sind die meisten Zellen an einen festen Ort gebunden, dort aber zu morphologischen Veränderungen fähig. Veränderungen und Bewegungen finden z.B. bei der Kontraktion von Muskelzellen, Verlängerungen von Axonen und bei der Einschnürung des Zellkörpers während der Mitose statt. Schon seit 300 Jahren vermuten Naturforscher die Existenz strukturgebender Elemente als essenzielle Grundlage für Organismen und deren Bewegungen (Frixione, 2000).

1.1. Das Cytoskelett eukaryotischer Zellen zwischen Dynamik und Stabilität

Die vermutlich feinsten und kompliziertesten Bewegungen finden aber in den Zellen statt, die entscheidend für Wachstum, Differenzierung und Funktion der Zellen verantwortlich sind. Als Beispiele kann man die Chromosomentrennung oder die Strömung des Cytosols nennen. Diese Bewegungen werden von der Zelle kontrolliert und finden weder zufällig noch ungerichtet statt. In allen Bewegungsabläufen spielen Cytoskelettelemente und damit verbundene molekulare Motoren eine essenzielle Rolle. Das Cytoskelett, welches aus verschiedenen Filamenten besteht, ist für die Stabilität der Zelle und den intrazellulären Transport verantwortlich. Dieses dynamische, dreidimensionale Proteingeflecht erstreckt sich durch das gesamte Cytoplasma und lässt sich in verschiedene Filamentgruppen

unterteilen: Mikrotubuli (\varnothing 20-25 nm), Intermediärfilamente (\varnothing 8-16 nm), Aktinfilamente (\varnothing 4-6 nm) und Nanofilamente (\varnothing 2-4 nm) (Frixione, 2000; Fuchs und Karakesisoglou, 2001).

1.1.1. Das Aktin-Netzwerk

Das Aktin-Netzwerk wird auch als Mikrofilament-Netzwerk bezeichnet und ist innerhalb von Zellen ein dynamisches Gebilde, in dem die Filamente rasch wachsen oder auch verkürzt werden. Aktinfilamente (F-Aktin) bilden den Hauptbestandteil des Cytoskeletts und werden durch die ATP-abhängige Polymerisierung von globulärem Aktin (G-Aktin) gebildet (Bershadsky und Vasiliev, 1988). Diese Mikrofilamente bestehen also aus einem polaren Aktinpolymer und daran gebundenen Proteinen (Aktin-bindende Proteine). Die Verknüpfung der Aktinfilamente zu Bündeln und Netzen erfolgt durch quervernetzende Proteine, zu denen u.a. Spektrin und Filamin gehören. Zu den Aktin-bindenden Proteinen gehört außerdem eine große Familie Aktin-assoziiierter molekularer Motoren, die Myosine (Goodson *et al.*, 1997), welche sich mit Hilfe einer ATPase-aktiven Kopfreion entlang den Mikrofilamenten bewegen können. In der quergestreiften Muskulatur ist das Aktincytoskelett am besten beschrieben. Des Weiteren ist das Aktincytoskelett an wichtigen Funktionen beim Vesikeltransport (Evans *et al.*, 1995), in Mikrovilli von Epithelzellen und im Verbindungscilium der Photorezeptorzellen beteiligt (Bershadsky und Vasiliev, 1988; Wolfrum *et al.*, 1998; Wolfrum und Schmitt, 1999; 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Aktinfilamente am Boden des Außensegmentes im distalen Bereich des Verbindungsciliums von Photorezeptorzellen (Chaitin *et al.*, 1984; Chaitin und Bok, 1986; Chaitin und Burnside, 1989; Arikawa und Williams, 1989; Obata und Usukura, 1992; Usukura und Obata, 1996; Watanabe *et al.*, 1999) sind mit dem Aktin-Bündel-Protein α -Aktinin verbunden und sollen mit Myosin II während der Neuformierung von Diskmembranen interagieren (Arikawa und Williams, 1989; Chaitin und Coelho, 1992; Williams und Roberts, 1992). Weiterhin sind Aktinfilamente entlang der Cilienmembran lokalisiert (Wolfrum und Schmitt, 1999; Wolfrum *et al.*, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Hier dienen die Filamente mit dem assoziierten Motor Myosin VIIa dem Vesikeltransport des visuellen Sehpigments Rhodopsin vom Innen- ins Außensegment (Liu *et al.*, 1997; Wolfrum und Schmitt, 1999; Liu *et al.*, 1999a; Wolfrum und Schmitt, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Myosin VIIa ist ein unkonventionelles Myosin der Klasse VII, welches das Genprodukt des Usher-Syndrom Gens 1B darstellt (Weil *et al.*, 1995). Ein Defekt im Gen für Myosin VIIa, welches

unter anderem in der Retina und im Innenohr exprimiert wird, führt zum Usher-Syndrom (Typ 1B), einer erblichen Kombination von Taub- und Blindheit (Usher, 1914; Wolfrum und Schmitt, 1999; Liu *et al.*, 1999a; Wolfrum *et al.*, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001; Boeda *et al.*, 2002).

1.1.2. Intermediärfilamente

Intermediärfilamente (IFs) sind unpolare Polymere und werden von faserigen Skleroproteinen – den IF-Proteinen – gebildet, deren Monomere selten frei in der Zelle anzutreffen sind (z.B. saure und basische Keratine, Vimentine, Desmine oder im Nukleus Lamine). Es wurden bisher 65 Gene nachgewiesen, die für IF-Proteine codieren. 49 davon sind Keratine, welche die größte Untergruppe innerhalb der IF-Proteine darstellen (Hesse *et al.*, 2001). Die IF-Proteine zeigen, im Gegensatz zu den evolutiv hoch-konservierten Proteinen der anderen Filamenttypen, eine hohe Diversität. Sie weisen ein gewebsspezifisches und von der Zelldifferenzierung abhängiges Expressionsmuster auf. Intermediärfilamente sind immer in „coiled-coiled“-Strukturen organisiert (Strelkov *et al.*, 2003). Dieses komplexe Protein-Netzwerk erstreckt sich vom Zellkern bis hin zur Plasmamembran und ist hauptsächlich für die Form und Reißfestigkeit der Zelle verantwortlich. Daneben heftet das Netzwerk an Desmosomen an, interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen und cytoplasmatischen Strukturen und übermittelt möglicherweise sogar Informationen (Goldman *et al.*, 1986; Nigg, 1992; Kouklis *et al.*, 1994). In Zellen sind Intermediärfilamente oftmals mit weiteren Cytoskelettelementen wie Aktin oder Mikrotubuli assoziiert (Herrmann *et al.*, 2000; Yoon *et al.*, 2001).

1.1.3. Mikrotubuli

Mikrotubuli sind wie Aktinfilamente universelle Bestandteile eukaryotischer Zellen. Jeder Mikrotubulus besteht aus Untereinheiten, die ihrerseits aus Heterodimeren von α -Tubulin- und β -Tubulinmonomeren gebildet werden, die sich zu Protofilamenten zusammenlagern und anschließend zu einem Tubulus zusammengefügt werden (Wade und Hyman, 1997). Mikrotubuli sind polarisierte Strukturen mit einem Plus-Ende, an dem vorzugsweise der Auf- und Abbau der Mikrotubuli erfolgt und einem Minus-Ende, das mit speziellen Strukturen assoziiert ist. Sie bilden die Grundlage für zahlreiche zelluläre Bewegungsformen, wie beispielsweise das Schlagen von Cilien und Flagellen oder den

intrazellulären Transport von Membranvesikeln. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle in den mitotischen Spindeln (McIntosh und Hering, 1991; Wade und Hyman, 1997). Die verschiedenen Bewegungen beruhen entweder auf der Polymerisation und Depolymerisation der Mikrotubuli oder auf der Aktivität von molekularen Motoren (Fox und Sale, 1987; Witman, 1992). Der Transport von Vesikeln, Proteinen und Organellen entlang der Mikrotubuli wird von zwei Familien von Motorproteinen – Kinesinen und Dyneinen – bewerkstelligt (Downing und Nogales, 1998; Nogales, 1999; Rosenbaum, 2000; Karsenti und Vernos, 2001; Kamal und Goldstein, 2002; Asbury *et al.*, 2003). Nahezu alle Kinesine sind für den anterograden Transport zum Plus-Ende der Mikrotubuli zuständig. Dyneine hingegen übernehmen den retrograden Transport zum Minus-Ende (Porter und Johnson, 1989; Porter *et al.*, 1999). Das Plus-Ende der Mikrotubuli wächst in die Peripherie der Zelle, während das Minus-Ende im Zentrum der Zelle in das Mikrotubuliorganisationszentrum (MTOC) eingebettet ist (Wade und Hyman, 1997). MTOCs organisieren die Anzahl, die Polarität und die Richtung der neu entstehenden Mikrotubuli. MTOCs erfüllen in vielen verschiedenen Organismen die gleiche Funktion, unterscheiden sich jedoch erheblich in ihrer Morphologie voneinander. Mit der Ausnahme von Pflanzen organisieren die meisten Zellen ihr Mikrotubuli-Cytoskelett in einem MTOC, wie dem Spindelpolkkörper (SPB) in *Saccharomyces cerevisiae* (Abb. 1.1) (Adams und Kilmartin, 2000; (Marshall und Rosenbaum, 2000)), dem Basalkörper von Cilien und Flagellen einzelliger Organismen (Baron *et al.*, 1992; Koblenz *et al.*, 2003; Dutcher, 2003) oder dem Centrosom in tierischen Zellen (Callaini *et al.*, 1999; Marshall und Rosenbaum, 2000; Dammermann und Merdes, 2002; Bornens, 2002; Ou *et al.*, 2004; Varmark, 2004; Delattre und Gonczy, 2004).

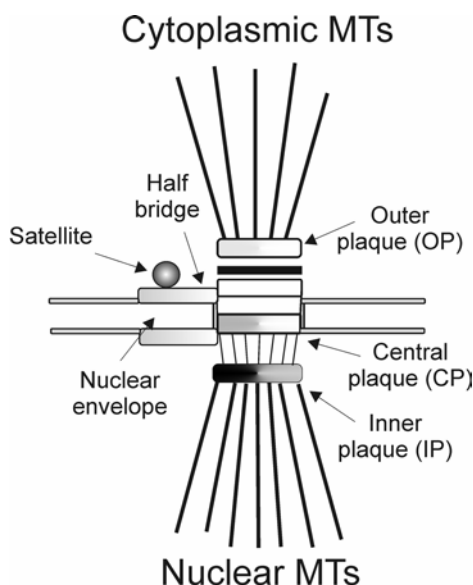


Abbildung 1.1 Schematische Darstellung des Spindelpolkkörpers von *S. cerevisiae*

Der Spindelpolkkörper (SPB) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist in drei Platten („Plaque“) aufgebaut (Byers, 1981b). Während die äußere (OP) und die innere Platte (IP) für die Organisation der cytoplasmatischen und der nukleären Mikrotubuli (MT) verantwortlich sind, dient die zentrale Platte (CP) der Verankerung des SPBs in der Kernmembran.

Die Centrosomen von tierischen Zellen bestehen aus einem Paar von Centriolen, die senkrecht zueinander stehen und die von dem pericentriolären Material (PCM) umgeben sind (Abb. 1.2) (Kellogg *et al.*, 1994; Mack *et al.*, 2000; Doxsey, 2001).

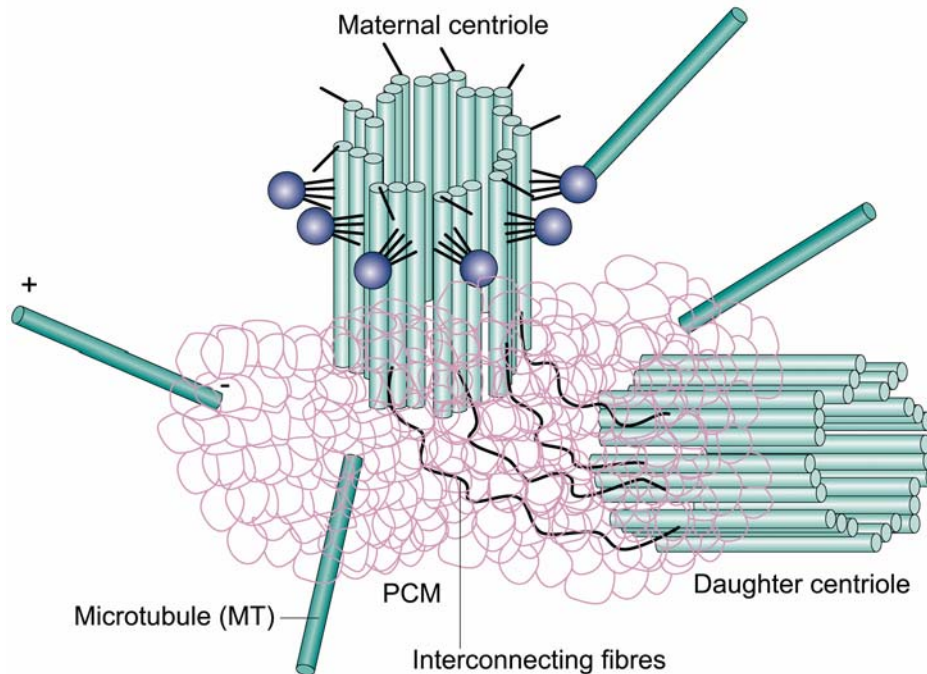


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des Centrosoms von Vertebraten

Das Zentrum des Centrosoms wird durch die beiden rechtwinklig zueinander ausgerichtete Mutter- und Tochter-Centriole gebildet. Umgeben werden die zwei Centriolen vom pericentriolären Material (PCM), dem die Mikrotubuli (MT) entspringen [verändert nach Doxsey (2001)].

Das PCM besitzt abhängig vom Stadium des Zellzyklus ein einzelnes Centriol oder ein Centriolenpaar (Mack *et al.*, 2000). Während der Mitose (Interphase) verdoppelt sich das Centrosom und bildet die Spindelpole, die den mitotischen Apparat bilden, welcher jeweils ein Centriolenpaar besitzt (Salisbury *et al.*, 2002). Die Mikrotubuli der Zelle entspringen alle dem PCM und haben ihren Ursprung an Ringkomplexen aus γ -Tubulin, welches als Basis für das Wachstum der Mikrotubuli dient (Horio *et al.*, 1991; Stearns *et al.*, 1991; Zheng *et al.*, 1991; Spang *et al.*, 1996). Über den Aufbau des PCM ist bislang wenig bekannt, obwohl eine Vielfalt von Proteinen identifiziert wurden, die mit dem PCM assoziiert sind (Mack *et al.*, 2000; Bornens, 2002; Ou *et al.*, 2004). Zu diesen Proteinen gehören beispielsweise AKAP450, Pericentrin, Ninein, verschiedene Proteinkinasen, Phosphatasen und Hitzeschock-Proteine (Bouckson-Castaing *et al.*, 1996; Mack *et al.*, 2000; Helps *et al.*, 2000; Bornens, 2002). Als ein weiterer Bestandteil des PCM und von

Centriolen konnten sehr feine Cytoskelettelemente identifiziert werden, so genannte Nanofilamente (Salisbury, 1995). Ein bekannter Vertreter dieser Nanofilamente, die auch als nicht-Aktinfilamente bezeichnet werden, ist Centrin, welches zuerst in der einzelligen Grünalge *Tetraselmis striata* identifiziert wurde (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1984).

1.2. Das Nanofilament Centrin

Zusätzlich zu den drei Hauptkomponenten enthält das Cytoskelett weitere Proteine, deren allgemeine Verbreitung erst in den letzten Jahren durch die Anwendung der indirekten Immunofluoreszenz bekannt wurde. Zu dieser Gruppe gehören die so genannten unkonventionellen, fibrillären Cytoskelettelemente, die mit einem Durchmesser von 2 bis 4 nm wesentlich feinere Filamente aufbauen als z.B. Aktin und als dünne Nonaktinfilamente, „*superfine filaments*“ oder Nanofilamente bezeichnet werden. Ein Beispiel solcher Proteine wurde in den Spermien bei *Ascaris suum* beschrieben, die Pseudopodien ausbilden (Roberts und King, 1991; Roberts und Stewart, 2000; Buttery *et al.*, 2003). Es wurde „*Major Sperm Protein*“, kurz MSP benannt (Roberts und King, 1991). Ein weiteres Nonaktinfilament findet man bei *Vorticella*, einem sessilen Ciliaten, der mit einem Stiel an festem Untergrund angeheftet ist (Hoffmann-Berling, 1958; Amos, 1975; Routledge *et al.*, 1975; Asai *et al.*, 1978). Der kontraktile Teil des Stiels wird Spasmonem genannt und besteht aus einem Protein namens Spasmin. Das Spasmonem ist in der Lage, sich ATP-unabhängig, aber bei Erhöhung der Calcium (Ca^{2+})-Konzentration, zu kontrahieren (Asai *et al.*, 1978; Fang *et al.*, 2004). Untersuchungen mit Antikörpern gegen Spasmin und Centrin sowie Sequenzvergleiche weisen darauf hin, dass es sich bei Spasmin um eine besondere Form von Centrin, einem weiteren Nanofilament in Grünalgen, handeln könnte (Schiebel und Bornens, 1995; Levy *et al.*, 1996; Itabashi *et al.*, 2003).

Centrin wurde zuerst als Hauptkomponente der kontraktilen Flagellenwurzel bei *Tetraselmis striata*, einer einzelligen Grünalge, identifiziert (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1984). Centrine gehören zu der Parvalbumin Überfamilie von Ca^{2+} -bindenden EF-Hand Proteinen. Einige Proteine dieser Überfamilie dienen in der Zelle als intrazelluläre Rezeptoren für den „*second Messenger*“ Ca^{2+} , der durch diese Proteine selektiv gebunden wird. Hierbei ist z.B. das Protein Troponin (TN) zu nennen. Troponin kommt in der quergestreiften Muskulatur vor und besteht aus drei Untereinheiten TN-C, TN-T und TN-I. Durch die Bindung von Ca^{2+} an Troponin C (TN-C) kommt es zu einer

Konformationsänderung des Proteinkomplexes, durch den die Kontraktion der Vertebratenmuskulatur reguliert wird. Ein weiteres Protein dieser Familie ist das Calmodulin. Durch die Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen und der anschließenden Konformationsänderung kann Calmodulin sich als Komplex an zahlreiche Enzyme und Effektorproteine anlagern und diese dabei aktivieren. Die Ca^{2+} -bindenden Zentren von Calmodulin, Centrin und verwandten Ca^{2+} -bindenden Proteinen werden als EF-Hand Motive bezeichnet. Diese binden Ca^{2+} über ein „*helix-loop-helix*“ Motiv, welches an eine greifende Hand erinnert und deshalb mit den beiden flankierenden Helices E und F (Daumen und Zeigefinger) als EF-Hand Motiv bezeichnet wird.

Centrine besitzen wie Calmodulin vier EF-Hand Motive und sind in der Literatur auch als „Caltractine“ bekannt (Huang *et al.*, 1988). Sie sind saure Phosphoproteine mit einem Molekulargewicht (MW) von ca. 20 Kilodalton (kDa) und einer Länge von ungefähr 170 Aminosäuren. Obwohl Centrin mittlerweile in mehreren Grünalgen (vor allem *Chlamydomonas*) untersucht wurde, konnte immer nur ein Centrin-kodierendes Gen identifiziert werden. Das aus dem Gen entstehende Protein bildet in Grünalgen Filamentbündel aus, die u.a. Bestandteile der Cilienwurzeln sind. Diese Centrin-Filamentbündel beinhaltenden Wurzeln entspringen dem Basalkörperapparat, ragen in den Zellkörper hinein und weiten sich zur Plasmamembran, zum Nukleus und zu anderen Organellen hin aus (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1987; Schulze *et al.*, 1987; Salisbury *et al.*, 1988; Salisbury, 1989; Ruiz-Binder *et al.*, 2002). In *Chlamydomonas* ist Centrin in Filamenten lokalisiert, die den Basalkörperapparat mit dem Nukleus verbinden (Salisbury *et al.*, 1987; Schulze *et al.*, 1987). Zusätzlich verbinden Centrin-Filamente die zwei Basalkörper miteinander (McFadden *et al.*, 1987). Weiterhin findet man Centrin in den sternförmigen Filamenten der Übergangszone zwischen den Basalkörpern und den Axonemen der Flagellen (Sanders und Salisbury, 1989). Das Centrin-Filamentsystem in Grünalgen ist zu Ca^{2+} -induzierten Kontraktionen fähig, welche auf Konformationsänderungen von Centrinen beruhen. Diese Kontraktionen sind nur Ca^{2+} und nicht ATP-abhängig (Salisbury *et al.*, 1984; Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995). Ca^{2+} -abhängige Kontraktionen in den sternförmigen Filamenten innerhalb der Übergangszone induzieren die Trennung der Mikrotubuli und dadurch den Abwurf der Flagellen („*flagella excision*“) (Salisbury *et al.*, 1984; Sanders und Salisbury, 1989; Wright *et al.*, 1989; Coling und Salisbury, 1992; Taillon *et al.*, 1992; Sanders und Salisbury, 1994; Baron *et al.*, 1995). Solche Mechanismen könnten eine wichtige Rolle bei der Ablösung der Mikrotubuli von den Centrosomen an den MTOCs von höheren Eukaryoten spielen

(Schatten, 1994). Weiterhin ist Centrin in den Grünalgen an der Duplikation der Basalkörper beteiligt (Hayashi *et al.*, 1998; Koblenz *et al.*, 2003). Seit der Entdeckung von Centrin in Grünalgen führten genetische Untersuchungen zur Identifikation einer Vielzahl von Centrin-Genen in verschiedenen eukaryotischen Organismen (Baum *et al.*, 1986; 1988; Huang *et al.*, 1988; Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Madeddu *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997; Wottrich, 1998; Gavet *et al.*, 2003; Trojan, 2003). In niederen Organismen wie in Hefen, Grünalgen oder Ciliaten konnte bislang jeweils nur ein Centrin-Gen identifiziert werden (Baum *et al.*, 1986; 1988; Huang *et al.*, 1988; Guerra *et al.*, 2003). Dem gegenüber steht das Genom von Maus und Ratte, wo mindestens vier Gene für Centrine codieren. Das menschliche Genom besitzt mindestens drei Gene für Centrine (Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Middendorp *et al.*, 1997; Gavet *et al.*, 2003). Es ist davon auszugehen, dass womöglich in allen Säugern vier Centrin-Isoformen existieren.

Verwandtschaftsverhältnisse der einzelnen Centrine zueinander wurden mit Aminosäuresequenzanalysen untersucht und in einem Phylogramm dargestellt (Abb. 1.3).

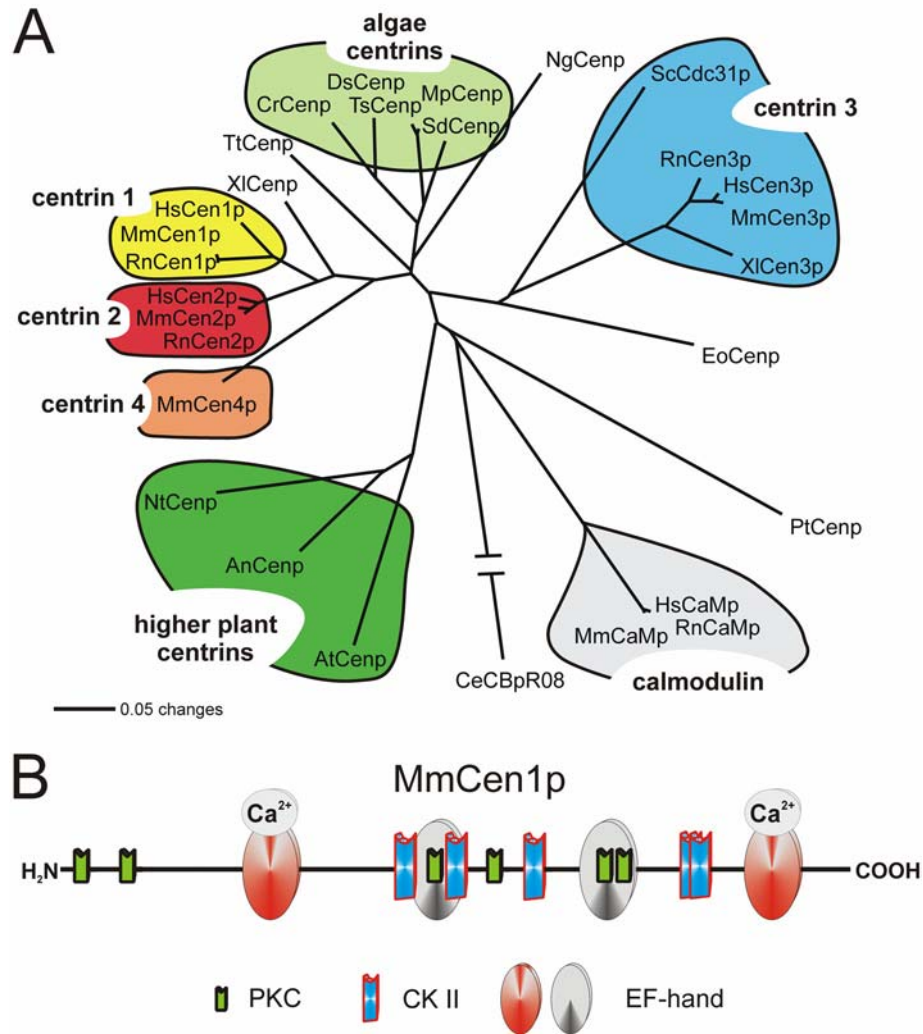


Abbildung 1.3 Phylogenetische Verwandtschaft verschiedener Centrine und das Centrin Strukturmotiv von Maus-Centrin 1

(A) Vergleich von 29 verschiedenen Aminosäuresequenzen (mit den Programmen OMIGA und PAUP*4.0) von Centrinen und Calmodulinen aus diversen Spezies nach der „Neighbour-Joining“-Methode (Saitou und Nei, 1987). Die Länge der Verzweigungen entspricht der verwandtschaftlichen Entfernung (0,05 „changes“ = 5% durchschnittliche genetische Distanz) der Proteine. Dies ist in diesem Phylogramm, welches mit den Aminosäuresequenzen der Proteine berechnet wurde, dargestellt. Paup gliedert die Centrine in Untergruppen der Centrin-Isoformen 1 (gelb), 2 (rot), 3 (blau), und 4 (orange), Algen-Centrine (hellgrün); Centrine der höheren Pflanzen (dunkelgrün) und in eine Gruppe von Calmodulinen (grau). Auffällig ist die nahe Verwandtschaft der Vertebraten-Centrine 1, 2 und 4. Centrin 3 hingegen zeigt eine deutliche stärkere Verwandtschaft zu dem Centrin der Hefe (ScCdc31p) als zu den Isoformen der eigenen Spezies. Dies deutet auf zwei divergente Unterfamilien der Vertebraten-Centrine hin (Middendorp *et al.*, 1997). RnCaMp = *Rattus norvegicus* Calmodulin; MmCaMp = *Mus musculus* Calmodulin; HsCaMp = *Homo sapiens* Calmodulin; NgCenp = *Naegleria gruberi* Centrin; XlCenp = *Xenopus laevis* Centrin; XlCenp3 = *Xenopus laevis* Centrin 3; PtCenp = *Paramecium tetraueia* Centrin; DsCenp = *Dunaliella salina* Centrin; HsCen1p, 2p, 3p = *Homo sapiens* Centrin 1, 2, 3; MmCen1p, 2p, 3p, 4p = *Mus musculus* Centrin 1, 2, 3, 4; RnCen1p, 2p, 3p = *Rattus norvegicus* Centrin 1, 2, 3; AtCenp = *Arabidopsis thaliana* Centrin, AnCenp = *Atriplex nummularia* Centrin; NtCenp = *Nicotiana tabacum* Centrin; CrCenp = *Chlamydomonas reinhardtii* Centrin; SdCenp = *Scherffelia dubia* Centrin; MpCenp = *Micromonas pusilla* Centrin; EoCenp = *Euplotes octocarinatus*

Centrin; TsCenp = *Tetraselmis striata* Centrin; ScCdc31p = *Saccharomyces cerevisiae*; CeCBpR08 = *Caenorhabditis elegans*; TtCenp = *Tetrahymena thermophila*. Die verwendeten Sequenzen sind im Anhang Tab. 8.1 und 8.2 dargestellt. Dieses Phylogramm beinhaltet nicht alle identifizierten Centrin-Sequenzen in Flora und Fauna. **(B)** Schematische Darstellung der erwarteten Struktur von MmCen1p nach OMIGA. Centrine besitzen vier EF-Hand Motive (EF1-EF4). Sequenzanalysen und verschiedene Experimente zeigen, dass in Säugetier-Centrinen manche EF-Hand Motive (z.B. in MmCen1p EF2 und EF3) die Affinität zur Calciumbindung verloren haben. Zusätzlich zu der Regulation durch Calcium könnte die Funktion von Centrinen auch durch Phosphorylierungen reguliert werden. Die Phosphorylierungsstellen der Proteinkinase C (PKC) und Caseinkinase II (CKII) von MmCen1p sind hier schematisch dargestellt.

Die meisten Centrine höherer Pflanzen, Grünalgen und die vier Centrine der Vertebraten bilden phylogenetische Gruppen (Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004b). In Vertebraten sind die Isoformen 1, 2 und 4 nah miteinander verwandt, wohingegen die Isoform 3 eher mit dem Hefe-Centrin ScCdc31p eine Gruppe bildet. Dies deutet auf zwei divergente Unterfamilien der Vertebraten-Centrine hin (Middendorp *et al.*, 1997; Wolfrum *et al.*, 2002).

Centrine sind in Eukaryoten immer mit Centriolen in Basalkörpern, Centrosomen und mitotischen Spindelpolen verbunden (Byers, 1981b; Salisbury, 1989; Melkonian *et al.*, 1992; Zhu *et al.*, 1992; Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995; Delvecchio *et al.*, 1997; Allen *et al.*, 1998; Stoppin-Mellet *et al.*, 1999; Correa *et al.*, 2004). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist das Centrinhomolog ScCdc31p ein wichtiger Bestandteil des Hefe-Spindelpolkörpers, der als MTOC der Hefe zu verstehen ist (Byers, 1981a, 1981b; Baum *et al.*, 1986). In Cilien tragenden Zelltypen ist Centrin meist Bestandteil der Übergangszone und dem Basalkörperkomplex des Ciliums. Die Lokalisation von Centrin ist in einer schematischen Zeichnung in verschiedenen Zelltypen grün dargestellt (Abb. 1.4).

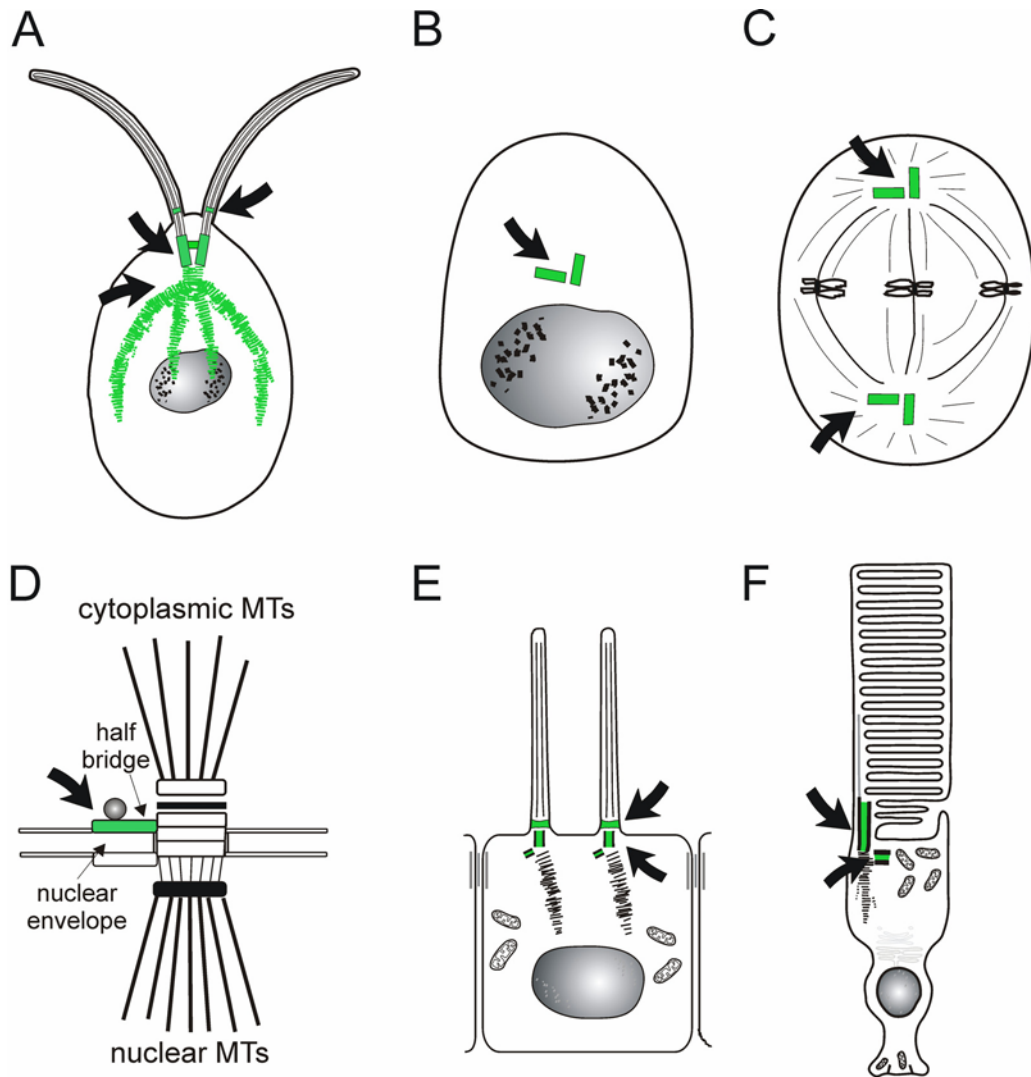
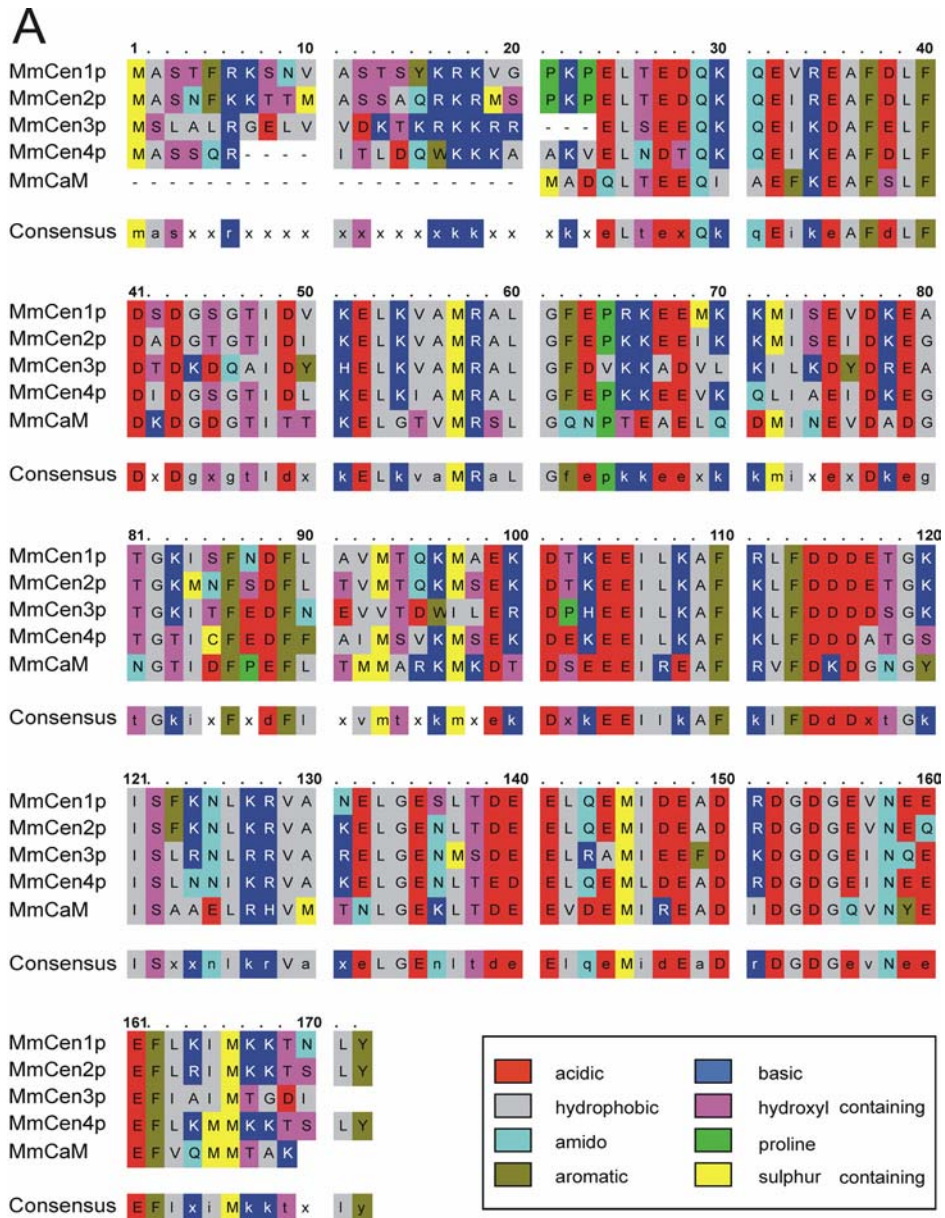


Abbildung 1.4 Centrinlokalisierung in verschiedenen Zelltypen

Die zelluläre Lokalisation von Centrin wird durch die grüne Färbung und durch die Pfeile angedeutet. Schematische Darstellung (A) einer einzelligen Grünalge (z.B. *Chlamydomonas reinhardtii*); (B) einer tierischen Zelle während der G₁ oder G₀-Phase; (C) während der Metaphase; (D) des Spindelpolkörpers der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, MT= Mikrotubuli; (E) einer ciliären Epithelzelle; (F) einer Photorezeptorzelle von Vertebraten. In der Hefe ist das Hefe-Centrin (ScCdc31p) mit der Halbbrücke („half-bridge“) des Spindelpolkörpers assoziiert. Diese Struktur dient in Hefen als MTOC. Centrin ist in der Regel an den MTOCs von Zellen, an den Centrosomen von tierischen Zellen und an dem mit Centrosomen verwandten Basalkörpern von Cilien lokalisiert. In Cilien ist Centrin auch Bestandteil der Übergangszone, die den Basalkörper mit dem Axonem verbindet.

Vergleicht man die Aminosäuresequenzen der unterschiedlichen Maus-Centrin-Isoformen aus NCBI („*National Center for Biotechnology Information*“), erkennt man, dass die Centrin-Proteinfamilie hoch konservierte Mitglieder enthält (Abb. 1.5).



B

	MmCen1p	MmCen2p	MmCen3p	MmCen4p	MmCaM
MmCen1p	-	81	52	67	51
Accession Np031619					
MmCen2p		-	52	70	50
Accession AAH13545					
MmCen3p			-	49	40
Accession Np031710					
MmCen4p				-	46
Accession Np665824					
MmCaM					-
Accession Ca43674					
			percent identity		

Abbildung 1.5 Vergleich von Maus-Centrin-Isoformen

(A) Das Proteinalignment der Maus-Centrin-Isoformen 1 bis 4 und Calmodulin zeigt, dass die Isoformen 1, 2 und 4 sehr hohe Identitäten aufweisen. Centrin 3 zeigt deutliche Unterschiede zu den anderen Isoformen, sowie zu dem Maus Calmodulin, welches zu Vergleichszwecken herangezogen wurde. Auffällig ist, dass sich die Centrine in den Anfangsbereichen (N-Terminus) unterscheiden. (B) Tabelle der genetischen Identitäten der Centrin-Isoformen in Prozent. Centrin 1 und 2 zeigen eine sehr enge Verwandtschaft (81% Identität), Centrin 4 mehr Ähnlichkeit zu Centrin 2 als zu 1 (70% zu 67%) und Centrin 3 zeigt nur ca. 50% Übereinstimmungen zu den anderen Centrin-Isoformen. Calmodulin, ein anderes EF-Hand Motiv Protein zeigt ca. 50% Identität zu den Centrinen.

Charakteristisch für alle Centrine sind die vier EF-Hand Motive, die theoretisch mit ihrer „*helix-loop-helix*“ Struktur jeweils ein Ca^{2+} -Ion binden können und damit Centrine als Mitglieder der Parvalbumin Überfamilie charakterisieren (Kretsinger, 1976a; Kretsinger, 1976b; Moncrief *et al.*, 1990; Nakayama *et al.*, 1992). Innerhalb der Centrine stellen diese EF-Hand Motive die am stärksten konservierten Bereiche dar (Wolfrum *et al.*, 2002; Gießel *et al.*, 2004b). Allerdings scheinen während der Evolution einige EF-Hand Motive die Fähigkeit zur Ca^{2+} -Bindung verloren zu haben. In Grünalgen binden Centrine mit ihren vier EF-Hand Motiven vier Calcium-Ionen, wobei zwei der EF-Hand Motive eine höhere Affinität zu Ca^{2+} besitzen als die anderen beiden (Coling und Salisbury, 1992; Weber *et al.*, 1994). In Vertebraten binden die Centrine 1 und 2 jeweils zwei Ca^{2+} -Ionen in den EF-Hand Motiven 1 und 4. Während dessen binden die Isoformen 3 und 4 wie auch das Hefe Centrin ScCdc31p nur noch ein Ca^{2+} -Ion in dem vierten EF-Hand Motiv (EF 4) (Abb. 4.21) (Salisbury, 1995; Middendorp *et al.*, 1997; Wottrich, 1998; Pulvermüller *et al.*, 2002; Gavet *et al.*, 2003). Weiterhin wird die Möglichkeit diskutiert, dass Centrin 2 Homodimere bildet und dabei nur noch ein Ca^{2+} -Ion bindet (Durussel *et al.*, 2000; Tourbez *et al.*, 2004).

Wie auch in anderen Proteinen mit EF-Hand Motiven (z.B. Calmodulin) (Barbato *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1993) kommt es in Centrinen nach der Ca^{2+} -Bindung wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung im Molekül (Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995; Wiech *et al.*, 1996; Durussel *et al.*, 2000). Anders als bei Calmodulin werden Centrin Moleküle nach der Ca^{2+} -Bindung etwas kompakter. Ca^{2+} aktivierte Vertebraten-Centrine können außerdem Dimere, Oligomere und Polymere bilden (Wiech *et al.*, 1996; Durussel *et al.*, 2000; Tourbez *et al.*, 2004; Gießel *et al.*, 2004a), welche das Grundgerüst für kontraktile Centrin-Filamente bilden könnten. Dies wurde bereits in Grünalgen beschrieben (Salisbury, 1995). Weiterhin steigert die Bindung von Ca^{2+} auch die Affinität von Centrinen zu anderen Interaktionspartnern (Geier *et al.*, 1996; Wiech *et al.*, 1996; Durussel *et al.*, 2000). Auf diese Weise könnte die spezielle Funktion von Centrinen in der Zelle reguliert werden. Zum Beispiel könnte Centrin wie Calmodulin als eine Art Ca^{2+} -Sensor in speziellen regulatorischen Prozessen dienen. Unter den Centrinen von verschiedenen Spezies sowie unter den verschiedenen Centrin-Isoformen gleicher Spezies weisen Centrine bei Sequenzanalysen die größten Unterschiede am N-Terminus auf (Abb. 1.5). Daher wird vermutet, dass diese Region sowohl für die unterschiedlichen Funktionen der Centrine in verschiedenen Spezies als auch unter den Isoformen gleicher Spezies verantwortlich ist (Bhattacharya *et al.*, 1993; Salisbury, 1995; Wiech *et al.*, 1996).

Ca²⁺-induzierte Polymerisationen von Centrinen zeigten, dass das N-terminale Ende für die Polymerisationen verantwortlich ist (Wiech *et al.*, 1996; Tourbez *et al.*, 2004).

Weiterhin weisen Sequenzanalysen von Centrinen neben den EF-Hand Motiven noch verschiedene Phosphorylierungsstellen auf, an denen Centrine durch Proteinkinasen phosphoryliert werden könnten [Abb. 1.3 (B) und Abb. 4.13]. Centrine besitzen Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinasen A (PKA), C (PKC) und die Caseinkinase II (CKII). Bisherige Untersuchungen an Grünalgen, Hefen und an den Centrosomen von Kultur- und Krebszellen zeigten zusätzliche Regulationsmechanismen der Ca²⁺-Bindungen durch Phosphorylierungen (Salisbury *et al.*, 1984; Martindale und Salisbury, 1990; Salisbury, 1995; Lingle *et al.*, 1998; Lutz *et al.*, 2001). Eine Hauptfunktion der Centrinphosphorylierung in Grünalgen wird bei der Kontraktion Centrin-haltiger Fibrillen vermutet, wobei die Dephosphorylierung bei der Kontraktion mit hohen Ca²⁺-Konzentrationen und die Phosphorylierung bei der Relaxtion mit niedrigen Ca²⁺-Konzentrationen in Zusammenhang gebracht wird (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1984; Martindale und Salisbury, 1990). Untersuchungen an Human-Centrinen deuten auf eine Phosphorylierung durch die PKA am C-terminalen Ende von Centrin 1 und 2 hin. Die Ergebnisse aus Lingle *et al.* (1998) explizieren eine Signalwirkung durch die Phosphorylierung von Centrin 2 für die Abgrenzung der Centrosomen während der Prophase im Zellzyklus.

In der Hefe *S. cerevesiae* wurde Centrin (ScCdc31p) als Protein des Gens CDC31 identifiziert (Baum *et al.*, 1986). Cdc31p spielt eine wichtige Rolle im Zellzyklus der Hefe und ist an der Regulation der Duplikation des Spindelpolkörpers beteiligt (Spang *et al.*, 1993; Schiebel und Bornens, 1995; Geier *et al.*, 1996; Wiech *et al.*, 1996; Khalfan *et al.*, 2000; Ivanovska und Rose, 2001; Paoletti *et al.*, 2003). Während des ersten Schrittes der Spindelpolkörperverdoppelung wird die Bindung von Cdc31p an Kar1p und Msp3 benötigt (Biggins und Rose, 1994; Spang *et al.*, 1995; Geier *et al.*, 1996; Jaspersen *et al.*, 2002). Weiterhin interagiert Cdc31p mit anderen Hefeproteinen wie der Kinase Kic1p und dem Protein Sfi1p, welche beide in die Duplikation des Spindelpolkörpers involviert sind (Sullivan *et al.*, 1998; Khalfan *et al.*, 2000; Kilmartin, 2003).

In Vertebraten werden bestimmte Centrin-Isoformen ubiquitär exprimiert und sind mit Centriolen von Centrosomen und Basalkörper assoziiert (Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995). In Säugetieren findet man vier Isoformen von Centrinen, die sich in zwei Untergruppen aufteilen lassen (Abb. 1.3) (Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Madeddu *et al.*, 1996; Meng *et al.*, 1996; Levy *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997;

Wottrich, 1998; Gavet *et al.*, 2003). Das Auftreten von mindestens vier Centrin-Isoformen in Säugern lässt unterschiedliche zelluläre Lokalisationen und Funktionen in der Zelle vermuten. Bislang ist darüber wenig bekannt. Die meisten Untersuchungen zur Lokalisation von Centrinen wurden mit mono- oder polyklonalen Antikörpern gegen Grünalgen-Centrin durchgeführt, die nicht zwischen den Centrin-Isoformen der Säugetiere diskriminieren konnten. Mit Hilfe dieser Antikörper wurde Centrin in den Centriolen von Centrosomen und in der centriolären Matrix markiert (Salisbury *et al.*, 1988; Baron *et al.*, 1991; 1992). Erst in letzter Zeit wurden Antikörper generiert, die wahrscheinlich zwischen den Isoformen Centrin 2, 3 und 4 unterscheiden und nicht mit den anderen Isoformen kreuzreagieren (Middendorp *et al.*, 1997; Laoukili *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2001; Gavet *et al.*, 2003). Leider konnte noch kein Antikörper generiert werden, der spezifisch die Isoformen 1 detektiert (Laoukili *et al.*, 2000). Mittels RT-PCR-Experimenten (kombinierte Reverse Transkription mit „polymerase-chain-reaktion“) mit Isoform-spezifischen Primern war es jedoch möglich, die Expression der einzelnen Isoformen durch den Nachweis ihrer mRNA in verschiedenen Geweben aus Mäusen, Ratten und Menschen zu untersuchen. Problematisch bei solchen Analysen ist nur das Centrin 1, welches keine Introns besitzt und deshalb auch aus genomischer DNA amplifiziert werden kann (Abb. 1.6).

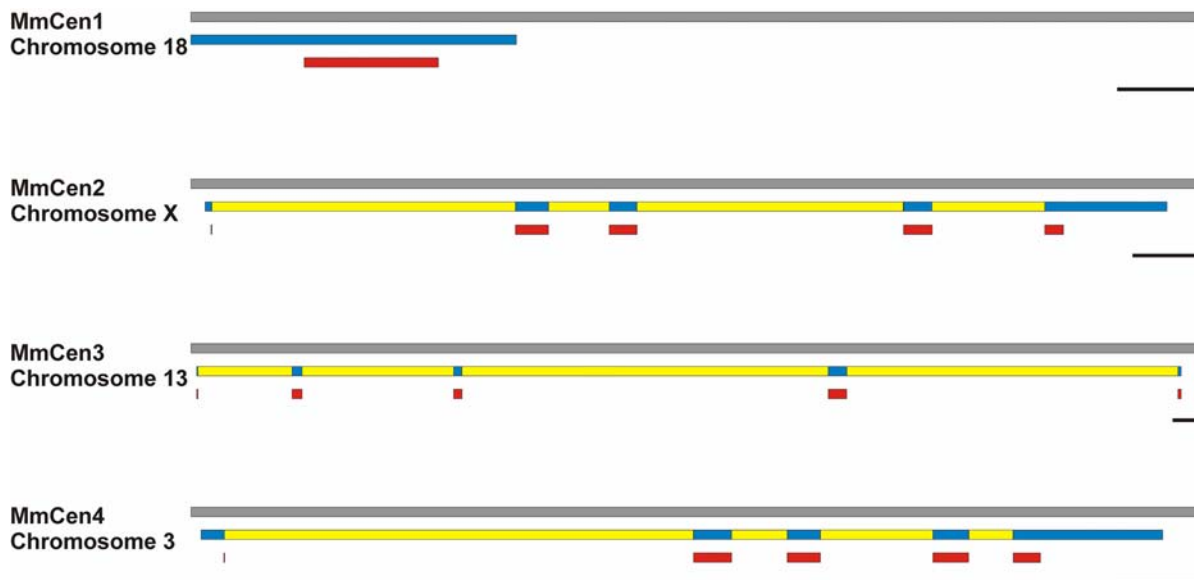


Abbildung 1.6 Aufbau der DNA und mRNA der Maus-Centrin-Isoformen 1 bis 4

Die Abbildung zeigt den Aufbau der Centrin-Gene (grau) auf den verschiedenen Chromosomen des Mäuse-Genoms. Die jeweiligen nachgewiesenen mRNA-Klone sind in gelb und blau dargestellt. Die blauen Abschnitte markieren die Exons, während die gelben Abschnitte die Introns darstellen. Die darunter liegenden roten Abschnitte zeigen den Bereich eines Exons, der wirklich in die Aminosäuresequenz translatiert wird. Größenbalken (schwarz): 300 Basenpaare (bp).

Zusammenfassend deuten die bislang durchgeführten Expressionsanalysen mit RT-PCR-Experimenten auf eine ubiquitäre Expression der Isoformen 2 und 3 hin, während die Expression von Centrin 1 und 4 auf ciliäre Zellen beschränkt ist (Wolfrum und Salisbury, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Gavet *et al.*, 2003). Studien der subzellulären Lokalisation von Centrinen mit Antikörpern zeigten, dass Centrin1p/Centrin2p und Centrin3p im inneren Lumen der Centriolen von Centrosomen oder Basalkörpern lokalisiert sind. Weiterhin wird in Gavet *et al.* (2003) die Expression von Centrin4p im Gehirn nachgewiesen, wo es im Basalkörper von verschiedenen ciliären Zelltypen lokalisiert ist. Dies ist ein Indiz dafür, dass Centrin1p und Centrin4p Funktionen in Cilien und Flagellen besitzen, wo sie z.B. an dem Schlagmechanismus von Cilien beteiligt sein könnten. Diese Hypothese wird durch den Befund in *Tetrahymena* unterstützt, wo Centrin als leichte Kette von Dynein im Cilium vorkommt (Laoukili *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2003). Die ubiquitär exprimierten Centrine an den Centrosomen und den Basalkörpern spielen bei der Zellteilung eine wichtige Rolle (Schatten, 1994; Middendorp *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000; Lutz *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2002; Rice und Agard, 2002; Koblenz *et al.*, 2003; Higginbotham *et al.*, 2004).

Centrine konnten auch als Bestandteile sehr spezialisierter Gewebe und Zelltypen, wie beispielsweise der Retina und deren Photorezeptorzellen, identifiziert werden. Dort sind sie an den Centrosomen in der Ganglienzellschicht, der inneren Körnerschicht und vor allem im Verbindungscilium mit dem Basalkörperkomplex der Photorezeptorzellen lokalisiert (Wolfrum und Salisbury, 1995; Wolfrum, 1995; Wolfrum, 1998). Das Verbindungscilium stellt die einzige Verbindung zwischen dem Außensegment, dem Ort der Signaltransduktion und dem Innensegment, in dem die Proteinexpression stattfindet, dar.

1.3. Morphologie und Histologie des Säugerauges

Das primäre Untersuchungsobjekt dieser Arbeit ist die Netzhaut (Retina) von Säugetieren. Deshalb soll hier auf den Aufbau des Auges und der Retina bei Vertebraten eingegangen werden.

Lebende Organismen stehen in ständigem Kontakt und Informationsaustausch mit ihrer Umwelt. Sie sind bestrebt Informationen, also Sinneseindrücke, über ihre Umwelt zu erhalten, um sich ihrem Lebensraum optimal anzupassen. Sinneszellen sind modalitätsspezifisch, d.h. sie sind auf die Aufnahme eines adäquaten Reizes ausgerichtet. Nach der Reizmodalität werden die Sinneszellen in Mechanorezeptoren, Chemorezeptoren, Photorezeptoren, etc. klassifiziert. Bei Vertebraten sind trotz der funktionellen Diversität der

Sinneszellen die reizaufnehmenden und signalwandelnden Bereiche in der Regel auf zwei Grundstrukturen zurückzuführen: Stereocilien, die auf einem Cytoskelett aus Aktinfilamenten beruhen (mechanosensitive Haarzellen) oder modifizierte nicht-motile Cilien mit einem charakteristischen Mikrotubuli-Cytoskelett (Photorezeptorzellen, olfaktorische Rezeptorzellen). Den modifizierten Cilien in Photorezeptorzellen fehlt im Gegensatz zu motilen Cilien das zentrale Mikrotubuli-Paar und assoziierte Strukturen wie Radialspeichen und die Dynein-Arme (Rohlich, 1975; Besharse und Horst, 1990; Witman, 1990; King und Witman, 1990; King *et al.*, 1991; Usukura und Obata, 1996). Die Sinneszellen des Flimmerepithels und der Retina können aufgrund ihres ciliären Cytoskeletts auch als ciliäre Sinneszellen bezeichnet werden (Wolfrum, 1998). Der Sehsinn nimmt bei Säugern eine wichtige Stellung ein.

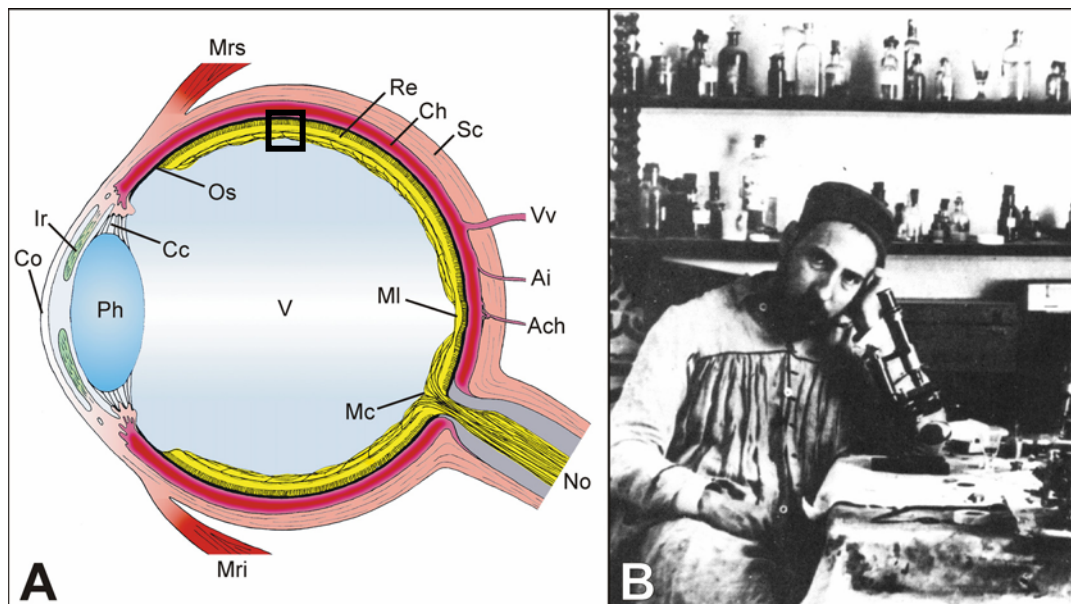


Abbildung 1.7 Aufbau des Säugerauges und Photographie von Ramón y Cajal

(A) Schematischer Medianschnitt durch ein Säugerauge (Zeichnung J. Harf). Das Rechteck markiert den Bereich der Retina, der in Abb. 1.9 vergrößert dargestellt ist. Arteria choroideae (Ach), Arteria iridis (Ai), Corpus ciliare (Cc), Choroidea (Ch), Kornea (Co), Iris (Ir), Macula caecus (Mc = blinder Fleck), Macula lutea (MI), Musculus rectus inferior (Mri); Musculus rectus superior (Mrs), Nervus opticus (No), Ora serrata (Os), Phakos (Augenlinse, Ph), Retina (Re), Sklera (Sc), Vitreus (Glaskörper, V), Vena vorflosa (Vv). (B) Die Photographie zeigt den spanischen Wissenschaftler Ramón y Cajal (ca. 1890), der die Retina der Säuger schon 1892 in ihrem mehrschichtigen Aufbau mit erstaunlicher Detailgenauigkeit festhielt (Ramón y Cajal, 1892a) [Abb. 1.8 (A)].

Mit dem Sehsinn wird ein ganz bestimmter Bereich des elektromagnetischen Wellenspektrums, das „sichtbare Spektrum“ wahrgenommen, welches bei verschiedenen Spezies unterschiedlich ist.

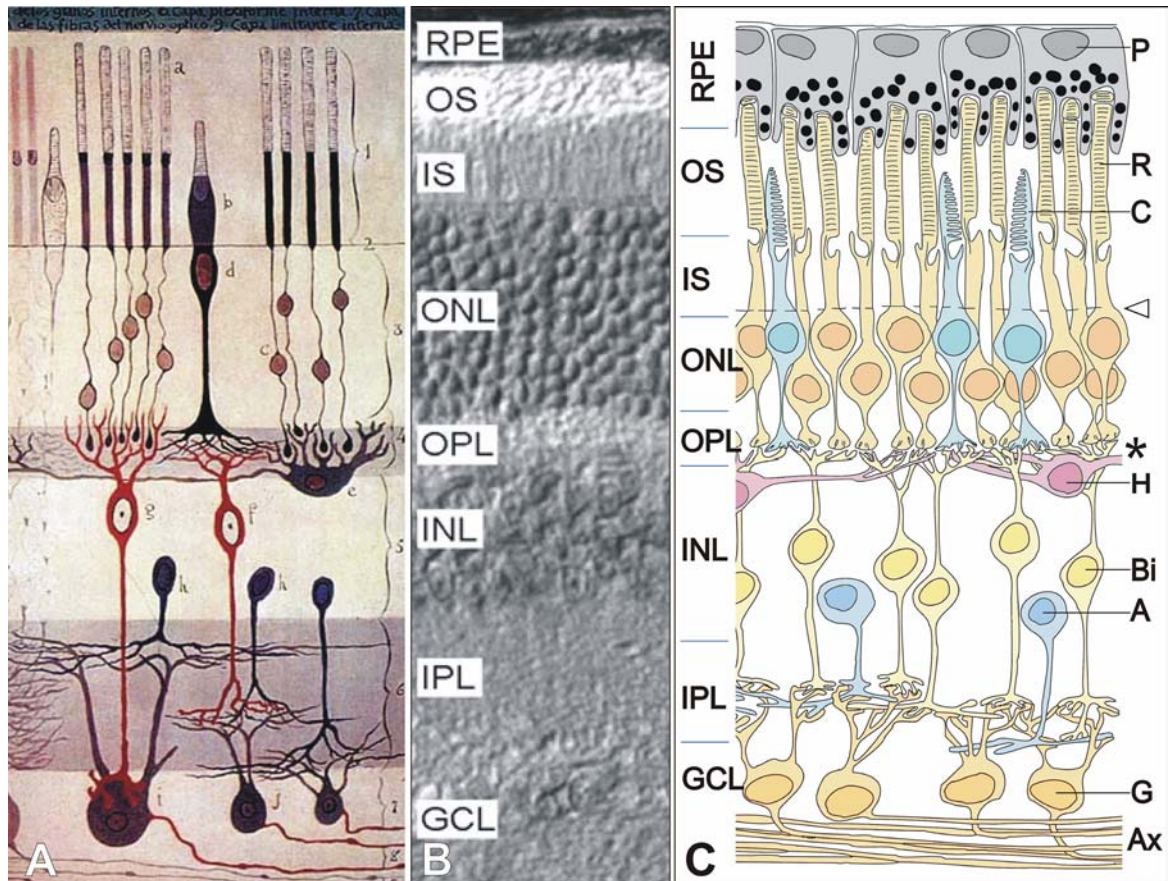


Abbildung 1.8 Der Aufbau der Säugetierretina

(A) Die Retina der Säuger zeigt einen mehrschichtigen Aufbau, welchen bereits der spanische Wissenschaftler Ramón y Cajal im Jahr 1892 mit erstaunlicher Detailgenauigkeit festhielt (Ramón y Cajal, 1892b). (B) Darstellung des Retina-Aufbaues anhand einer differentiellen Interferenzkontrast Aufnahme (DIK) eines longitudinalen Schnittes durch die Retina einer Maus. Die Außen- (OS = „*outer segment*“) und Innensegmente (IS = „*inner segment*“) der Photorezeptorzellen bilden den äußersten Bereich aus (Photorezeptorzellschicht). Mit ihren apikalen Bereichen ragen die OS zwischen die Ausläufer des einschichtigen retinalen Pigmentepithels (RPE). Auf die Photorezeptorzellschicht folgt die äußere Körnerschicht (ONL = „*outer nuclear layer*“) mit den Zellkernen der Photorezeptorzellen. Die äußere plexiforme Schicht (OPL = „*outer plexiform layer*“) wird durch die Synapsen der Photorezeptorzellen mit den nachgeschaltete Horizontal- und Bipolarzellen gebildet. Die Perikaryen der Horizontal- und Bipolarzellen bilden die innere Körnerschicht (INL = „*inner nuclear layer*“), auf welche die innere plexiforme Schicht (IPL = „*inner plexiform layer*“) folgt. Abschließend ist die Ganglienzellschicht (GCL = „*ganglion cell layer*“) gezeigt. (C) Schematische Darstellung eines Querschnittes durch die Säugerretina (Zeichnung J. Harf). Ganz oben ist das retinale Pigmentepithelium mit seinen Melanosomen (schwarz) zu sehen. Nach unten (Richtung Glaskörpers) schließen sich die in (C) bereits beschriebene Schichten an. Die einzelnen dargestellten Zelltypen sind Amakrinzellen (A), Axone der Ganglienzellen (Ax), Bipolarzellen (Bi), Zapfen-Photorezeptorzellen (C), Ganglienzellen (G), Horizontalzellen (H), Zellen des RPE (P), Stäbchen Photorezeptorzellen (R); die Pfeilspitze zeigt auf die Limitans externa, welche durch Müllerzellen gebildet wird (hier nicht gezeigt); der Stern markiert die Höhe, auf welcher die besonderen „*ribbon-Synapsen*“ der Stäbchen und Zapfen liegen.

Beim Menschen umfasst das „sichtbare Spektrum“ Wellenlängen von etwa 380 nm (violett/blau) bis ca. 760 nm (rot) (Luo, 2000). Die Perzeption dieser elektromagnetischen Wellen findet in der Retina, dem sensorischen Teil des Auges statt. Die Retina stammt ontogenetisch von einer Ausstülpung des Zwischenhirns (Diencephalon) ab und ist somit Bestandteil des Zentralen Nervensystems (Mann, 1964; Leonhardt, 1990; Wehner und Gehring, 1995). Die mannigfaltigen Leistungen der Retina basieren auf einer Vielzahl an Nervenzellen mit unterschiedlichen morphologischen und funktionellen Ausprägungen, die miteinander auf komplexe Weise verschaltet sind (Peichl, 1991; Wässle und Boycott, 1991; Brandstätter *et al.*, 1998). Die eigentliche Detektion elektromagnetischer Wellen leisten spezielle Sensorzellen der Retina, die Lichtsinneszellen (Photorezeptoren). Von der Netzhaut wird die primäre Bildinformation über den Nervus opticus (Sehnerv) an das Gehirn weitergeleitet (Czihak *et al.*, 1996). Bei der Lichtperzeption werden zunächst alle neuronalen Zellschichten der Retina vom Licht durchdrungen, bis die lichtempfindlichen Photorezeptoren erreicht werden. Man spricht deshalb vom „inversen Auge“ der Vertebraten, weil die Photorezeptorzellen dem Licht abgewandt sind. Die Photorezeptorzellen bestehen aus Innen- und Außensegment, die die äußerste Schicht der Retina, die so genannte Photorezeptorzellschicht, bilden. In den Außensegmenten werden die Membranstapel gebildet, an denen die Proteine der Signaltransduktion lokalisiert sind (Abb. 1.10). Die Photorezeptorzellen ragen mit ihrem apikalen Ende zwischen die Ausläufer des einschichtigen retinalen Pigmentepithels (Abb. 1.8, Abb. 1.9). An den Innensegmenten der Photorezeptorzellen grenzt die äußere Körnerschicht an, die von den Zellkernen der Photorezeptorzellen gebildet wird. In der äußeren plexiformen Schicht befinden sich die Synapsen der Photorezeptorzellen und der nachgeschalteten Neurone. Durch die synaptische Übertragung wird das transduzierte optische Signal auf die nachgeschalteten Bipolar- und Horizontalzellen übertragen. Nach der inneren Körnerschicht, die aus den Perikaryen der Horizontal-, Bipolar- und Amakrinzellen besteht, folgt die innere plexiforme Schicht. Von der Ganglienzellschicht aus führen die Axone zusammen und bilden den optischen Nerv (Kolb, 1991; Oyster, 1999; Kolb, 2003; Stevens und Lowe, 2004).

1.4. Aufbau der Photorezeptorzellen

Um die Besonderheiten der Photorezeptorzellen in der Retina zu erläutern, soll hier auf den ungewöhnlichen Aufbau der hoch polaren Zellen eingegangen werden. Photorezeptorzellen zeigen eine sowohl morphologische als auch funktionelle Gliederung in ein Außen- und

Innensegment, welche durch ein modifiziertes Cilium verbunden (engl. „*connecting cilium*“) sind. Die äußere Körnerschicht setzt sich aus den Perikaryen der Photorezeptorzellen zusammen und die Synapsen der Photorezeptoren sind in der darauf folgenden äußeren plexiformen Schicht lokalisiert. Die Lichtabsorption erfolgt durch Sehpigmente in den Außensegmenten. Sie detektieren Lichtreize und wandeln diese in elektrische Signale um, die an Nervenzellen in der Retina weitergegeben werden. Diese biochemische Reaktion wird als photoelektrische Transduktion bezeichnet (Müller und Kaupp, 1998). Grundsätzlich unterscheidet man in der Retina zwischen zwei Photorezeptorzelltypen: Stäbchen und Zapfen (engl. „*rods*“ und „*cones*“), die ihren Namen durch ihre Morphologie erhalten haben. Die Stäbchen ermöglichen das Sehen bei geringen Lichtintensitäten, das Dämmerungssehen oder skotopische Sehen. Die Zapfen sind für das Farbsehen bei Tageslicht verantwortlich. Fast alle Säugetiere haben eine stäbchendominierte Retina mit einem geringeren Zapfenanteil. Die meisten Säuger sind Dichromaten, d.h. sie besitzen zwei Zapfentypen mit unterschiedlichen Sehpigmenten, die ihre Absorptionsmaxima im kurzwelligen (ca. 400 nm, blau) und im längerwelligen (ca. 530-570 nm, grün bis gelb) Bereich des Spektrums haben. Der Mensch und die Altweltaffen sind Trichomaten. Sie besitzen drei unterschiedliche Sehpigmente mit unterschiedlichen Absorptionsmaxima. Zapfen sind auf das photopische Sehen bei hellem Licht spezialisiert und vermitteln dabei die Registrierung von Form, Bewegung und Farbe der gesehenen Dinge. Die Farbwahrnehmung entsteht durch die kombinierte Information dieser Zapfenarten. Mit zunehmender Dunkelheit werden die Zapfen inaktiv und die Stäbchen übernehmen die Funktion der Lichtperzeption. Wie auch die meisten ausgereiften Nervenzellen verlieren voll entwickelte Stäbchen und Zapfen ihre Teilungsfähigkeit.

In den Außensegmenten findet die Phototransduktion mittels des mit Retinal gekoppelten 7-Transmembranproteins Rhodopsin (Sehpurpur) statt (Czihak *et al.*, 1996). Das Sehpurpur ist in den Stäbchen in Stapel geldrollenartig geschichteter, isolierter Membranscheibchen (engl. „*disks*“) eingelagert. Bei Zapfen sind diese in fingerförmigen Membraneinfaltungen, die nicht vollständig abgeschnürt sind, zu finden. Allerdings unterliegen Teile des Außensegmentes einer permanenten Regeneration. So werden die Membranstapel mit dem Photopigment Rhodopsin in den Außensegmenten regelmäßig erneuert, indem sie in der Nähe des ciliären Übergangs zum inneren Segment neu entstehen und am anderen Ende alte Vesikel abgestoßen und durch das retinale Pigmentepithel phagozytiert werden. Um die permanente Erneuerung der Membranstapel zu gewährleisten, müssen die Proteinbestandteile dieser Membranen im Innensegment synthetisiert und

anschließend ins Außensegment transportiert werden (Tai *et al.*, 1999; Wolfrum und Schmitt, 1999; Rosenbaum *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999a; Marszalek *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001; Pazour und Rosenbaum, 2002). Das Innensegment ist reich an Mitochondrien und Ort der Synthese und des Abbaus von Zellkomponenten. Hier werden die Proteine des Außensegmentes *de novo* synthetisiert und gelangen über bisher nur in Ansätzen bekannte Transportwege zum Ort ihrer Funktion (Fariss *et al.*, 1997; Wolfrum und Schmitt, 1999; Liu *et al.*, 1999b; Marszalek *et al.*, 2000; Wolfrum und Schmitt, 2000)

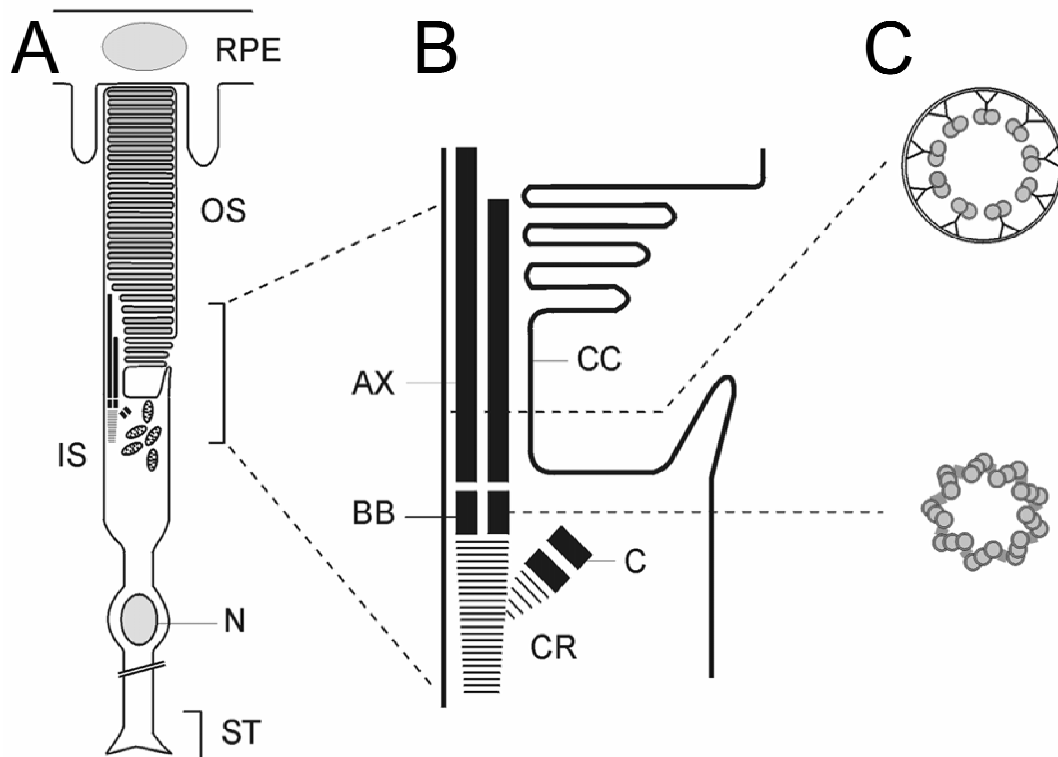


Abbildung 1.9 Schematische Darstellung des Cilienapparates einer Photorezeptorzelle

(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 dem Außensegment (OS). Das Cilium (CC) entspringt einem Basalkörper (BB). Dieser bildet mit dem danebenliegenden Centriol (C) den Basalkörper-Centriolen-Komplex aus, von welchem eine Cilienwurzel (CR) in das Innensegment der Photorezeptorzelle entspringt. Retinales Pigmentepithel (RPE); Zellkern (N); Synapsenregion (ST) [verändert nach Schmitt und Wolfrum (2001)].

1.5. *Struktur und Funktion des Cilienapparates von Photorezeptorzellen*

Das Innen- und Außensegment ist durch ein modifiziertes nicht-motiles Verbindungscilium verbunden, welches aufgrund seiner Ultrastruktur homolog zu der Übergangszone motiler Cilien ist (Matsusaka, 1974; Rohlich, 1975; Besharse und Horst, 1990; Horst *et al.*, 1990). Hierbei stellt das Verbindungscilium die einzige cytoplasmatische Verbindung zwischen Außen- und Innensegment dar. Das Verbindungscilium weist ein Mikrotubuli-Gerüst auf, welches an einem Basalkörper entspringt (Besharse und Horst, 1990). Der Basalkörper liegt apikal im Innensegment der Photorezeptorzelle und wird mit dem angrenzenden Centriol zu einem Basalkörper-Centriolen-Komplex zusammengefasst (Abb. 1.9). Ausgehend vom Verbindungscilium erstrecken sich Mikrotubuli auch ins Außensegment (Horst *et al.*, 1990). Neun Mikrotubuli-Dupletts in nonagonaler Anordnung bilden die innere Struktur dieses unbeweglichen Ciliums (Abb. 1.9). Es wird davon ausgegangen, dass der intrazelluläre Transport am Verbindungscilium entlang oder durch das Verbindungscilium erfolgen muss (Wolfrum und Schmitt, 1999; Liu *et al.*, 1999a; Marszalek *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2000; Pazour und Rosenbaum, 2002). Ein Transportmechanismus ist z.B. der intraflagellare Transport (IFT). Hierbei werden Partikel (IFT-Partikel), die viele Proteine enthalten (engl. „rafts“), zwischen der Membran und dem äußeren Mikrotubuliring transportiert. Dies geschieht mit Hilfe von Motorproteinen in eine Richtung sowie in die entgegengesetzte Richtung. Dieser Transport wurde zuerst in den Flagellen der Grünalge *Chlamydomonas* entdeckt (Kozminski *et al.*, 1993; 1995; 1998). Inzwischen wurde dieser Transportmechanismus in vielen eukaryotischen motilen und nicht-motilen Cilien und Flagellen identifiziert (Cole *et al.*, 1998; Marszalek *et al.*, 2000; Pazour *et al.*, 2002; Pazour und Rosenbaum, 2002). Dazu gehört auch das modifizierte Verbindungscilium der Photorezeptorzelle. Dabei zeigt sich, dass der molekulare Motor Kinesin II an dem Transport der IFT-Partikel zum Plus-Ende der Mikrotubuli (Richtung Außensegment) beteiligt ist. Für den Rücktransport Richtung Innensegment (Minus-Ende der Mikrotubuli) ist cytoplasmatisches Dynein (1b/2) verantwortlich (Pazour *et al.*, 1999). Es zeigten sich Hinweise, dass durch diesen Transportmechanismus Proteine der Signaltransduktionskaskade (z.B. Arrestin) vom Innen- ins Außensegment transportiert werden (Rosenbaum *et al.*, 1999; Marszalek *et al.*, 2000; Pazour *et al.*, 2002; Pazour und Rosenbaum, 2002).

Neben den Bestandteilen des Mikrotubuli-Cytoskeletts, wie α -, β - und γ -Tubulin und den damit assoziierten molekularen Motoren (z.B. Kinesin II) konnten Aktinfilamente

entlang des gesamten Verbindungsciliums nachgewiesen werden (Wolfrum und Schmitt, 1999; Besharse *et al.*, 1999; Marszalek *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2000; Sung und Tai, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Dort sind diese Aktinfilamente mit dem unkonventionellen Motorprotein Myosin VIIa kolokalisiert (Wolfrum und Schmitt, 1999; Wolfrum *et al.*, 2000; Schmitt und Wolfrum, 2001). Weiterhin sind mehrere Aktin-Bindeproteine im Verbindungscilium nachgewiesen worden (Schmitt und Wolfrum, 2001). Diese Erkenntnisse weisen auf zwei aktive Transportmechanismen am Verbindungscilium von Photorezeptorzellen hin: Ein Mikrotubuli-assoziiierter und ein Aktin-assoziiierter Transportweg. Weiterhin kann das Verbindungscilium auch als Diffusionsbarriere zur Aufrechterhaltung der funktionellen Kompartimente der Photorezeptorzelle dienen (Horst *et al.*, 1987; Spencer *et al.*, 1988; Besharse und Horst, 1990; Horst *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 2000). Weitere Bestandteile des Cilienapparates sind andere Cytoskelettelemente, wie etwa das Ca²⁺-bindende Protein Centrin (Wolfrum und Salisbury, 1995; 1998; Wolfrum, 1998). Mit Hilfe von Elektronenmikroskopischen Analysen konnten Centrine im Verbindungscilium und am Basalkörper identifiziert werden (Wolfrum und Salisbury, 1995; 1998; Wolfrum, 1998). In welchem Kompartiment Centrin lokalisiert ist, welche Isoformen wo zu finden sind und welche Funktion Centrine in der Retina haben, war vor dieser Arbeit nicht bekannt. Um spätere Ergebnisse dieser Arbeit besser verstehen zu können, muss hier noch detaillierter auf die Signaltransduktion in den Photorezeptorzellen eingegangen werden.

1.6. Phototransduktion der Photorezeptoren

In den Außensegmenten der Photorezeptorzellen findet die Phototransduktion mittels des Rhodopsins (Sehpurpur) statt, welches zur Familie der 7-Transmembran-Rezeptoren gehört (Czihak *et al.*, 1996). 7-Transmembran-Rezeptoren sind G-Protein gekoppelt und werden deshalb auch als „*G-protein-coupled receptor*“ (GPCR) bezeichnet. Das mit Rhodopsin assoziierte heterotrimere G-Protein bezeichnet man als Transducin. Das visuelle Pigment Rhodopsin mit einem kovalent gebundenen Chromophor, dem 11-cis-Retinal (Fain *et al.*, 2001), ist in der Membran der Außensegment-„*Disks*“ lokalisiert. Durch die Absorption eines Photons von Rhodopsin kommt es zu einer Isomerisierung des 11-cis-Retinals zu all-trans-Retinal. Die daraus resultierende Konformationsänderung des Transmembranproteins Rhodopsin (Fain *et al.*, 2001) führt zur Bindung von Transducin (Abb. 1.10).

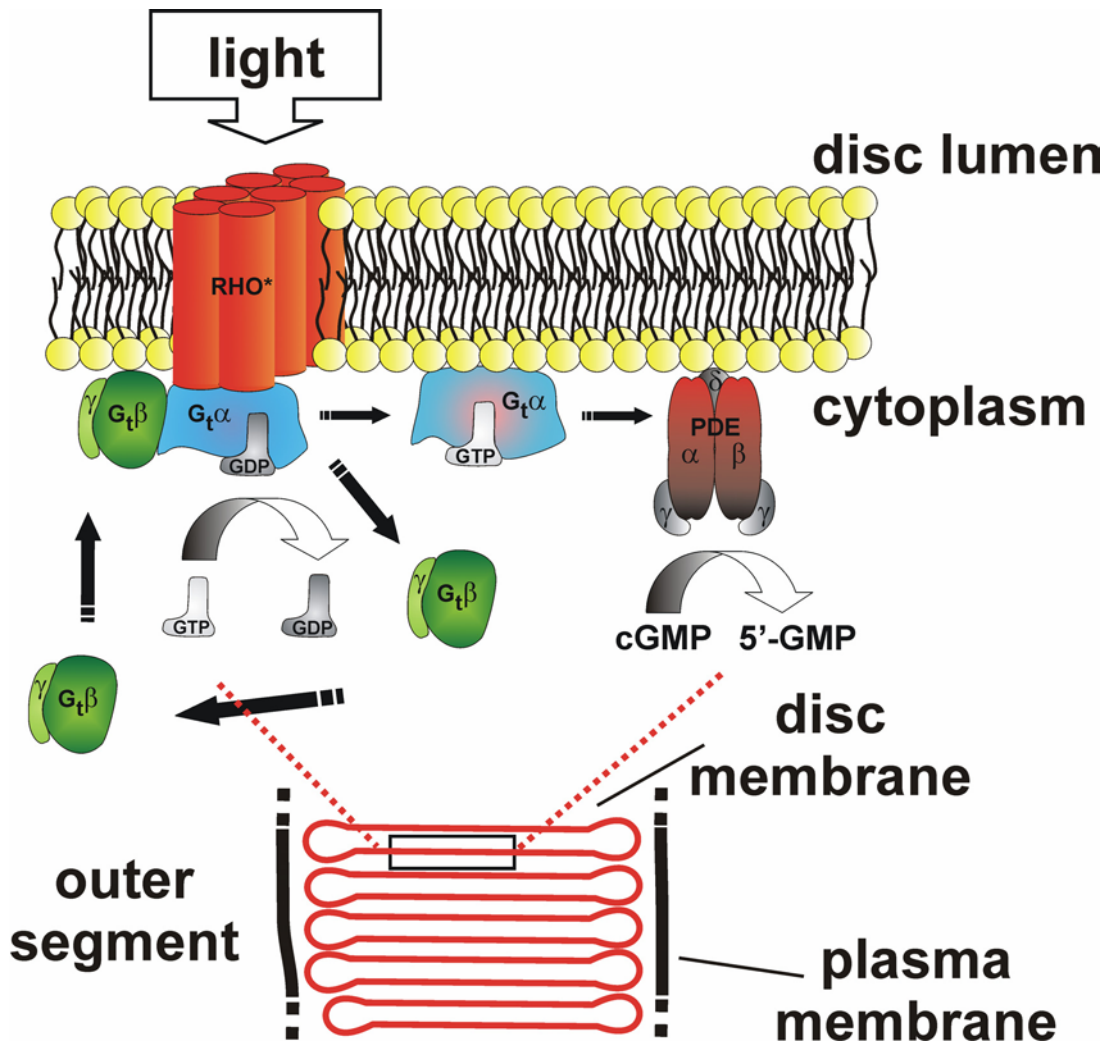


Abbildung 1.10 Lichtabsorption durch Rhodopsin mit der Aktivierung der cGMP-Phosphodiesterase in Stäbchen

Nach der Absorption von Licht und der Aktivierung von Rhodopsin (RHO*) wird das inaktive Protein Transducin (G-Protein bestehend aus G α •GDP, G β - und G γ -Untereinheit), welches GDP gebunden hat, unter Bindung von GTP in die aktive Form überführt. Dann dissoziiert der G $\beta\gamma$ -Komplex. Der freie G α •GTP-Komplex bindet an die cGMP-Phosphodiesterase (PDE), die dann cGMP in 5'-GMP hydrolysiert. Folglich wird die cGMP-Konzentration in der Zelle erniedrigt.

Signalwege, die über heterotrimere G-Proteine vermittelt werden, sind klassische, an 7-Transmembranrezeptoren gekoppelte, Transduktionskaskaden (Gilman, 1987; Offermanns, 2003). Transducin ist ein membrangebundenes Heterotrimer, das aus den Untereinheiten α , β und γ besteht. Im nicht-aktivierten Zustand ist an G α •GDP gebunden. Wird das G-Protein durch Rhodopsin aktiviert, bindet es GTP im Austausch zu GDP an G α und das heterotrimere G-Protein dissoziiert in G α •GTP und G $\beta\gamma$ -Komplex. Der G $\beta\gamma$ -Komplex sowie G α •GTP können auf Effektoren nachgeschalteter 2nd-Messenger-Moleküle einwirken (Jan und Jan, 1997; Offermanns, 2003).

In der visuellen Signaltransduktionskaskade der Vertebraten aktiviert $G_t\alpha\bullet GTP$ durch Kollisionskopplung eine cGMP-abhängige Phosphodiesterase (PDE), die den 2nd-Messenger cGMP zu 5'GMP hydrolysiert (Abb. 1.10), was zur Schließung der cGMP-gesteuerten Ionenkanäle in der Plasmamembran führt (Molday und Kaupp, 2000; Pugh und Lamb, 2000). Das cGMP (cyclisches Guanosin-3',5'-monophosphat) wird in den Photorezeptorzellen benötigt, um die cGMP-abhängigen Na^+/Ca^{2+} -Kanäle offen zu halten, so dass Ca^{2+} einströmen kann und die Photorezeptorzelle im Dunkeln depolarisiert ist. Die Hydrolyse des cGMPs durch die PDE führt zu einer Schließung dieser Kanäle und zu einer Hyperpolarisation der Photorezeptorzelle in Folge des Lichtreizes (Abb. 1.11).

In der Dunkelheit wird an den Synapsen der Photorezeptorzellen kontinuierlich der Neurotransmitter Glutamat ausgeschüttet. Die Bipolarzellen, bei denen die so genannten ON- und OFF-Bipolarzellen existieren, reagieren auf das von den Sensorzellen ausgeschüttete Glutamat unterschiedlich (Boycott und Wässle, 1999). Während die OFF-Bipolarzelle auf die Glutamat-Ausschüttung der Sensorzelle bei Dunkelheit mit einer Depolarisation reagiert, wird die ON-Bipolarzelle hyperpolarisiert. Dieser Unterschied beruht auf einer unterschiedlichen Ausstattung mit Glutamat-Rezeptoren (Brandstätter *et al.*, 1998; Boycott und Wässle, 1999; Brandstätter und Hack, 2001). Durch die Hyperpolarisation der Photorezeptorzellen wird der Neurotransmitter an den Synapsen nicht weiter ausgeschüttet (Hofmann und Ernst, 2001). Bleibt diese Inhibition aus, werden die Ionenkanäle der Horizontal- und ON-Bipolarzellen geöffnet und so der Impuls an die Postsynapsen übertragen. Der ON-(Licht) und OFF-Weg (Dunkelheit) beeinflusst sich gegenseitig in antagonistischer Form. Ist ein Weg aktiv, wird der andere gehemmt. Der Zellkörper der Horizontal- und Bipolarzellen liegt in der inneren Körnerschicht. Während die Horizontalzellen laterale Interaktionen zwischen den Photorezeptoren vermitteln, übertragen die Bipolarzellen das Signal mit ihren Ausläufern in die innere plexiforme Schicht. Hier übertragen diese den Impuls an die Dendriten von amakrinen Zellen, deren Zellkörper sich ebenfalls in der inneren Körnerschicht befinden, und die Dendriten von den Ganglienzellen. Von der Ganglienzellschicht aus führen die Axone der Ganglienzellen zusammen und bilden den optischen Nerv. Dieser vermittelt das Signal über verschiedene Interneurone zur weiteren Verarbeitung in das Sehzentrum. Das Sehzentrum besteht aus mehreren Gehirnarealen, in denen die einkommenden Signale verarbeitet und interpretiert werden (Kolb, 1991; Oyster, 1999; Kolb, 2003; Stevens und Lowe, 2004).

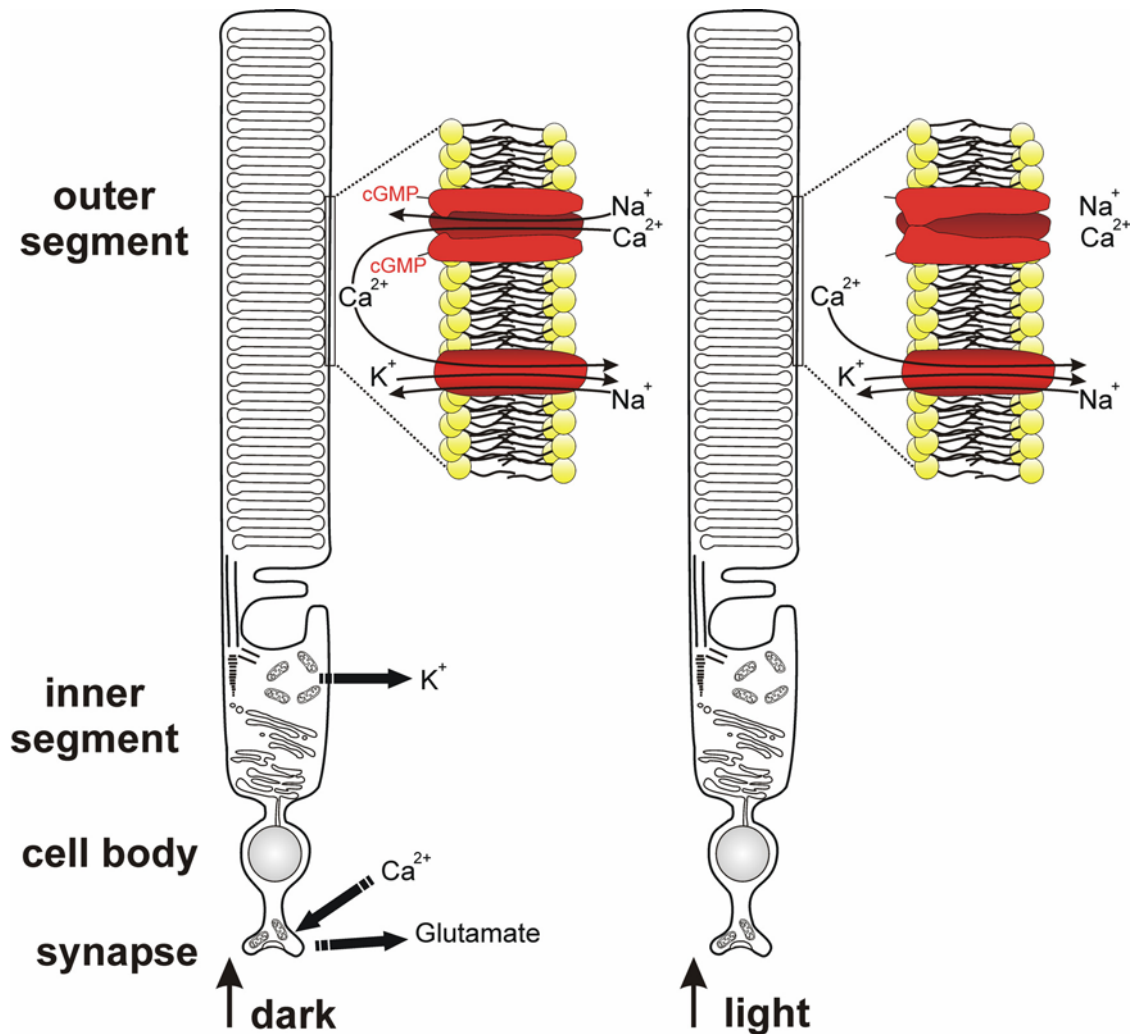


Abbildung 1.11 Schematische Darstellung einer dunkel- und hell-adaptierten Photorezeptorzelle

In dunkeladaptierten Stäbchen (linkes Schema) werden durch den hohen cGMP-Spiegel nucleotidgesteuerte, nicht-ionenselektive Kationenkanäle offen gehalten, wodurch die Membran im Vergleich zum Ruhepotenzial anderer Zellarten depolarisiert wird. Im Dunkeln erfolgt eine fortwährende Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat. Dieser wirkt in der Regel inhibierend auf die Postsynapsen von Horizontal- und Bipolarzellen. Trifft Licht auf die Photorezeptorzellen (rechtes Schema), werden Ionenkanäle in der Zellmembran geschlossen, ausgelöst durch die Signaltransduktionskaskade. Die Photorezeptorzelle hyperpolarisiert und schüttet den Neurotransmitter Glutamat nicht weiter aus. In Folge werden die Ionenkanäle der Horizontal- und Bipolarzellen geöffnet und so der Impuls an diese übertragen.

Der Ausgangspunkt aller Signale ist die Photorezeptorzelle. Da die Ionenkanäle der Photorezeptorzellen im Dunkeln offen und somit permeabel für Ca^{2+} sind, ist die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration in der Dunkelheit hoch. Durch den Lichtreiz werden die Kanäle geschlossen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration sinkt (Fain *et al.*, 2001). Allerdings existiert in den Außensegmenten der Photorezeptoren ein Vorrat von gebundenem Ca^{2+} , welches durch einen wenig verstandenen Mechanismus bei starker

Lichtintensität freigesetzt werden kann (Fain und Schroder, 1985; Fain und Matthews, 1990). Die Stäbchen verfügen über eine Vielzahl von Adaptionsmechanismen, die sie vor Schaden durch zu hohen Lichteinfall schützen. So wird beispielsweise aktiviertes Rhodopsin durch eine Kinase phosphoryliert (Hofmann und Ernst, 2001). An das phosphorylierte Rhodopsin bindet ein regulatorisches Protein, das Arrestin, und verhindert dadurch die sofortige Reaktivierung der Signaltransduktionskaskade (Fain *et al.*, 2001; Hofmann und Ernst, 2001; Ridge *et al.*, 2003). Weit weniger gut verstanden sind dagegen bidirektionale Translokationsprozesse von Komponenten der Transduktionskaskade, insbesondere von Arrestin und dem heterotrimeren visuellen G-Protein Transducin, die licht-abhängig erfolgen und möglicherweise im Dienste der Langzeitadaptation stehen (Sokolov *et al.*, 2002; Hardie, 2002). Diese Vorgänge wurden vor über einem Jahrzehnt erstmals beschrieben (Whelan und McGinnis, 1988). Diese Phänomene rückten erst kürzlich wieder ins Interesse intensiver Forschungsaktivität (Sokolov *et al.*, 2002; McGinnis *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Sokolov *et al.*, 2004). Jedoch konnten die molekularen Mechanismen, auf denen diese licht-abhängigen, bidirektionalen Translokationen durch das Verbindungscilium, das zwischen dem Innen- und dem Außensegment vermittelt, basieren, bislang noch nicht geklärt werden. Centrine könnten eine Rolle in diesem Adaptionsmechanismus spielen, da sie im Verbindungscilium lokalisiert sind und das Verbindungscilium bei Transportmechanismen eine wichtige Rolle spielt.

Zielsetzung

2. Ziel der Arbeit

In den letzten 10 Jahren sind vier Isoformen des Proteins Centrin in Säugetieren identifiziert worden (Lee und Huang, 1993; Ogawa und Shimizu, 1993; Gavet *et al.*, 2003). Über subzelluläre Lokalisationen und zellbiologische Funktionen der entdeckten Genprodukte war bislang noch relativ wenig bekannt. Die Vermutung liegt nahe, dass die vier Centrin-Isoformen in Säugern unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Zelltypen einnehmen. Die differenzielle Expression in unterschiedlichen Geweben sowie die Kenntnis der subzellulären Lokalisation der Isoformen, sollten erste Hinweise auf ihre unterschiedlichen Funktionen ergeben. Für Untersuchungen der Centrin-Isoformen wurde in dieser Arbeit speziell die Retina von Säugern herangezogen. Der strukturelle Aufbau der Retina bietet die Möglichkeit, Centrine sowohl an Centrosomen als auch an nicht-motilen Cilien in demselben Gewebe zu untersuchen. Um auf die genaue Funktion der Centrine Rückschlüsse ziehen zu können, sollten in der vorliegenden Arbeit Wechselwirkungspartner sowie die Regulationsmechanismen der Interaktionen zwischen Centrinen und anderen Proteinen identifiziert und charakterisiert werden.

In der vorliegenden Dissertation sollten Centrine zell- und molekularbiologisch als auch biochemisch untersucht werden. Folgende Ziele wurden für diese Arbeit formuliert:

a) *Werden alle Centrin-Isoformen in der Säugerretina exprimiert und wie sieht es in anderen Geweben aus?*

Zum Verständnis der zellulären Funktion eines Gens ist die Untersuchung auf verschiedenen Ebenen der Genexpression (DNA, RNA, Protein) notwendig. Die Genstruktur der vier Isoformen ist bereits relativ gut z.B. in Mäusen charakterisiert. Dies trifft für die Transkriptions- bzw. Translationsprodukte nur eingeschränkt zu. Die unterschiedlichen Isoformen sollten bei dieser Arbeit in verschiedenen Geweben und dabei speziell in der Retina untersucht werden. Da nicht für alle Isoformen spezifische Antikörper

zur Verfügung standen, sollten die Expressionsstudien auf Transkriptionsebene mittels RT-PCR durchgeführt werden. Um Daten über die Expression der verschiedenen Isoformen auf Proteinniveau zu erhalten, sollten spezifische Antikörper gegen Centrin 2, 3 und 4 hergestellt werden. Ein Antikörper gegen Centrin 1 wurde während einer vorangegangenen Dissertation in dieser Arbeitsgruppe bereits erzeugt und stand in dieser Arbeit zur Verfügung.

b) *In welchen Kompartimenten sind die Centrin-Isoformen in der Säugerretina lokalisiert? Gibt es Unterschiede bei den vier Isoformen?*

Zur Bestimmung der zellulären Funktion eines Proteins ist die Kenntnis der subzellulären Lokalisation des Proteins von großer Bedeutung. Zur Realisierung dieser Ziele sind im Wesentlichen die spezifischen Antikörper und der umfassende Einsatz hochauflösender fluoreszenz- und elektronenmikroskopischer Verfahren notwendig. Das primäre Untersuchungsobjekt war dabei die Retina und verschiedene Zelllinien aus Zellkulturen.

c) *Werden Centrine in der Retina licht-abhängig phosphoryliert und welche Kinasen sind daran beteiligt?*

Centrine werden in ihrer zellulären Funktion nicht nur durch Ca^{2+} -Bindung, sondern auch durch Phosphorylierungen reguliert (Lutz *et al.*, 2001). In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die verschiedenen Centrin-Isoformen unterschiedlich phosphoryliert werden, welche Kinasen daran beteiligt sind und ob in der Säugerretina die Aktivität der Signaltransduktionskaskade irgend eine Rolle dabei spielt.

d) *Welche Proteine gehen Wechselwirkungen mit den Centrinen in der Säugerretina ein und welche Rolle spielen diese Wechselwirkungen im System der Signaltransduktion? Wie werden solche Interaktionen reguliert?*

Erst die Wechselwirkung mit Partnerproteinen vermag die genaue Funktion von Centrinen in der Säugerretina aufzudecken. Daher war es ein wesentliches Ziel, nach Interaktionspartnern der verschiedenen Centrin-Isoformen in der Retina zu suchen, um die Aufgaben dieser Cytoskelettproteine zu verstehen. Dabei war es nötig, neue Strategien für

Interaktions-Experimente im Labor zu etablieren, die vor allem die Besonderheit der Centrin-Moleküle berücksichtigten. Dazu zählte vor allem die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand Motive der Centrine und die daraus mögliche Aktivierung oder Inaktivierung von Interaktionen mit anderen Proteinen. Identifizierte Interaktionspartner sollten anschließend untersucht und charakterisiert werden. Dabei stand die (sub-) zelluläre Lokalisation der Wechselwirkungspartner in der Retina im Vordergrund. Es sollten Hinweise gefunden werden, in welchen Kompartimenten die Wechselwirkungen mit den Centrinen erfolgen könnten. Weiterhin sollten die Funktionen der Wechselwirkungspartner genauer untersucht werden.

In dieser vorliegenden Arbeit stand die Analyse der molekularen Funktion der Centrin-Isoformen speziell in den Photorezeptorzellen der Säugerretina im Vordergrund. Dennoch sollten die erhaltenen Ergebnisse ebenfalls zum Verständnis der Funktion der Centrine im Allgemeinen beitragen.

Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Die verwendeten Chemikalien und Materialien waren von höchster erhaltlicher Reinheit und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den folgenden Firmen bezogen: Amersham Biosciences (Braunschweig), AppliChem GmbH (Darmstadt), Becton Dickinson (Heidelberg), Biorad (München), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Millipore GmbH (Eschborn), New England Biolabs GmbH (Frankfurt), Peqlab, (Erlangen), Pierce (Rockford), Promega GmbH (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Stratagene (Heidelberg). Chemikalien wurden auf einer Sartorius BP610 Digitalwaage eingewogen. Der pH-Wert von Lösungen wurde mit einem geeichten Fischer Accumet Basic pH-Meter eingestellt. Bei Bedarf wurden Lösungen oder Material mit einem Varioklav Dampfsterilisator der Firma H+P sterilisiert. Die verwendeten Kunststoffgefäße waren Produkte von Falcon (Heidelberg) und Greiner (Frickenhausen).

3.1.2. Versuchstiere

Zur Antikörperproduktion wurden Kaninchen und Ziegen der Firma Pineda (Berlin) getestet und verwendet. Die durchgeführten Versuche wurden mit Geweben von Mäusen (*Mus musculus*) des Stammes [C57 BL/6J Wildtyp (wt) Maus] und Ratten (*Rattus norvegicus* „Wistar“) verwendet, die aus der Tierzucht der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U. Wolfrum oder des Institutes für Physiologische Chemie der Universität Mainz stammten. Die Tiere wurden bei konstanter Temperatur (25°C) und in einem 12-stündigen hell-dunkel-Rhythmus gehalten. Die Rinderaugen wurden von Dr. Martin Latz (AG

Wolfrum) in dem Schlachthof (Alzey) präpariert und auf Eis zu der Universität transportiert, wo die Entnahme der Retina vorgenommen wurde.

3.1.3. Soft- und Hardware

Die Dokumentation von DNA- und Proteingelen erfolgte mit dem BioImager-System der Firma Biostep. Die Bilder wurden mit einer Olympus Digitalkamera aufgenommen und mit Hilfe des Computerprogramms „TotalLab v2.01“ analysiert. Die weitere Bearbeitung aller Bilder wurde mit dem Computerprogramm „Adobe Photoshop 6.0“ (Fa. Adobe) durchgeführt. Die Beschriftung der Abbildungen erfolgte mit dem Programm „CorelDraw 11“ (Fa. Corel Corporation). Statistische Auswertungen und graphische Darstellungen wurden mit dem Programm „Excel“ (Fa. Microsoft) erstellt. Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzen wurden unter Verwendung des Programmes „Omega 2.0“ (Fa. Oxford Molekular Ltd.) analysiert. Um das Stammbaum-Phylogramm zu berechnen, wurde auf das Programm PAUP 4.0* (Rogers und Swofford, 1998) zurückgegriffen.

3.1.4. Laborgeräte

Folgende Laborgeräte kamen während der Experimente der vorliegenden Arbeit zum Einsatz:

Tabelle 3.1 Auflistung der wichtigsten verwendeten Geräte

Geräte	Bezugsfirmen und Bezeichnungen
Autoklav	Fa. H + P. - Varioklav Dampfsterilisator
Blotting-Kammer	Fa. Biorad - Transfer Cell Transblot SD
Digitalwaage	Fa. Sartorius - BP610
Elektrophorese-Kammern Flachbett (Agarosegele) Vertikal (Proteingele)	Fa. Amersham Pharmacia Fa. Biorad, Mini Protean III
Geldokumentationssystem	Fa. Biostep, BioImager
Heizrührer	Fa. Hedolph – MR 3001K

Geräte	Bezugsfirmen und Bezeichnungen
Homogenisator	Fa. IKA Laborgeräte - Ultraturax
Inkubator	Fa. Binder - WTC
Mikroskope Fluoreszenzmikroskop Konfokales Mikroskop Elektronenmikroskop	Fa. Leica, DM RB mit Auflichtfluoreszenz Fa. Leica – TCSNT Fa. Zeiss TEM LEO EM 906E
Kryostat-Mikrotom	Fa. Microm – Microm HM 560
Netzgeräte	Fa. Biorad Power Pac 200 Fa. Biorad Power Pac 300 Fa. Fischer Phero-Stab 500
PCR-Gerät	Fa. Biometra – T-Gradient Thermocycler
pH-Meter	Fa. Fischer - Accumet Basic
Phospho-Imager	Fujifilm BAS-1500
Photometer	Fa. Biorad - Smartspec 3000
Schüttelinkubator	Fa. New Brunswick - Innova 4230
Schüttler Schüttler Isotopenlabor	Fa. Edmund Bühler KS-15 Fa. Gerhardt - RO10
Sterile Werkbänke Bakterien Zellkultur	Fa. Heraeus - LaminAir 2448 GS Fa. NuAir Cleanbench Class II
Szintillationszähler	Fa. Packard - TRI-CARB 2200CA
Ultraschallhomogenisator	Fa. Braun - HD2070 Bandelin Sonopuls
UV-Lichttisch	Fa. Vilber Lourmat - UV-Transilluminator
Wärmeschrank	Fa. Binder
Wipptisch	Fa. Biometra – WT 15

Geräte	Bezugsfirmen und Bezeichnungen
Zentrifugen:	
Labor-Zentrifuge	Fa. Heraeus - Labofuge 400E
Labor-Kühlzentrifuge	Fa. Beckman - Coulter Microfuge 22R
Labor-Tischzentrifuge	Fa. Heraeus - Biofuge pico
Labor-Tischkühlzentrifuge	Fa. Heraeus - Labofuge 400R
Labor-Tischkühlzentrifuge	Fa. Hermle - Z233-MK-2

3.1.5. Verwendete Antikörper

Tabelle 3.2 Primäre Antikörper

Tabelle der verwendeten primären Antikörper für die Versuchsansätze in der Immunohistochemie, Elektronenmikroskopie und Western Blot Analysen (Fa. APB: Amersham Biosciences).

Anti-körper	Antigen	Antikörper erzeugt in	Verdünnung Immunohistochemie/EM	Verdünnung Western Blot	Quelle
pan-Centrin (clone 20H5)	<i>Chlamydomonas</i> Centrin	Maus-Hybridoma	1:200/1:200	1:2500	J.L. Salisbury
HsCetn2.4	Human-Centrin 2	Maus-Hybridoma	1:500/1:500	1:4000	J.L. Salisbury
pMmC1	Maus-Centrin 1	Kaninchen	1:50/1:50	1:500	Prof. Wolfrum
pMmC2	Maus-Centrin 2	Ziege	1:40/1:40	1:300	Prof. Wolfrum
pMmC3	Maus-Centrin 3	Kaninchen	1:500/1:400	1:4000	Prof. Wolfrum
pMmC4	Maus-Centrin 4	Kaninchen	1:400/1:300	1:4000	Prof. Wolfrum
A4	α -Transducin	Maus-Hybridoma	1:200/1:100	1:2000	H.E. Hamm
SA-126	α -Transducin	Kaninchen	1:100/1:100	1:1000	Fa. Biomol
SA-125	β -Transducin	Kaninchen	1:75/1:75	1:750	Fa. Biomol
T-20	β -Transducin	Kaninchen	1:100/1:100	1:1000	Molekular Probes
5C6.47	Arrestin	Maus-Hybridoma	1:50/1:50	1:500	L.S. Lang
3D1.2	Arrestin	Maus-Hybridoma	1:50/1:50	1:500	L.S. Lang
α CkII	Caseinkinase II	Kaninchen	1:75/1:50	1:500	Fa. Biomol
γ -Tubulin	γ -Tubulin	Maus-Hybridoma	1:100/1:100	1:1000	Fa. Sigma
α GST	GST	Maus-Hybridoma	1:500/ ---	1:5000	Fa. APB
6D4	Calmodulin	Maus-Hybridoma	1:100/ ---	1:1000	Fa. Calbiochem
Root6	Rootletin	Kaninchen	1:500/ ---	1-5000	T. Li

Tabelle 3.3 Sekundäre Antikörper

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

Antikörper	Markierung	Methode	Verdünnung	Bezugsquelle Firma
Ziege Anti-Maus	Alexa 488 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Ziege Anti-Maus	Alexa 546 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Ziege Anti-Maus	Alexa 568 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Ziege Anti-Kaninchen	Alexa 488 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Ziege Anti-Kaninchen	Alexa 546 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Ziege Anti-Kaninchen	Alexa 568 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Esel Anti-Ziege	Alexa 568 nm	IF	1:400	Molekular Probes
Esel Anti-Ziege	Alkalische Phosphatase	WB	1:10.000	Sigma
Ziege Anti-Kaninchen	Alkalische Phosphatase	WB	1:20.000	Sigma
Ziege Anti-Maus	Alkalische Phosphatase	WB	1:20.000	Sigma
Ziege Anti-Maus	1,4 nm Goldpartikel	EM	1:150	Nanoprobes
Ziege Anti-Kaninchen	1,4 nm Goldpartikel	EM	1:200	Nanoprobes
Esel Anti-Ziege	5 nm Goldpartikel	EM	1:150	Nanoprobes

3.1.6. Oligonukleotid-Primer

In Tabelle 3.4 und 3.5 sind alle Oligonukleotide aufgeführt, die für die RT-PCR- und PCR-Experimente sowie bei der Sequenzierung von GENterprise (Mainz) in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3.4 Verwendete Oligonucleotid-Primer für Sequenzierungen

Primer	Nukleotidsequenz
pGEX Fwd	5'GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG3'
M13 (-20) Fwd	5'CTGGCCGTCGTTTTAC3'
M13 Rev	5'CAGGAAACAGCTATGAC3'
T3	5'ATTAACCCTCACTAAAGGGA3'
T7	5'CCCTATAGTGAGTCGTATTA3'

Tabelle 3.5 Auflistung der verwendeten Oligonucleotid-Primer für RT-PCR- und PCR-Analysen und Konstrukt-Herstellung

Primer für RT-PCR-Analysen und für die Herstellung von Klonen und deren Konstrukten (*holo*: Primer für den ganzen codierenden Bereich, Forward: vorwärts Primer, Revers: rückwärts Primer, BamHI: Restriktionsenzym, XhoI: Restriktionsenzym, mSt: mit Stop Codon, Δ : ohne den danach kommenden Bereich, MmCen: Maus-Centrin, MmCalmodulin: Maus Calmodulin, EF: EF-Hand, Nterm: N-Terminus)

Primer	Nukleotidsequenz
MmCen1	
<i>holo</i> forward BamHI	5'GTACGGATCCATGGCGTCCACCTTCAGGAAG3'
<i>holo</i> reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTAATAAAGGTTGGTCTTTTT3'
Δ EF34 reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTAATCTTTCTCGGCCATCTT3'
Δ EF12 forward BamHI	5'GTACGGATCCACCAAAGAGGAAATCCTGAAG3'
Δ EF1 forward BamHI	5'GTACGGATCCAAGGAAGAGATGAAGAAAATG3'
Δ Nterm forward BamHI	5'GTACGGATCCCAAGAAGTTCGGGAAGCCTTT3'
MmCen2	
<i>holo</i> forward BamHI	5'GTACGGATCCATGGCCTCTAATTTTAAGAAG3'
<i>holo</i> reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTAATAGAGGCTGGTCTTTTTCAT3'
Δ EF34 reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTAAGTGTCTTTCTCAGACAT3'
Δ EF12 forward BamHI	5'GTACGGATCCACTAAAGAAGAAATCCTGAAA3'
Δ EF1 forward BamHI	5'GTACGGATCCAAAGAAGAAATTAAGAAAATG3'
Δ Nterm forward BamHI	5'GTACGGATCCCAGGAAATCCGGGAAGCTTTT3'
MmCen3	
<i>holo</i> forward BamHI	5'GTACGGATCCATATGAGTTTAGCTCTGAGAGGT3'
<i>holo</i> reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTATATGTCACCAGTCATAAT3'
Δ EF34 reverse XhoI mSt	5'GCGGCTCGAGTTAATCTCTCTCTAGTATCCA3'
Δ EF12 forward BamHI	5'GTACGGATCCCCACATGAGGAGATACTGAAA3'
Δ EF1 forward BamHI	5'GTACGGATCCGTGAAAAAGGCTGATGTGTTG3'
Δ Nterm forward BamHI	5'GTACGGATCCCAAGAATTAAGATGCTTTT3'
MmCen4	
<i>holo</i> forward BamHI	5'GATCGGATCCATGGCATCCAGCCAGCGCATA3'
<i>holo</i> reverse XhoI mSt	5'TCGACTCGAGCTAATAAAGGCTGGTCTTCTT3'
MmCalmodulin	
<i>holo</i> forward BamHI	5'GTACGGATCCATGGCTGATCAGCTGACTGAA3'
<i>holo</i> reverse XhoI mSt	5'TCGACTCGAGTCATTTTGCAGTCATCATCTG3'
β-Actin Fragment (295 Basenpaare)	
β -Actin forward	5'TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA3'
β -Actin reverse	5'CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG3'

3.1.7. Bakterienstämme und Vektoren

Tabelle 3.6 Verwendete Bakterienstämme, Zellkulturstämmen und Vektoren

Systeme	Vektor
TOPO TA Cloning [®] Version O (Fa. Invitrogen)	pCR [®] 2.1-TOPO [®]
Klonierungsvektor (Fa. Stratagene)	pCR [®] 4-TOPO [®]
GST-Expressionsvektor (Fa. Amersham Pharmacia Biotech)	pBluescript SK(-)-Phagemid
GST-Tag N-terminal	pGEX-KG
Gateway-Entry-System (Invitrogen)	pGEX 4T1
Expressions System für Zellkultur:	pGEX-4T2
GFP-Fusionsprotein C-terminal	pGEX 4T3
GFP-Fusionsprotein N-terminal	p-ENTR/D
	pDEST47
	pDEST53
Verwendungszweck	Bakterien und Zelllinien
Proteinexpression	<i>E. coli</i> BL21
Bakterienkultur	<i>E. coli</i> XL1 MRF
	<i>E. coli</i> DH5 α -T1
Eukaryotische Zelllinien: Transfektionen und Immunohistochemie	COS-7 Zellen („african green monkey kidney“) HeLa-Zellen (humanes Cervix-Karzinom) hTERT-RPE1-Zellen Cath.a-Zelllinie (murines Hirntumorgewebe)

Tabelle 3.7 Zur Selektion von Bakterien verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Arbeitskonzentration (pro ml Medium)
Ampicilin	100 mg/ml in <i>dd</i> H ₂ O	100 μ g
Kanamycin	50 mg/ml in <i>dd</i> H ₂ O	50 μ g
Gentamicin	50 mg/ml in <i>dd</i> H ₂ O	50 μ g
Chloramphenicol	150 mg/ml in Ethanol	150 μ g

3.2. Methoden

3.2.1. Präparationen von Geweben

3.2.1.1. *Präparation der verwendeten Gewebe von Maus und Ratte*

Bevor den Versuchstieren entsprechende Gewebe, Organe und Sinnesepithelien entnommen werden konnten, erfolgte eine Tötung gemäß den Vorgaben des Tierschutzgesetzes (TSchG) der Bundesrepublik Deutschland per Luxation der Halswirbelsäule oder durch CO₂-Inhalation.

Zur Isolierung der Netzhaut (Retina) wurde das Fell um die Augenpartie entfernt, der Augapfel (Bulbus oculi) mit einer gebogenen Pinzette von unten umfasst und dieser durch leichten Zug aus der Augenhöhle (Orbita) gezogen. Anschließend wurde mit einer neuen Rasierklinge ein Längsschnitt durch die Cornea des Auges geführt. Durch vorsichtiges Anheben der Pinzette wurde der Druck im Auge langsam erhöht, und die Linse sowie der Glaskörper des Auges herausgedrückt. Diese wurden mit einer zweiten Pinzette abgezogen. Durch ein weiteres Anheben der gebogenen Pinzette wurde nun die Retina vom Pigmentepithel abgelöst, mit einer feinen Pinzette aus dem Auge entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

Zur Präparation der Cochlea wurde zunächst das Mittelohr von der Seite aus geöffnet. 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, Hoden und Leber entnommen. Für immunohistochemische und elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Gewebe fixiert und eingebettet. Gewebe zur Herstellung von Proteinextrakten oder Isolierung von RNA wurden direkt in dem entsprechenden Puffer aufgenommen und frisch verarbeitet.

3.2.1.2. *Isolierung von Rinderretinae*

Rinderaugen wurden von Dr. Martin Latz frisch von dem lokalen Schlachthof in Alzey bezogen und im Dunkeln auf Eis an die Universität Mainz transportiert. Die Isolierung der Rinderretinae erfolgte unter definiertem Rotlicht, indem das Auge mit einem Schnitt um die

Iris herum geöffnet und die Linse entfernt wurde. Seitlich wurden vier Einschnitte Richtung Sehnerv gesetzt und das Auge umgestülpt. Die Retina konnte mit einer gebogenen Pinzette in Richtung Sehnerv zusammengesoben werden, ohne das Pigmentepithel mitzuführen. Die Retina wurde mit der Pinzette gepackt und in ein Falcon überführt. Jeweils 5 Retinae wurden in bestimmten Puffern in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.2. Biochemische Methoden

3.2.2.1. Herstellung von Proteinextrakten

Proteinextrakte wurden mit drei verschiedenen Extraktionspuffern hergestellt: RIPA-Puffer, modifizierter RIPA-Puffer und Hepes-Puffer. Bei Proteinextraktionen mit modifiziertem RIPA-Puffer wurde dieser auf 100°C erhitzt, zum Gewebe zugegeben und homogenisiert. RIPA-Puffer und Hepes-Puffer wurden kalt zugegeben und auf Eis homogenisiert. Zunächst wurde das Gewebe mittels eines Kunststoff-Pistills in einem Eppendorf-Gefäß (1,5 ml) zerquetscht und anschließend mit einem Ultraschall-Homogenisator homogenisiert. Bei allen Extrakten wurden Proteaseinhibitoren (Pi-Mix der Fa. Sigma: 0,2% und Pefa-Block: 0,5 mM) zugesetzt, um eine Degradation der Proteine zu vermeiden. Das Homogenisat wurde anschließend zentrifugiert (18.000 g, 10 Minuten (min), 4°C), der Überstand entnommen und mit diesem weitergearbeitet. Zur weiteren Verwendung in der SDS-Gelelektrophorese wurde der Proteinextrakt 1:1 mit Laemmli-Puffer (Laemmli, 1970) vermischt.

Lösungen:

RIPA-Puffer

50 mM TRIS-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
1% (v/v) NP-40
0,5% (v/v) Natrium-Deoxycholat
0,1% (w/v) SDS
2 mM EDTA
1 mM Natrium-Vanadat
30 mM Natrium-Pyrophosphat
in $_{dd}H_2O$

Modifizierter RIPA-Puffer

10 mM TRIS-HCl (pH 7,4)
1 mM $CaCl_2$
0,5% (v/v) NP-40
0,5% (v/v) Desoxycholinsäure
0,1% (w/v) SDS
150 mM NaCl
10 mM NaF
20 mM β -Glycerophosphat
in $_{dd}H_2O$

Laemmli-Puffer

125 mM TRIS-HCl (pH 6,8)
4% (w/v) SDS
20% (v/v) Glycerin
10% (v/v) β -Mercaptoethanol
2 mM EDTA
0,04% (w/v) Bromphenolblau
in ddH_2O

Hepes-Puffer

0,5 M Hepes (pH 7,4)
in ddH_2O

3.2.2.2. Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Proteinmenge einer Lösung erfolgte durch Absorbionsmessung bei 260 nm in einer Quarzküvette, wobei eine Absorbtion bei OD_{260} (260nm) von 1,0 einer Proteinmenge von 0,75 mg/ml entspricht (Harlow und Lane, 1988). Frisch hergestellte Gewebeextrakte wurden photometrisch mittels einer Färbereaktion bestimmt (BCA „Assay“). Dabei wurde zunächst eine Eichkurve mittels eines Protein-Standards mit BSA (Rinderserumalbumin) von 0 μ g, 1,0 μ g, 2,5 μ g, 5 μ g, 10 μ g und 20 μ g in 50 μ l 0,05 M Hepes-Puffer angesetzt. Die zu messenden Proben wurden 1:10 und 1:50 verdünnt und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach Zugabe von 1 ml Arbeitslösung (50 Volumen Bicionsäure und 1 Volumen einer 4% $CuSO_4$ -Lösung) zu den verdünnten Proben und Standardlösungen der Eichkurve wurden diese 30 min bei 55°C im Wärmeschrank inkubiert und nach Abkühlen auf Raumtemperatur die Proteinkonzentration anhand der Absorbtion bei 562 nm photometrisch bestimmt.

3.2.2.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Proteinextrakte wurde in 8,0 cm x 10,0 cm x 0,75 mm großen, vertikalen Gelen, einer Protean III Mini-Gelelektrophorese-Einheit (Fa. Biorad), durchgeführt. Hierbei diente ein diskontinuierliches Puffersystem der SDS-PAGE (Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Die diskontinuierliche Matrix besteht aus einem von einem Sammelgel überschichteten Trenngel in einem SDS-haltigen Tris-Glycin-Puffersystem. Für die Analyse wurden Proteingemische mit einem das denaturierende Detergenz SDS enthaltenden Puffer 5 min bei 95°C aufgeköcht, so dass Sekundär- und

Quartärstrukturen zerstört werden. Disulfidbrücken werden durch das reduzierende Reagenz β -Mercaptoethanol aufgebrochen. Durch die Zugabe von SDS kommt es zur Bildung negativ geladener Protein-SDS-Komplexe, die ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis besitzen. Diese negativ geladenen Proteinkomplexe wandern im elektrischen Feld zur positiv geladenen Anode und werden durch die poröse Acrylamidmatrix nach ihrem Stokeschen Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Ein aufgetragener Proteinstandard der Firma Peqlab (Erlangen), ermöglichte die Bestimmung des Molekulargewichts der einzelnen Proteine. Die aus zwei Glasplatten bestehende Gelkammer wurde zum Gießen der Trenn- und Sammelgele in eine Gießvorrichtung eingespannt. Zunächst wurde das Trenngel angesetzt (Tab. 3.8) in die Gelkammer eingefüllt und mit 1 ml Isopropanol (60%) überschichtet. Zum Polymerisieren wurde das Gel in einen Wärmeschrank (55°C) gestellt und nach 15 min das Isopropanol abgegossen und die Oberfläche des Gels mit $d_d\text{H}_2\text{O}$ abgespült. Das Sammelgel wurde anschließend angesetzt (Tab. 3.8) und konnte auf das Trenngel gegossen werden, während ein Kamm mit 10 oder 15 Taschen mit eingelassen wurde. Die Polymerisierung fand ebenfalls 15 min bei 55°C statt. Zwei Gele konnten nach dem Auspolymerisieren in eine Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1x Elektrophoresepuffer befüllt werden. Der Zwischenraum zwischen den zwei Gelen wurde dabei komplett und am Boden ca. 7 cm hoch befüllt. Die zu analysierenden Proteinextrakte wurden 1:1 mit zweifachem Laemmli-Puffer (3.2.2.1) versetzt, in die Taschen der Polyacrylamidgele aufgetragen und bei einer konstanten Spannung von 200 Volt (Power Pac 300, Fa. Biorad) ca. 45 min bei Raumtemperatur aufgetrennt, bis die blaue Laufmittelfront fast komplett durch das Gel gelaufen war.

Die SDS-Gele dieser Arbeit wurden zumeist zu Western Blot Analysen (3.2.2.4) verwendet. Nach einem Western Blot wurden die Banden nicht geblotteter Proteine zur Kontrolle in SDS-Gelen angefärbt. Hierzu wurde das Gel 15 min mit 40% Coomassie-Färbelösung und anschließend mehrere Stunden in wechselnder Entfärbelösung inkubiert, bis der Hintergrund der Gele farblos war. Die Färbung und die Entfärbung der Gele erfolgte auf einem Rundschüttler bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 3.8 **Zusammensetzung der verwendeten Trenn- und Sammelgele**

Stammlösungen	12% Trenngel	15% Trenngel	6% Sammelgel
30% Acrylamid mit 1:37,5 Bisacrylamid	1600 µl	2000 µl	400 µl
4x Trenngelpuffer	1000 µl	1000 µl	---
4x Sammelgelpuffer	---	---	500 µl
<i>dd</i> H ₂ O	1377 µl	977 µl	1088,5 µl
10% APS	20 µl	20 µl	10 µl
TEMED	3 µl	3 µl	1,5 µl
Gesamtvolumen	4000 µl	4000 µl	2000 µl

Lösungen:

10x Elektrophoresepuffer

250 mM Tris-HCl (pH 8,4)

1,92 M Glycin

1% (w/v) SDS

in *dd*H₂O

4x Trenngelpuffer

1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

0,4% (w/v) SDS

in *dd*H₂O

4x Sammelgelpuffer

0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)

0,4% (w/v) SDS

in *dd*H₂O

Coomassie-Färbelösung

40% (v/v) Rotiphorese-Färbelösung

in *dd*H₂O

Entfärbelösung

10% (v/v) Eisessig

25% (v/v) Methanol

in *dd*H₂O

3.2.2.4. *Western Blot Analyse*

Das Western Blotting oder Immunoblotting ist ein sehr empfindliches und spezifisches Verfahren zum Proteinnachweis (Towbin *et al.*, 1979). Es verbindet die hohe Trennschärfe von der SDS-Page mit der Spezifität der Antikörpererkennung. Dieses Verfahren wird sehr häufig zum Trennen und spezifischen Nachweis von Proteinen in Extrakten eingesetzt. Im Western Blot werden in SDS-Gelen aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf eine Trägermembran transferiert. Dabei bleibt die Anordnung der Proteine nach dem Molekulargewicht erhalten und die Identität der Proteine kann mittels Immunodetektion nachgewiesen werden.

Die PVDF-Blotmembran (Fa. Biorad) wurde zunächst 1 min mit 100% Methanol benetzt, um sie Aufnahmefähigkeit für Proteine zu vergrößern. Anschließend wurden die Membranen sowie die SDS-Gele 15 min auf dem Schüttler in Blotpuffer äquilibriert. Auf die Anodenplatte der „Semi-Dry“-Blotapparatur der Fa. Biorad wurden 4 Schichten in Blotpuffer getränktes Filterpapier, darauf die Blotmembran, anschließend das Gel und erneut 4 Schichten in Blotpuffer getränktes Filterpapier gelegt. Die Filterpapierschichten wurden nun mit einem 15 ml Falcon festgerollt, um Luftblasen zu entfernen. Der Proteintransfer erfolgte bei einer konstanten Spannung von 10 Volt (Power Pac 200, Fa. Biorad) ca. 50 min. Nach dem Proteintransfer wurden die Gele vorsichtig abgenommen und wie in 3.2.2.3 beschrieben gefärbt. Genauso wurde der Proteinstandard gefärbt, wenn kein „Prestained“-Marker (Fa. PeqLab) verwendet wurde. Die Membranen wurden nach dem Proteintransfer in Blockierungslösungen inkubiert oder bis zur weiteren Verwendung getrocknet und bei 4°C aufbewahrt.

Lösung:

Blotpuffer

25 mM Tris (pH 8,3)

200 mM Glycin

68 mM CaCl₂

20% Methanol

3.2.2.5. Immunodetektion von Proteinen auf einer PVDF-Membran

Mit diesem Verfahren konnten auf eine Membran transferierte Proteine mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

Nach dem Transfer der Proteine wurde die PVDF-Membran zuerst 1 Stunde (h) in Magermilchlösung und dann eine weitere Stunde in Boehringer Blockierungslösung bei RT auf einem Schüttler blockiert. Der primäre Antikörper wurde in Boehringer Blockierungslösung verdünnt und der Blot darin über Nacht bei RT inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Antikörper abgenommen und der Blot dreimal 15 min mit Tween-Waschpuffer gewaschen, um ungebundene primäre Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 2 h, der auch in Boehringer Blockierungslösung verdünnt wurde. Der Blot wurde wieder dreimal mit Tween-Waschpuffer gewaschen und 1 min mit Äquilibriumslösung inkubiert. Anschließend fand mit der Reaktionslösung (NBT/BCIP) bei Dunkelheit der Proteinnachweis statt, der mit d_4H_2O gestoppt wurde, sobald die Banden sichtbar wurden. Der Blot wurde dann zwischen Filterpapieren getrocknet und ausgewertet.

Lösungen:

Magermilchlösung

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
5% Magermilchpulver
1 mM $CaCl_2$
in d_4H_2O

Boehringer Blockierungslösung

0,5% Boehringer Blockingreagenz
150 mM NaCl
0,04% NaN_3
in d_4H_2O (pH 7,4)

Tween 20 Waschpuffer

0,05% (v/v) Tween 20
10 mM Tris-HCl (pH 7,4)
150 mM NaCl
1 mM $CaCl_2$
in d_4H_2O

Äquilibriumslösung

100 mM Tris-HCl (pH 8,0)
100 mM NaCl
50 mM $MgCl_2$
in d_4H_2O

Färbelösung

400 µl 3% NBT in 75% Dimethylformamid
300 µl 2% BCIP in 100% Dimethylformamid
in 40 ml Äquilibriumlösung

3.2.2.6. „Overlay Assay“ mit rekombinanten Proteinen

Der „Overlay Assay“ (Pulvermüller *et al.*, 2002) ist ein Bindungsnachweis der *in vitro* Interaktionen von Proteinextrakten, die durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membran geblottet wurden, mit rekombinanten Proteinen aufzeigt. Die Membranen mit den transferierten Proteinextrakten wurden mit rekombinant exprimiertem Protein überschichtet und Interaktionen mit den aufgetrennten Proteinen auf der Membran mittels Immunodetektion nachgewiesen.

Zuerst wurden Rinderretinaextrakte (40 µg Extrakt/Spur) mittels SDS-PAGE und „Semi-dry“-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese Membranen wurden in einzelne Spuren geschnitten und 16 h in Magermilchlösung mit 3% BSA und danach 1 h in Boehringer Blockierungslösung bei RT blockiert. Die Membranstreifen wurden anschließend einmal 15 min in HNTG-Puffer (mit Ca²⁺ oder EGTA) gewaschen und über Nacht bei RT in HNTG-Puffer mit 1 mM CaCl₂ oder 6 mM EGTA, 0,5% BSA und rekombinantes MmCen1p (*Mus musculus* Centrin 1 Protein) inkubiert. Nach dreimaligem 10 minütigem waschen mit Tween 20 Waschpuffer wurden die Membranstreifen bei RT 2 bis 4 h getrocknet und dann wieder mit 100% Methanol aktiviert und die Membranen wie in Kapitel 3.2.2.5 mit dem monoklonalen Antikörper gegen das Centrin der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [pan-Centrin (clone 20H5)] inkubiert und visualisiert.

Lösung:

HNTG-Puffer

10% (v/v) Glycerin
0,1% (v/v) Triton X-100
20 mM Hepes (pH 7,5)
150 mM NaCl
1 mM CaCl₂ oder 6 mM EGTA
in *dd*H₂O

3.2.2.7. Koimmunopräzipitation

Die Immunopräzipitation ist eine Methode, um bestimmte Proteine mittels eines spezifischen Antikörpers aus einem Proteinextrakt zu isolieren. In dieser Arbeit wurde diese Methode genutzt, um Centrine aus Rinderretinaextrakten anzureichern, die mit möglichen Interaktionspartnern in Wechselwirkung standen. Dieser Versuchsansatz wurde mit verschiedenen Konzentrationen an freiem Ca^{2+} durchgeführt, um Unterschiede in den Interaktionen mit anderen Proteinen zu erkennen.

Zuerst wurden Rinderretinaextrakte hergestellt und mit HNTG-Puffer mit 25 bis 100 μM Ca^{2+} oder 1 bis 6 mM EGTA 1:9 verdünnt. In der Zwischenzeit wurden pro Ansatz 50 μl Protein A und G gekoppelte Sepharose Kügelchen (Beads, Fa. Pierce) dreimal mit 1 ml HNTG-Puffer gewaschen, jeweils bei 4°C mit 10.000 g die Beads herunterzentrifugiert und anschließend mit 1 bis 5 μl Antikörper (MmCen1, 20H5) und 100 μl HNTG-Puffer bei 4°C 2,5 h im Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze dreimal mit HNTG ($\pm \text{Ca}^{2+}$) gewaschen und mit 100 bis 300 μl Rinderretinaextrakt (aufgefüllt auf 800 μl mit HNTG-Puffer $\pm \text{Ca}^{2+}$) über Nacht in einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze vier Mal mit 700 μl HNTG-Puffer ($\pm \text{Ca}^{2+}$) gewaschen und die Immunokomplexe mit 50 μl 100°C heißem Laemmli-Puffer und Zentrifugation (10 min, 4°C, 18.000g) in Lösung gebracht. Die Analyse der nun aufgetrennten Proteinkomplexe wurde über SDS-PAGE und Western Blot Analysen durchgeführt.

3.2.2.8. GST-„Pull-Down Assay“

Um die Interaktion von Proteinen *in vitro* zu überprüfen, kann man eines der Proteine in *E. coli* als GST-Fusionsprotein exprimieren. Der andere Interaktionspartner wurde in diesen Versuchen aus Proteinextrakten (z. B. Rinderretinaextrakt) gewonnen.

Pro Ansatz wurden 50 μl Glutathionsepharose 4B (Amersham Biosciences) „Beads“ mit 500 μl NETN-Puffer gewaschen und jeweils zentrifugiert (alle Waschschrte waren Zentrifugationsschritte bei 4°C, 5.000 g, 5 min, bei denen die Sepharose abzentrifugiert wurde) und dann mit 200 μl NETN-Puffer und 1 mg BSA/400 μl Beads bei 4°C über Nacht blockiert, um unspezifische Bindungsstellen zu besetzen. Am nächsten Tag wurden die Beads dreimal mit 500 μl NETN-Puffer/Ansatz gewaschen und mit einer geeigneten Menge (hier ca. 300 bis 400 μl) GST-Fusionsprotein, aufgefüllt mit NETN-Puffer auf 700 μl , bei 4°C im Schüttler 3 h inkubiert. Danach wurde die Probe einmal mit 700 μl NETN und dann zweimal mit HNTG-Puffer oder Puffer-F gewaschen. Die Sepharose-Beads wurden dann

mit Proteinextrakt und dem jeweiligen Bindepuffer (HNTG oder Puffer-F) auf 700 µl aufgefüllt und über Nacht bei 4°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Ansätze viermal mit 700 µl Bindepuffer gewaschen und die GST-Fusionsproteine mit den Interaktionspartnern aus den Extrakten 20 bis 30 min bei 25°C in 60 µl Elutionspuffer inkubiert. Anschließend wurden die Beads abzentrifugiert (18.000 g, 10 min bei 4°C) und der Überstand entnommen, mit 30 µl Laemmli-Puffer versetzt und zu der weiteren Analyse auf eine SDS-Page auftragen. Die Interaktionspartner wurden anschließend in Western Blot Analysen nachgewiesen.

Lösungen:

NETN-Puffer

20 mM Tris-HCL (pH 8,0)
100 mM NaCl
1 mM EDTA
0,5% (v/v) NP-40
in *dd*H₂O

Puffer-F

20 mM Hepes (pH 8,0)
100 mM NaCl
2 mM EDTA
10 mM CaCl₂ oder 6 mM EGTA
0,01% (v/v) C12E10 oder 11 mM CHAPS
1 mM DTT
in *dd*H₂O

Elutions Puffer

50 mM Tris-HCL (pH 8,8)
15 mM reduziertes Glutathion
0,01% (v/v) C12E10 oder 11 mM CHAPS
in *dd*H₂O

3.2.2.9. Herstellung von Antikörpern gegen Maus Centrin 2, 3, und 4

Die Herstellung von Antikörpern wurde von der Firma Pineda-Antikörper-Service durchgeführt. Dazu wurden zuerst Prä-Immunsereen von Kaninchen [für Maus Centrin 3 (MmCen3p) und Maus Centrin 4 (MmCen4p)] und Ziegen [für Maus Centrin 2 (MmCen2p)] auf Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen durch Western Blot Analysen und Immunofluoreszenz Analysen getestet. Danach wurde rekombinantes Maus-Centrin 2, 3 und 4 in PBS mit einer Endkonzentration von 2 mg/ml zu der Firma Pineda geschickt und dort

den Kaninchen und der Ziege injiziert. Der Immunisierungsverlauf wurde durch Western Blot Analysen auf ihre Reaktivität überwacht und dokumentiert.

3.2.2.10. Aufreinigung von Antiseren mittels Affinitätschromatographie

Die polyklonalen Antiseren wurden über Affinitätschromatographie an HiTrap-Säulen am Antigen aufgereinigt.

Für die Kopplung des Antigens an die Säule wurden in PBS gelöste rekombinante Centrine durch Zentrifugation (45 min, 14.000 g, 10°C) in 10 kDa Micron-Zentrifugenröhrchen aufkonzentriert und dabei der Puffer PBS durch den Kopplungspuffer ersetzt. Die Zentrifugenröhrchen besitzen eine Membran, die sowohl Salze als auch Proteine, die kleiner als 10 kDa sind, passieren lässt. Nach der Zentrifugation wurden die Proteine mit 500 µl Kopplungspuffer eluiert und nochmals zentrifugiert. Anschließend wurden die Proteine noch einmal in 1 ml Kopplungspuffer eluiert. Zur Kopplung der Antigene an die Säule wurde die Säule dreimal mit 2 ml eiskalter 1mM HCl gewaschen. Danach wurden die 1 ml Antigen-Lösungen geladen [1 Tropfen/2 Sekunden (sec)] und mit Parafilm verschlossen und 30 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert. Dann wurde die Säule dreimal mit 2 ml Puffer A, dreimal mit 2 ml Puffer B und wiederum dreimal mit 2 ml Puffer A gewaschen. Nach einer 30 min Inkubation bei RT wurden die Säulen nochmals drei Mal mit 2 ml Puffer B, dreimal mit 2 ml Puffer A und wieder drei Mal mit 2 ml Puffer B gewaschen. Nach Durchlauf von 2 ml Lagerungspuffer wurden die Säulen bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Am folgenden Tag wurden die mit dem Antigen gekoppelten Säulen dreimal mit 2 ml 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) und anschließend dreimal mit 2 ml 75 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen. Dann wurden 5 ml Antiserum 1:1 mit 150 mM Tris-HCl (pH 8,0) verdünnt und auf die Säule geladen. Die Durchläufe wurden aufgefangen und nochmals auf die Säulen aufgetragen und das Eluat aufgehoben. Anschließend wurden die Säulen mit 75 mM Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen, die Durchläufe in 1 ml Schritten aufgefangen und direkt photometrisch bei 280 nm gemessen bis die OD₂₈₀ kleiner als 0,02 war. Die Elution der affinitätsgekoppelten Antikörper erfolgte mit 100 mM Glycin-HCl (pH 2,5) in 1 ml Fraktionen, wobei die Elutionsfraktionen sofort mit 100 µl 1M Tris-HCl (pH 8,0) neutralisiert wurden. Die Verläufe der Antikörper-Elutionen wurden durch Messungen der OD₂₈₀ verfolgt und bei einem Wert von 0,015 wurden die Elutionen beendet. Die Fraktionen eines Antikörpers über 0,1 wurden vereinigt und mit 0,1% NaN₃ versetzt, portioniert und bei -80°C aufbewahrt.

Lösungen:

Kopplungspuffer

0,2 M NaHCO₃ (pH 8,3)

0,5 M NaCl

in *dd*H₂O

Puffer A

0,5 M Ethanolamin (pH 8,3)

0,5 M NaCl

in *dd*H₂O

Puffer B

0,1 M Natrium-Acetat (pH 4,0)

0,5 M NaCl

in *dd*H₂O

Lagerungspuffer

0,05 M Na₂HPO₄ (pH 7,0)

0,1% NaN₃

in *dd*H₂O

3.2.2.11. Prä-Adsorption der Centrin-Antikörper

Um die Spezifität der polyklonalen Antikörper gegen die Centrin-Isoformen (pMmC1-pMmC4) zu steigern, wurden die verdünnten Antikörper mit den jeweiligen anderen rekombinanten Centrin-Isoformen prä-inkubiert. Für diesen Zweck wurden die jeweiligen rekombinanten Centrin-Isoformen auf PVDF-Membranen immobilisiert und mit den bereits verdünnten affinitätsgereinigten Antikörpern (Tab. 3.2) in Blockierungslösung 12 h bei 4°C inkubiert. Die folgenden Mengen wurden auf 1 ml verdünnten Antikörper verwendet: pMmC1: 200 µg MmCen2, 350 µg MmCen3, 150 µg MmCen4; pMmC2: 400 µg MmCen1, 300 µg MmCen3, 200 µg MmCen4; pMmC3: 100 µg MmCen1, 30 µg MmCen4; pMmC4: 300 µg MmCen1, 200 µg MmCen2, 400µg MmCen3. Der Überstand enthielt die prä-adsorbierten Antikörper und wurden in Western Blot Analysen und in indirekte Immunofluoreszenz Analysen eingesetzt.

Lösung:

Blockierungslösung

0,01% (v/v) TWEEN 20

0,5 M NaCl

0,1% Ovalbumin

0,5% Fischgelatine

in PBS

3.2.3. Phosphorylierungsexperimente

Eine der wichtigsten Mechanismen für die Regulation von Proteinfunktionen verläuft über Veränderungen der Tertiär- und /oder der Quartärstruktur. Eine der häufigsten Mechanismen der Regulation der Proteinaktivität ist das Anhängen und Abspalten von Phosphatgruppen an bestimmte Aminosäuren, welches durch Proteinkinasen und Phosphatasen katalysiert wird.

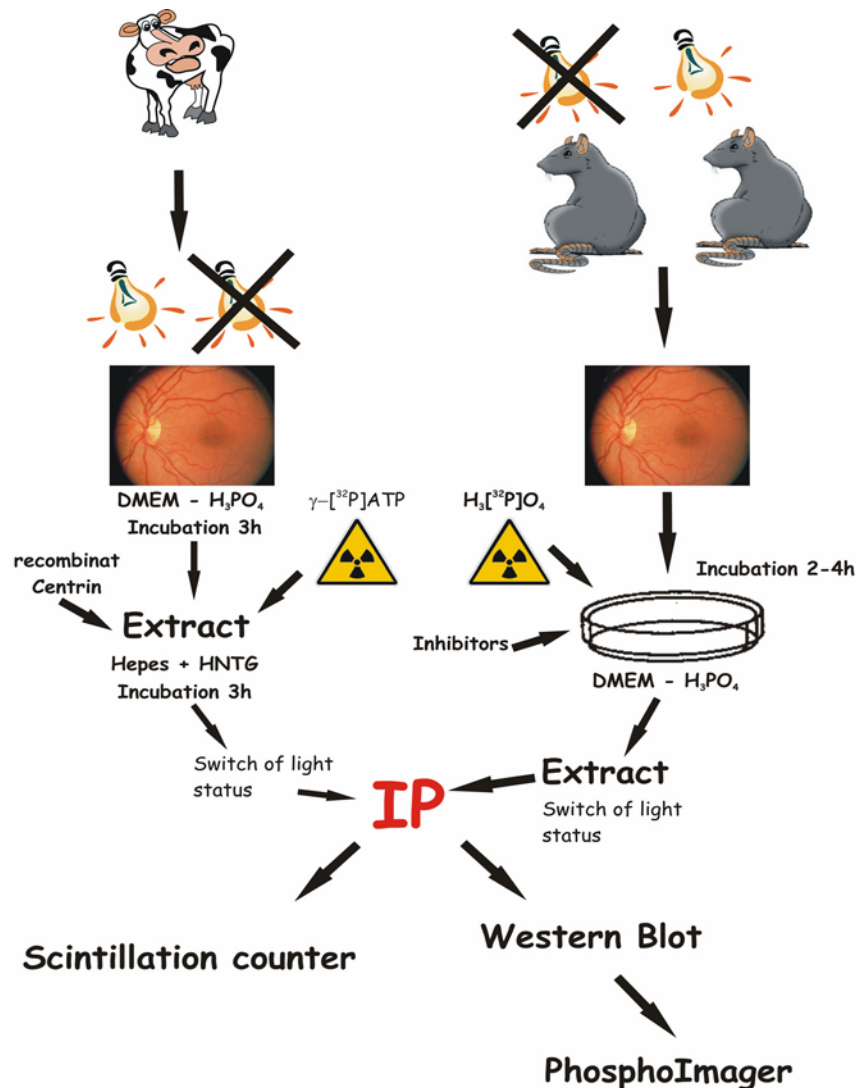


Abbildung 3.1 Biochemische Strategie zur Validierung der lichtabhängigen Phosphorylierungen der Centrine in der Retina

(Linke Seite) Zuerst wurden die dunkel-adaptierten Retinae aus Rinderaugen isoliert. Anschließend wurden die Retinae in Medium hell- und dunkel-adaptiert. Die daraus entstehenden Extrakte mit radioaktivem ATP (γ -[³²P]ATP) und rekombinanten Centrinen inkubiert und die Immunopräzipitation vollzogen. **(Rechte Seite)** Die Ratten wurden hell- und dunkel-adaptiert, die Retinae isoliert und in phosphatfreien DMEM-Medium und radioaktivem Phosphat (H₃[³²P]O₄) weiter hell- und dunkel-adaptiert. Die aus den Retinae hergestellten Extrakte, wurden mittels einer Immunopräzipitation mit dem pan-Centrin (clone 20H5). Die Präzipitate wurden mit dem Szintillationszähler, Western Blots und Phospho-Imager analysiert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Versuchsprotokolle entwickelt, mit deren Hilfe man Phosphorylierungen von Proteinen in Retinae von Ratten und Rindern nachweisen konnte. Hierbei werden Extrakte aus Rinderretinae oder komplett explantierte Rattenretinae mit radioaktivem $AT[^{32}P]$ oder Phosphat ($H_2[^{32}P]O_4^-$) inkubiert und mit Hilfe einer Immunopräzipitation die gewünschten Proteinen aus den Extrakten isoliert. Diese können dann mit Hilfe von Western Blot Analysen nachgewiesen werden. Um die Radioaktivität zu messen, kommen ein Szintillationszähler, Röntgenfilme und ein Phospho-Imager zum Einsatz.

3.2.3.1. Phosphorylierung von Proteinen in Rinderretinaextrakten

Jeweils fünf Rinderretinae wurden mit 5 ml phosphatfreiem DMEM-Medium (Fa. Sigma) versetzt und 2 h hell- bzw. dunkel-adaptiert. Die Adaption fand in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen auf Eis statt. Anschließend wurden die Retinae zentrifugiert (5 min, 3.939 g, 4°C), der Überstand abgenommen und das Pellet in 5 ml Hepes-Puffer resuspendiert. Dann wurden die Retinae durch Ultraschall homogenisiert, in 2 ml Eppendorf-Gefäße aufgeteilt und zentrifugiert (15 min, 18.000 g, 4°C). Anschließend wurden die Überstände in 500 µl Portionen in frische Eppendorf Gefäße aufgeteilt und 3 bis 3,5 h in 5 µl radioaktivem Phosphat ($H_2[^{32}P]O_4^-$) oder alternativ mit $AT[^{32}P]$ bei 4°C inkubiert. Parallel wurden Kontrollen ohne radioaktiven Zusatz mitgeführt. Nach der radioaktiven Inkubation wurde Centrin mit Hilfe einer Immunopräzipitation (3.2.2.7) aus dem Gewebeextrakt isoliert. Während der Immunopräzipitation wurden von allen Waschschritten Proben für die spätere Analyse mit dem Szintillationszähler entnommen. Neben den Immunopräzipitationen wurden auch die Extrakte ausgewertet, um auch weitere phosphorylierte Proteine in den Extrakten detektieren zu können. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der SDS-PAGE (3.2.2.3) und anschließender Western Blot Analyse (3.2.2.4 und 3.2.2.5). Die Messung der Radioaktivität der einzelnen Proben wurde mit Hilfe eines Szintillationszählers durchgeführt. Dazu wurden je 40 µl aller Waschschritte, der Immunopräzipitationen und der Extrakte in Plastikfläschchen überführt und mit je 4 ml Szintillationsflüssigkeit versetzt. Die Plastikfläschchen wurden dann mit einem Deckel verschlossen, vorsichtig gleichmäßig geschüttelt und in größere Glasfläschchen gestellt, die in den Szintillationszähler passten. In einem Szintillationszähler wird die radioaktive Probe mit einer Flüssigkeit gemischt, die eine fluoreszierende Verbindung enthält. Eine Photozelle im Zähler registriert und zählt die Lichtblitze, welche

die fluoreszierenden Verbindungen aussenden, wenn diese die vom Radioisotop emittierten β -Partikel oder γ -Strahlen absorbieren. Die Anzahl der emittierten Lichtblitze ist proportional zur Strahlung der Proben und wird später von dem Szintillationszähler gemessen.

Zur Detektion radioaktiv markierter Proteinbanden in SDS-Gelen oder auf PVDF-Blotmembranen wurden diese zunächst in Plastikfolie eingeschweißt und anschließend in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. In der Dunkelkammer wurde unter Rotlicht ein Röntgenfilm auf die Proben gelegt. Mit einem wasserfesten Stift konnte man den Umriss der Membran beziehungsweise des Gels auf dem Röntgenfilm markieren. Der Röntgenfilm wurde nach 5 bis 8 Tagen in der Dunkelkammer unter Rotlicht entwickelt. Dazu wurde der Film aus der Röntgenfilmkassette genommen und 90 sec in Entwicklerlösung getaucht. Anschließend wurde der Film für ca. 90 sec mit d_2 H₂O gewaschen und mehrere Minuten in Fixierlösung inkubiert. Im Anschluss daran wurde der Film erneut mehrere Minuten in d_2 H₂O gewaschen und anschließend aufgehängt und getrocknet.

Die Blotmembranen und Gele wurden zusätzlich mit einem Phospho-Imager ausgewertet, da dieses Gerät eine höhere Empfindlichkeit zur Detektion von radioaktiver Strahlung besitzt als Röntgenfilme. Phospho-Imager messen die Anzahl der Zerfälle in dpm (engl. „dots per minute“) für jeden Punkt der Oberfläche einer Membran. Zu diesem Zweck wurden die Blotmembranen und Gele wie oben beschrieben in eine Röntgenfilmkassette eingelegt. Anstelle eines Röntgenfilms wurde jedoch ein mit BaFBr: Eu-Kristallen beschichteter „Screen“ aufgelegt. Durch Oxidationen und Reduktionen des Europiums (Eu) kommt es zur Emission von Lichtquanten, die vom Phospho-Imager gemessen werden.

3.2.3.2. Phosphorylierung rekombinanter Centrine durch Rinderretinaextrakte

Da in Zellextrakten alle Enzyme der Zellen biologisch aktiv vorliegen wurde versucht, mit Hilfe von Rinderretinaextrakten rekombinant exprimiertes Centrin zu phosphorylieren. Dabei wurde wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben verfahren, mit dem Unterschied, dass zu den Extrakten noch ca. 100 μ g exprimiertes Centrin (Isoformen 1 bis 4) zugegeben wurden.

3.2.3.3. „Ex vivo“ Phosphorylierung von Centrin in explantierten Rattenretinae

Ratten wurden 12 Stunden im Hellen beziehungsweise im Dunkeln gehalten, um ihre Retinae hell beziehungsweise dunkel zu adaptieren. Die Ratten wurden dann im Hellen

beziehungsweise im Dunkeln getötet, die Retinae präpariert und direkt in jeweils ein „well“ einer 24 „well“ Zellkulturschale überführt, in die jeweils 500 µl phosphatfreies DMEM-Medium vorgelegt wurde. Die Zellkulturschalen mit den adaptierten Retinae blieben bis zur Inkubation mit radioaktivem Phosphat im Hellen beziehungsweise im Dunkeln bei 30°C. Anschließend wurde das DMEM abgezogen und durch 0,5 ml phosphatfreies DMEM mit ca. 50 µCi H₃[³²P]O₄ ersetzt. Nun wurden die dunkel-adaptierten Retinae im Hellen und die hell-adaptierten im Dunkeln 3 - 6 h inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurden die Retinae aus dem DMEM genommen, in frische 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und zweimal mit HNTG-Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Retinae abzentrifugiert (1 min, 1750 g, 4°C). Die Retinae wurden anschließend mit 100 µl modifiziertem Ripa-Puffer (95°C) versetzt und mittels Ultraschall homogenisiert. Mit den Retinaextrakten wurden dann Immunopräzipitationen durchgeführt. Die Auswertung erfolgt wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben.

Lösung:

Entwicklerlösung

25% Entwickler

in *dd*H₂O

3.2.4. Molekularbiologische Methoden

3.2.4.1. Isolierung von hochmolekularer RNA

In dieser Arbeit wurde hochmolekulare RNA isoliert, um mRNA mit Hilfe der reversen Transkription (RT) (3.2.4.3) in cDNA zu übersetzen. Anschließend wurde dann mittels PCR (3.2.4.2) und spezifischen Primern die spezifische Protein cDNA in den verschiedenen Geweben nachgewiesen. Dabei schützt das Reagenz TRIzol™ der Fa. Gibco BRL, welches aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat besteht, die Nukleotide, während andere Zellbestandteile zersetzt werden.

Als Ausgangsmaterial für die RNA-Präparation wurden verschiedene Gewebe von Ratte und Maus benutzt, die immer frisch präpariert und verwendet wurden. 100 mg Gewebe wurden unter dem Abzug mit 1 ml TRIzol™-Reagenz versetzt und mit einem Ultraturax homogenisiert. Nach Freisetzung der RNA aus dem Gewebe wurden die Proben mit 200 µl kaltem Chloroform pro 1 ml TRIzol™-Reagenz versetzt, um Proteine zu fällen.

Anschließend wurden die Proben gevortext und 5 min bei RT inkubiert und dann 10 min bei 18.000 g (4°C) abzentrifugiert. Die obere klare wässrige Phase wurde abgenommen, in neue 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt, 1:1 mit kaltem Isopropanol verdünnt und 5 min bei RT inkubiert. Durch die Behandlung mit Isopropanol fallen alle in der wässrigen Lösung vorhandenen Nukleinsäuren aus, die durch Zentrifugation (10 min, 18.000 g, 4°C) pelletiert wurden. Die obere Phase wurde nun verworfen und das Eppendorf-Gefäß zum Trocknen des Pellets falsch herum auf ein Stück Zellstoff gestellt. Die pelletierten Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 400 µl Ethanol (75%) gewaschen, gevortext und wieder abzentrifugiert (10 min, 18.000 g, 4°C). Das Pellet wurde erneut getrocknet und dann in 400 µl *dd*H₂O gelöst. Durch Zugabe von 400 µl Lithiumchlorid-Lösung (4M) fällt die mRNA und rRNA aus, DNA und niedermolekulare RNA bleiben in Lösung. Die Fällung erfolgte über Nacht bei -20°C. Am nächsten Tag wurden die Nukleinsäuren wiederholt mit 75% Ethanol gewaschen. Die getrocknete und pelletierte RNA wurde anschließend in 40 µl *dd*H₂O resuspendiert und die Menge und Reinheit im Spektralphotometer (Fa. Biorad) in einer Quarzküvette bestimmt. Die Probe wurde 1:50 in *dd*H₂O verdünnt und gegen den Leerwert (reines *dd*H₂O) gemessen. Die optische Dichte (OD) der Probe wurde bei 260 nm (Gehalt an Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Menge der Proteinverunreinigungen) bestimmt. Eine OD₂₆₀ von 1,0 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt den Reinheitsgrad einer Nukleinsäurelösung an und sollte bei 1,7 bis 2,0 liegen. Die tatsächliche Konzentration an RNA in den Gewebeproben wurde mit folgender Formel berechnet:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (50)} \times 0,04 = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

3.2.4.2. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. „*polymerase chain reaction*“, PCR) ist eine Methode, mit der spezielle Nukleinsäuren (DNA oder cDNA Abschnitte) *in vitro* exponentiell amplifiziert werden können. Um nur bestimmte DNA oder cDNA Abschnitte zu vervielfältigen, werden spezifische Oligonukleotidpaare, die den entsprechenden Abschnitt flankieren, der PCR als „Primer“ (3.1.6) zugesetzt. Zunächst wird die zu vervielfältigende DNA denaturiert, dann folgt die Hybridisierung der Primer mit der nun einzelsträngigen Template-DNA. Eine hitzestabile Taq-Polymerase (*Thermophilus aquaticus*-Polymerase) verlängert die Primer und die komplementäre DNA wird in 5`-3`-


Richtung unter Verwendung von Nukleotidtriphosphaten (dNTPs) gebildet. Da im nächsten Schritt auch die neusynthetisierten DNA-Stränge als Matrizen dienen, wird bei der PCR die Zielsequenz exponentiell vermehrt.

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Der Ansatz der Reaktion wurden mit d_2H_2O auf 49,5 μ l Volumen aufgefüllt:

1,5 ng DNA-Template
5,0 μ l PCR-Puffer
3,0 μ l $MgCl_2$
0,5 μ l dNTP
1,0 μ l „forward“-Primer
1,0 μ l „reverse“-Primer

Die Zugabe der 0,5 μ l Taq-Polymerase erfolgte erst nach einer Inkubation im Thermocycler (Fa. Whatman Biometra) bei 80°C (sog. „hot-start“).

Das verwendete Standardprogramm des Thermocyclers umfasste folgende Schritte:

- ♥ 3 min bei 80°C, danach Zugabe von 0,5 μ l Taq-Polymerase
 - ♥ Denaturierung bei 94°C (15 sec)
 - ♥ Hybridisierung (Annealing) der Primer bei 55°C (30 sec)
 - ♥ Verlängerung (Elongation) der Primer bei 72°C (90 sec)
 - ♥ Verlängerung bei 72°C (100 sec)
 - ♥ Abschließend 4°C (∞)
- 39 Zyklen 

Zur Kontrolle der PCR wurden die Proben mittels einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Amplifikate bei -20°C aufbewahrt.

3.2.4.3. Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Die RT-PCR dient der Herstellung von cDNA („complementary“ DNA) aus mRNA. Dies wird durch das Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht, welches eine RNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt. Als Primer wurden Oligo-dT-Primer eingesetzt, die aus 16-20 Thymidin Nukleotiden bestehen. Diese induzieren die Synthese der cDNA, indem die Primer an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden und die cDNA fortlaufend in Richtung

des 5'-Endes synthetisieren. Auf diese Weise wird jede in der Probe enthaltene mRNA in cDNA umgeschrieben.

Für die Synthese von cDNA wurde der cDNA Cycle Kit der Fa. Invitrogen mit der Reversen Transkriptase von der Fa. Promega verwendet. Zuerst wurden 1 bis 3 µg der präparierten RNA (3.2.4.1) in ein RNase freies Eppendorf-Gefäß vorgelegt, mit dH_2O auf 11,5 µl aufgefüllt und mit 1 µl Oligo-dT-Primer (0,2 µg/µl) versetzt. Danach wurde der Ansatz 10 min bei 65°C in dem Thermocycler (Fa. Whatman Biometra) erhitzt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzubrechen. Damit die Primer an die RNA binden konnten, folgte eine Inkubation bei RT für 2 min. Danach wurde der Ansatz mit 1 µl RNase Inhibitor, 4 µl 5x RT-Puffer, 1 µl dNTPs, 1 µl Natrium Pyrophosphat und 0,5 µl Reverse Transkriptase komplettiert und 1 h bei 42°C inkubiert, daraufhin 2 min bei 95°C erhitzt und anschließend auf 4°C abgekühlt. War die Menge der eingesetzten RNA nicht sehr hoch, wurde der ganze Vorgang mit 0,5 µl Reverse Transkriptase noch mal wiederholt. Die so erhaltene cDNA wurde innerhalb von 2 h weiterverarbeitet (z.B. PCR), da cDNA im Allgemeinen sehr instabil ist.

3.2.4.4. Auftrennung der DNA durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Molekülen erfolgte durch horizontale Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook *et al.*, 1989) in Flachbett-Elektrophoresekammern der Fa. Amersham Biosciences und Fa. Biorad. Durch Anlegen einer elektrischen Spannung wandert die negativ geladenen DNA zur Anode und wird durch die Agarosegelmatrix der Größe nach aufgetrennt.

Die DNA-Fragmente wurden je nach ihrer Größe in 0,75-2%igen Agarosegelen mit 0,5 mg/ml Ethidiumbromid (Fa. Roth) in analytischem oder präparativem Maßstab aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1x TAE-Puffer angesetzt und kurz durch Aufkochen in einer Mikrowelle gelöst. Zur flüssigen Agarose wurde vor dem Gießen des Gels 0,5 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Die Proben wurden mit 1/6 Ladepuffer versetzt und als Größenstandard wurde 1 bis 2 µl einer 1 kb DNA-Leiter verwendet. Die Elektrophorese wurde bei konstanter Spannung (72 Volt) für ca. 30 min in 1x TAE-Laufpuffer durchgeführt. Die Nukleinsäurebanden wurden im Anschluss auf einem UV-Transilluminator (254 nm) visualisiert und mit dem Dokumentationssystem der Fa. Biostep dokumentiert.

Lösungen:

<u>5x TAE (Stammlösung)</u>	<u>6x Ladepuffer</u>
200 mM Tris-HCl (pH 7,4)	0,05% (w/v) Bromphenolblau
100 mM Na-Acetat	0,2% (w/v) SDS
5 mM EDTA	50% (v/v) Glycerin
in d_4H_2O	in 1x TAE

3.2.4.5. Kultivierung von *Escherichia coli* Bakterien

Escherichia coli Bakterien wurden in Flüssigmedien oder auf Agarplatten kultiviert (Sambrook *et al.*, 1989). Die verwendeten Bakterienstämme verfügen über Resistenzen gegenüber verschiedener Antibiotika, so dass die Reinheit der Bakterienstämme durch Zusatz entsprechender Antibiotika zu den Medien gewährleistet wurde. 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 (Glycerinstocks) mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers 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 LB-Agarplatte oder von einem Glycerinstock mit einer sterilen Spitze in ein steriles Kulturröhrchen mit Selektionsmedium übertragen (Übernachtskultur, ÜK). Die Kultivierung erfolgte in einem Schüttelinkubator über Nacht bei 37°C. Bakteriendauerkulturen wurden in Form von Glycerinstocks angelegt. Dabei wurden 750 µl einer ÜK zusammen mit 200 µl Glycerin in ein steriles Schraubdeckel-Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C weggefroren und gelagert.

3.2.4.6. Herstellung und Transformation kompetenter *E. coli* Bakterien

Die Fähigkeit zur Aufnahme extrazellulärer DNA ist eine generelle Eigenschaft von Zellen. Um die Effektivität der Aufnahme zu erhöhen, werden *E. coli* Zellen durch Behandlung mit CaCl₂ und Rubidiumchlorid zur Aufnahme von DNA befähigt (kompetente Zellen).

E. coli Bakterien wurden unter der Sterilbank auf LB-Tetracyclin-Platten (12,5 µg/ml) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im Inkubationsschrank vermehrt. Am nächsten Tag wurden Übernachtskulturen mit 2,5 ml SOB-Medium von Kolonien der Platten erstellt und über Nacht bei 37°C vermehrt. Diese Subkulturen wurden 1:100 mit SOB-Medium verdünnt

und nach der Zugabe von 20 mM MgSO₄ bei 37°C im Inkubationsschüttler bis zu einer OD₅₉₀ von 0,55 bis 0,6 vermehrt. Anschließend wurden die Bakterien abzentrifugiert (5 min, 3.939 g, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet in 40 ml TFB1-Puffer resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte wieder eine Zentrifugation, das Pellet wurde nun mit 4 ml TFB2-Puffer resuspendiert und auf Eis inkubiert. Nach 50 min konnte man die Bakterien à 100 µl in frische Eppendorf-Gefäße aliquotieren, sofort in flüssigem Stickstoff einfrieren und über Monate bei -80°C aufbewahren.

Bei einer Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterien aus einer -80°C Kühltruhe entnommen und mit der zu transformierenden DNA versetzt. Bei Ligationsansätzen wurden diese zunächst 1:5 in TE-Puffer verdünnt und anschließend die Hälfte davon eingesetzt. Bei einer Plasmid-Mini Präparation wurden 1 bis 2,5 µl Plasmid DNA eingesetzt. Die Bakterien wurden 30 min auf Eis inkubiert, um die DNA an die Zellwand zu binden. Danach genau 90 sec in einem auf 42°C temperierten Wärmeblock gestellt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Der Hitzeschock diente der DNA Aufnahme. Anschließend wurden die Bakterien mit 800 µl LB-Medium mit 25 mM Glucose versetzt und 45 min im Inkubationsschüttler inkubiert. Nach der Regenerationszeit der Bakterien wurden ca. 100 µl des Ansatzes auf LB-Platten mit 75 µg/ml Ampicilin ausplattiert. Die LB-Ampicilin-Platten konnten vorher mit 100 µl Färbelösung (IPTG: X Gal, 1:1) bestrichen werden. Es gab 2 Selektionsmöglichkeiten:

- ♥ Die Plasmide enthielten ein Resistenzgen, welches zu einer Antibiotikaresistenz der Bakterien nach erfolgreicher Transformation führte und so nur transformierte Bakterien als Kolonien wachsen konnten.
- ♥ Das Gen für das Enzym β-Galactosidase war in den Plasmiden enthalten, welches im intakten Zustand den modifizierten Zucker X-Gal spaltet und so eine blaue Farbreaktion auslöst. Durch Einführen eines Inserts wurde diese Eigenschaft des Gens zerstört und es entstanden weiße Kolonien, dessen Bakterien ein Plasmid mit Insert trugen.

Nach Inkubation der Platten bei 37°C über Nacht wurden nur die weißen Kolonien wieder vermehrt.

Lösungen:

SOB-Medium

20 g BactoTrypton

5 g Hefeextrakt

9 mM NaCl

2,5 mM KCl

in 1 l *dd*H₂O

pH 7,0

Autoklavieren

Steril filtrieren

TFB1-Puffer

100 mM RbCl₂

50 mM MnCl₂

30 mM KAc

10 mM CaCl₂

15% (v/v) Glycerol

in *dd*H₂O

pH 5,8

TFB2-Puffer

10 mM MOPS (pH 6,5)

10 mM RbCl

75 mM CaCl₂

15% (v/v) Glycerol

in *dd*H₂O

Steril filtrieren

Färbelösung

2% (w/v) X-Gal

in Dimethylformamid

24 mg IPTG

in 1 ml *dd*H₂O

LB-Medium für Agar Platten

171 mM NaCl

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

2% (w/v) Bacto-Agar

in 1 l *dd*H₂O

Autoklavieren

LB-Medium für ÜKs

171 mM NaCl

1% (w/v) Trypton

0,5% (w/v) Hefeextrakt

in 1 l *dd*H₂O

Autoklavieren

TE-Puffer

10 mM Tris-HCl (pH 8,0)

1 mM EDTA

in *dd*H₂O

Steril filtrieren

3.2.4.7. Klonierung von PCR-Produkten mit dem TOPO TA Cloning™ Kit

DNA Fragmente aus RT-PCR und PCR Versuchen müssen sequenziert, aufbewahrt und später z.B. in Expressionsvektoren (Tab. 3.6) umkloniert werden. In dieser Arbeit wurde vor allem das TOPO TA Cloning™ Kit for Sequencing (Fa. Invitrogen) verwendet, welches zur Besonderheit hat, dass keine Ligase mehr zu dem Reaktionsansatz zugegeben werden muss, sondern der Vektor eine Topoisomerase enthält, die zugleich als Restriktionsenzym und als Ligase funktioniert. Dabei ist es wichtig, dass das ligierte PCR-Amplifikat mittels einer Taq-Polymerase erstellt wird, damit die Isomerase die Enden des PCR-Amplifikates erkennen und einbauen kann (Abb. 3.2). Wichtige Vorteile sind die enorme Zeitersparnis und die einfache Handhabung des Kits.

Bei der Klonierung von PCR-Produkten wurde im Wesentlichen nach der Vorschrift des Herstellers verfahren, wobei in dem Reaktionsansatz bei der Inkubation nicht wie angegeben 1 µl des Topo-Vektor eingesetzt wurde, sondern 0,5 µl. Weiterhin wurden auch standardmäßig 4,5 µl PCR-Ansatz für die Reaktionslösung eingesetzt. Das ganze Reaktionsgemisch wurde anschließend in kompetente Bakterien transformiert, die selber hergestellt wurden (3.2.4.6).

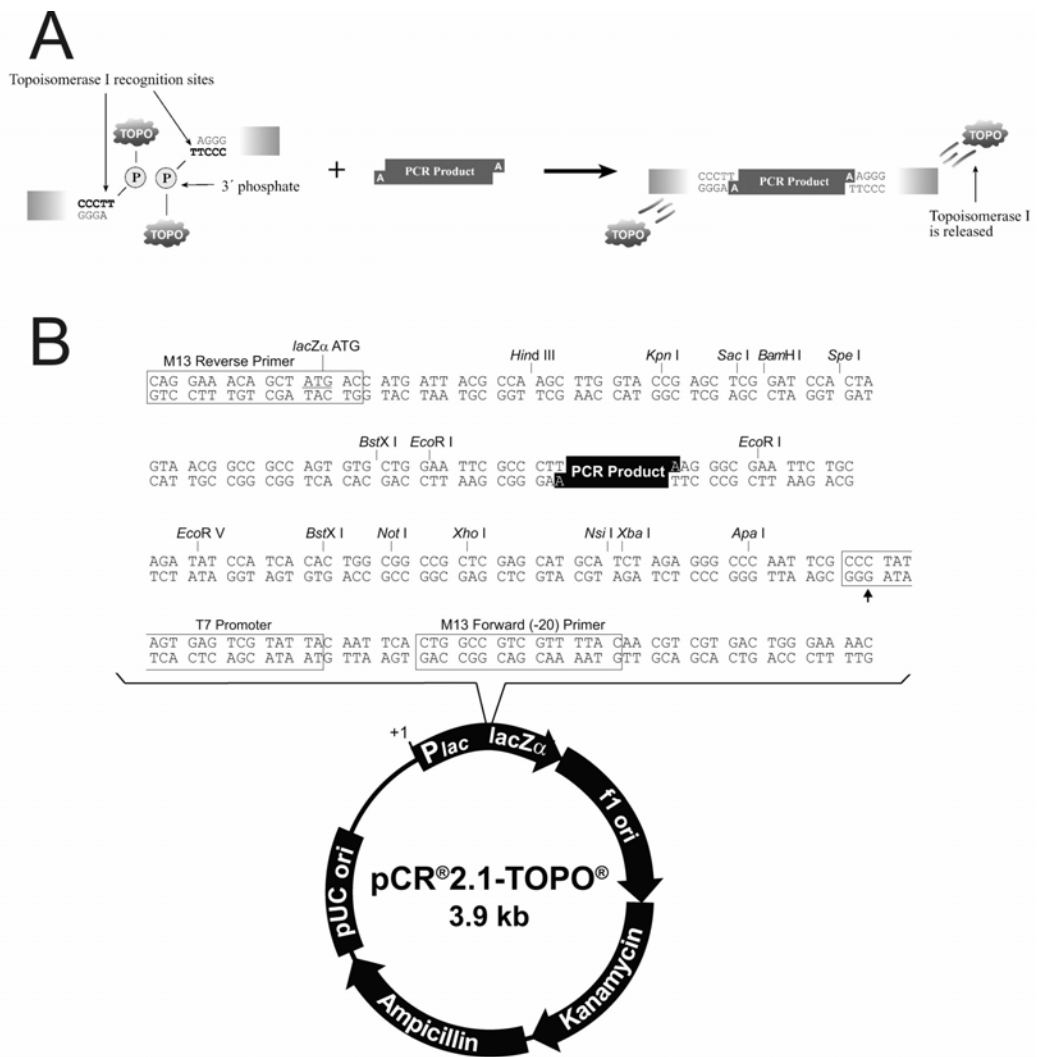


Abbildung 3.2 Schema der Topo-Isomerasen-Methode und Karte des Sequenzierungsvektors pCR[®] 2.1-TOPO

(A) Methode der Klonierung mit Hilfe der Topo-Isomerase-Methode von der Firma Invitrogen. (B) Vektorkarte und vergrößerte Darstellung der „multiple cloning site“ des Vektors

Lösungen:

SOC-Medium

- 2% (w/v) Trypton
- 0,5% (w/v) Hefeextrakt
- 10 mM NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂
- 10 mM MgSO₄
- 20 mM Glucose
- in 6ml *dd*H₂O

Salzlösung

- 1,2 M NaCl₂
- 0,06 M MgCl₂
- in 50 µl *dd*H₂O

3.2.4.8. Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien

Zur Isolierung der Plasmide aus Bakterien wurden zuerst Übernachtkulturen in LB-Medium angesetzt, am nächsten Tag Glycerinstocks hergestellt und der Rest zentrifugiert (10 min, 3.939 g, 4°C), um die Bakterien vom Medium zu trennen. Zur Isolierung der bakteriellen Plasmide wurde im Rahmen dieser Arbeit das E.Z.N.A.™ Plasmid Miniprep Kit I der Fa. PeqLab verwendet. Das Kit bewirkt zunächst die alkalische Lyse der Bakterien. Anschließend wurden die selektiven und reversiblen DNA-Bindeeigenschaften von Silikamembranen genutzt, um die DNA über eine Zentrifugationssäule zu isolieren. Dabei wurden im Wesentlichen die Vorschriften der Fa. PepLab befolgt und alle optionalen Waschschrte durchgeführt. Die Zentrifugationsschritte wurden allerdings alle mit 18.000 g durchgeführt. Nach Anwendung des Kits wurde die Plasmid DNA in 40-60 µl *dd*H₂O (60°C) eluiert.

3.2.4.9. Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Um einklonierte PCR-Fragmente in den Plasmiden nach ihrer Größe zu identifizieren oder DNA-Fragmente in andere Vektoren umzuklonieren (z.B. in Expressionsvektoren) müssen die Inserts und auch Plasmide erst restringiert werden. Dabei bediente man sich Restriktionsnukleasen und Puffern der Fa. Sigma und der Fa. Biozym. In dieser Arbeit wurden meist die Restriktionsenzyme XhoI und BamHI verwendet, die schon in den Primern für die RT-PCR (Tab. 3.5) mit eingebaut wurden. Als Beispiel wurden zwei Restriktionsansätze (Kontrollansatz eines Inserts mit 10 µl DNA und ein Plasmidrestriktionsansatz für die Vorbereitung eines Plasmids zur Umklonierung) aufgezeigt:

Kontrollrestriktionsansatz

10 µl Plasmid
1 µl XhoI
1,5 µl BamHI
2 µl 10x SB-Puffer
5,5 µl *dd*H₂O

Σ 20 µl

Plasmidrestriktionsansatz

100 µl pGex 4T3 Vektor
6 µl BamHI
5 µl XhoI
20 µl 10x SB-Puffer
69 µl *dd*H₂O

Σ 200 µl

Die Restriktionsansätze wurden 2 bis 12 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert und im Agarosegel kontrolliert. Waren Inserts mit der berechneten Größe vorhanden, wurden 15 µl der ungeschnittenen Plasmid-DNA mit Hilfe der Fa. GENterprise sequenziert, um die Inserts zu identifizieren. Die Insertrestriktionen und Plasmidrestriktionen für die Umklonierung in andere Vektoren wurden ebenfalls mit der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, kontrolliert und aufgereinigt.

3.2.4.10. Aufreinigung von DNA aus der Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Auftrennung der DNA-Banden in Agarose-Gelelektrophoresen müssen die Plasmide und DNA-Fragmente aufgereinigt werden, um die störenden Restriktionsenzyme und Puffer für die spätere Ligation der Vektoren und Inserts zu entfernen.

Dabei wurden die gewünschten DNA-Banden unter UV-Licht mit einer Rasierklinge aus dem Agarose-Gel geschnitten und in ein zuvor gewogenes 15 ml Falcon überführt. Die DNA sollte dem UV-Licht nur so kurz wie möglich ausgesetzt sein, weil das UV-Licht bei längerer Exposition die DNA schädigt. Die Extraktion der DNA aus dem Agarose-Gel erfolgte nun mit dem E.Z.N.A.[™] Gel Extraction Kit von der Fa. PeqLab, wobei die Vorschrift des Herstellers mit allen optionalen Waschschrritten befolgt wurde. Die DNA wurde zum Schluss in 50 µl *dd*H₂O (60°C) von der Säule eluiert und die DNA-Konzentration mit folgender Formel in einer Quarzküvette bei 260 nm im Spektralphotometer bestimmt:

$$OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,05 = \text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

3.2.4.11. Ligation eines DNA-Fragmentes in einen Vektor

Die Ligationen erfolgten mit ca. 100 ng Vektor-DNA und der fünffachen molaren Menge des gewünschten DNA-Fragmentes in einem Reaktionsvolumen von 20 µl. Der Ligationsansatz enthielt neben der DNA 4 µl T4-DNA-Ligase und 6 µl Ligase-Puffer und wurde über Nacht bei 16°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die rekombinanten Plasmide in kompetente Bakterien transformiert.

3.2.4.12. Rekombinante Expression von GST-Fusionsproteinen

Expressionsvektoren unterscheiden sich von normalen Vektoren durch einen bakteriellen Promotor, der die Expression eines klonierten DNA-Fragmentes kontrolliert. Durch spezifische Substanzen kann die Expression an diesem Promotor gestartet werden. Die hier verwendeten Vektoren pGex-KG, pGex 4T1, pGex-4T2, pGex 4T3 (Fa. Amersham Biosciences) enthalten den Promotor für das lacZ Gen, an dem die Expression durch Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid (IPTG) gestartet werden kann. Die Vektoren enthalten außerdem das Gen für das Protein Glutathion-S-Transferase (GST) direkt vor der „multiple cloning site“, in die das Insert kloniert wird. Dies führt dazu, dass ein Fusionsprotein, bestehend aus dem Protein Glutathion-S-Transferase (GST) und dem klonierten DNA-Fragment, exprimiert wird. Die Expression als Fusionsprotein ermöglicht es das Fusionsprotein durch Affinitätschromatographie zu isolieren oder auch das GST vom „Insert“-Protein mittels einer Thrombin-Protease zu trennen.

Zunächst wurde 1 l YT-Medium autoklaviert und mit 100 mg Ampicillin und einer Übernachtskultur des Expressionsvektors in *E. coli* BL21 versetzt und die Bakterien ca. 3 h bei 37°C vermehrt, bis eine optische Dichte (OD) bei 600 nm von 0,6 – 0,8 erreicht wurde. Dann wurde die Expression der Proteine durch die Zugabe von 5 ml IPTG gestartet. Nach 3 - 4 h in dem Schüttler bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 3.939 g, 4°C) und die Überstände verworfen. Die Bakterien wurden über Nacht bei -80°C eingefroren, wobei das gefrierende Wasser in den Bakterien die Zellmembranen aufbrach. Am nächsten Tag wurden die Pellets in je 45 ml PBS für GST resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension mit 4,5 ml Lysozymlösung versetzt, um die Bakterienwände zu zersetzen und 30 min auf Eis inkubiert, wobei die Bakterienlysate mehrmals geschüttelt wurden. Danach wurden die Bakterien kurz mit Ultraschall behandelt, um die Membranen zusätzlich aufzubrechen. Anschließend wurden die Lysate in Ultrazentrifugenröhrchen überführt (Sorvall Ultrazentrifuge RC-5B, Rotor SS-34) und 10 min mit 14.500 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden „gepoolt“ und 100 μ l für eine Proteinbestimmung (3.2.2.2) und ein SDS-Gel abgenommen. Die Fusionsproteine wurden dann mit Hilfe der Affinitätschromatographie (3.2.4.13) aus dem Überstand isoliert.

Lösungen:

<u>YT-Medium</u>	<u>1x PBS für GST</u>
1,6% (w/v) Trypton	140 mM NaCl
1% (w/v) Hefeextrakt	2,7 mM KCl
86 mM NaCl	10 mM Na ₂ HPO ₄
in 1 l <i>dd</i> H ₂ O	1,8 mM KH ₂ PO ₄
pH 7,0	in <i>dd</i> H ₂ O
Autoklavieren	pH 7,3

Lysozymlösung

200 mg Lysozym
in 20 ml Tris-HCl (25 mM, pH 8,0)

3.2.4.13. Aufreinigung und Trennung von GST-Fusionsproteinen

Die Affinitätschromatographie beruht auf spezifischen Wechselwirkungen zwischen zwei Molekülen. Hier ist es die Interaktion zwischen dem Enzym GST und seinem Ligand Glutathion, wobei der Ligand in einer Chromatographie-Säule an eine Matrix aus Sepharose-Beads gekoppelt ist. Gibt man nun das zuvor als Fusionsprotein exprimierte Insert-Protein auf diese Säule, bindet der GST-Teil des Fusionsproteins über seinen N-Terminus an Glutathion. Zur Gewinnung des Insert-Proteins wird der GST-Teil des Fusionsproteins mit Hilfe des proteolytischen Enzyms Thrombin geschnitten. Der GST-Teil bleibt über Glutathion an die Matrix gebunden, das Insert-Protein kann nun eluiert werden.

Es wurden zur Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus 4 l Medium 2,66 ml Glutathion Sepharose™ 4B Beads auf eine Säule gegeben und mit 20 ml 1x PBS gewaschen. Danach wurde das Bakterienlysate auf die Säule gegeben und nach dem Durchlauf die Säule noch mal mit 40 ml PBS gewaschen. Zur Abtrennung des GST-Proteins wurde die Säule mit 100 µl Thrombin (5% in 1x PBS) beladen, mit Parafilm verschlossen und 2 bis 24 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule geöffnet und das Eluat gesammelt. Zur vollständigen Elution der Proteine wurde die Säule 4- bis 6x mit 1 ml 1x PBS gewaschen und das Washwasser gesammelt. Durch den Thrombinverdau des Fusionsproteins enthält das Eluat nur das von der Insert-DNA codierte Protein. Nachfolgend wurde die Menge an exprimiertem Protein durch einen BCA „Assay“ (3.2.2.2) ermittelt.

3.2.4.14. Herstellung eines GFP-Fusionsproteins für eukaryotische Zellen

Um ein GFP-Fusionsprotein („*green-fluorescent-protein*“) herzustellen wurde die Gateway® Technology von der Fa. Invitrogen verwendet. Diese Technology ist eine universale Klonierungs-Methode, die auf der end-spezifischen Rekombinierung der Bakteriophage Lambda (Landy, 1989) beruht. Das System hat den Vorteil eines schnellen und effizienten Weges DNA-Sequenzen in viele verschiedene Vektorsysteme einzuschleusen (Hartley *et al.*, 2000).

Hierbei wurde die Insert-DNA in einen pENTR/D-Vektor kloniert und später mit dem p-Dest-53-Vektor zusammen ein GFP-Fusionsprotein Vektor erstellt (Abb. 3.3), der dann für die Transfektion in eukaryotischen Zellen verwendet werden konnte (3.2.5).

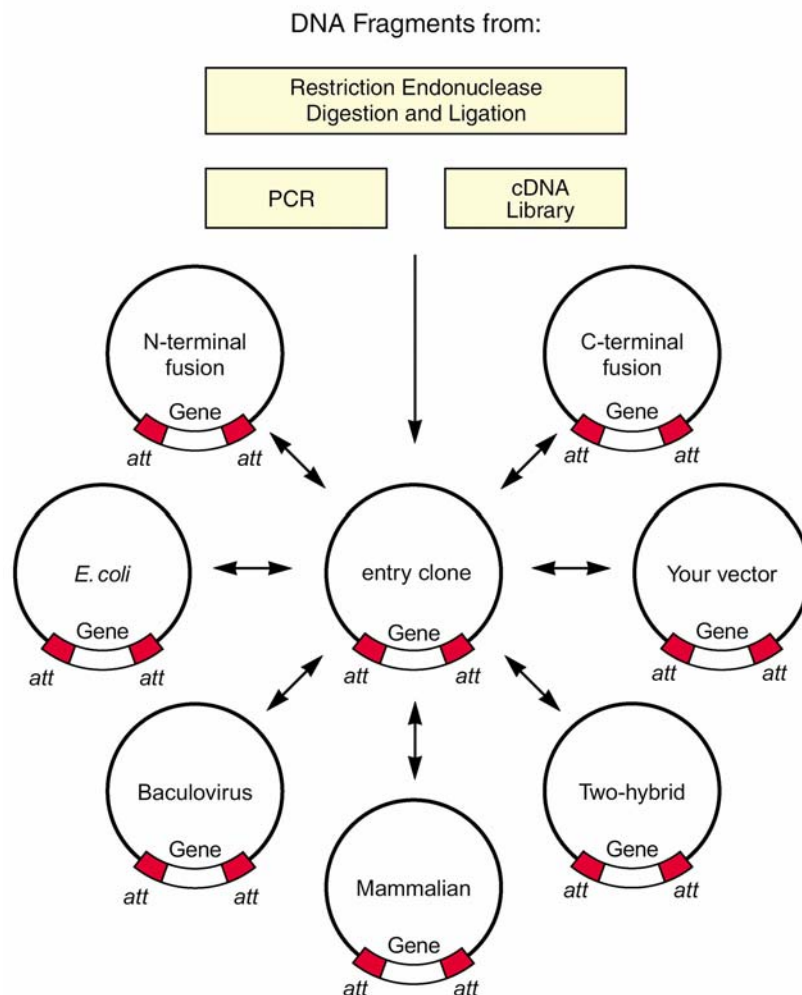


Abbildung 3.3 Schema des Funktionsprinzips des Gateway-Systems

Von einem „*entry clone*“ aus kann im Gateway-System ein Insert schnell in viele verschiedene Vektoren kloniert werden.

Bei der Herstellung der GFP-Fusionsvektoren wurde genau nach den Angaben des Herstellers Fa. Invitrogen verfahren.

3.2.5. Zellkultur

3.2.5.1. Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle Zellen und Zelllinien wurden im angegebenen Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Hatten die Zellen einen 80%igen konfluenten Zellrasen gebildet, wurden diese mit autoklaviertem 1x PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (Fa. Sigma) vom Petrischalenboden gelöst, indem man sie 10 min bei 37°C damit inkubierte. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und in einem sterilem 15 ml Falcon abzentrifugiert (3 min, 1050 g). Der Überstand wurde abgezogen und die Zellen in frischem Medium (1 ml/Zellkulturschale) resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wurde in eine frische Zellkulturschale (Ø 15 cm) überführt und mit 14 ml frischen Medium überschichtet.

3.2.5.2. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden jeweils 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermix resuspendiert und in Kryoröhrchen in einem Styroporbehälter langsam 4 h bei -20°C, 12 h bei -80°C und am nächsten Tag in Stickstoff eingefroren und gelagert (-192°C).

Auftauen von Zellen wurde immer in kürzester Zeit vollzogen, indem man die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C kurz aufgetaut hat. Die Zellsuspension wurde dann in ein steriles 15 ml Falcon überführt und zentrifugiert (3 min, 1.050 g, RT) um die Zellen von dem Einfriermedium zu trennen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen je nach Bedarf in 1 ml vorgewärmtes Medium pro Zellkulturschale resuspendiert und mit 14 ml Medium in eine neue Zellkulturschale ausplattiert und wie in Kapitel 3.2.5.1 beschrieben kultiviert.

Lösungen:

Kulturmedium Cath.a Zellen

RPMI-1640 Medium
10% Pferdeserum
5% Fötale Kälberserum (FKS)
1 mM Na-Pyruvat
0,15-0,2% NaHCO₃
10 mM HEPES (pH 7,5)
2 mM L-Glutamin
0,45% Glucose
100 mg/l Penicillin/Streptomycin

Einfriermix

70% Medium
20% FKS
10% DMSO

Kulturmedium HeLa-Zellen

90% MEM
10% (w/v) FKS
2 mM L-Glutamine
100 mg/l Penicillin/Streptomycin

Einfriermix

70% Medium
20% FKS
10% DMSO

Kulturmedium COS7-Zellen

DMEM (High Glucose)
10% FKS
1% Na-Pyruvat in MEM
100 mg/l Penicillin/Streptomycin

Einfriermix

80% Medium
10% FKS
10% DMSO

Kulturmedium hTERT-RPE1-Zellen

DMEM/F-12
10% FKS
2 mM L-Glutamine
100 mg/l Penicillin/Streptomycin

Einfriermix

70% Medium
20% FKS
10% DMSO

3.2.5.3. *Transfektion eukaryotischer Zellen mittels Calciumphosphat-Methode*

Transfektion ist die Einbringung fremder DNA in eine eukaryotische Zelle. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche verschiedene Methoden entwickelt, welche sich stark voneinander unterscheiden. Bei der Calciumphosphat-Methode mischt man DNA, Calcium und Phosphatpuffer miteinander. Dieser Mix wird bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich ein feines Präzipitat bildet, welches dann tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert wird. Die Zellen nehmen die Kristalle dann per Endocytose auf. Die Calciumphosphat-Methode ermöglicht eine einfache, preiswerte und effiziente Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryontische Zellen.

Dazu wurden ca. 35 µg DNA in 450 µl Wasser verdünnt und tropfenweise mit 50 µl CaCl₂ (2,5 M) versetzt. In einem weiteren Gefäß wurden 500 µl 2 x HBS vorgelegt und das DNA-CaCl₂-Gemisch (500 µl) tropfenweise zupipettiert (unter vortexen). Nach 30 min Inkubation bei RT wird das Präzipitat tropfenweise zu den Zellen gegeben. Die Transfektion und Expression erfolgt durch weitere Inkubation der Zellen bei 37°C und 5% CO₂ für 18 h. Danach wurden die Zellen 2x in PBS gewaschen und im Zellkulturmedium für weitere 24 h inkubiert, um die Expression zu ermöglichen.

Ansatz für ein Transfektionsansatz:

Eppendorf Gefäß 1	35 µg DNA
auffüllen auf	450 µl <i>dd</i> H ₂ O
	50 µl 2,5 M CaCl ₂
Eppendorf Gefäß 2	500 µl 2x HBS

Lösungen:

2 x HBS

280 mM NaCl

10 mM KCl

1,5 mM Na₂HPO₄

12 mM Glucose

50 mM HEPES (pH 7,05)

Phosphat gepufferte Saline (PBS)

3 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

pH 7,5

3.2.6. Lichtmikroskopie

3.2.6.1. Fixierung von Geweben und Zellen

Gewebe wurde wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben präpariert (z.B. Augäpfel von Mäusen), mit einer sterilen Nadel angestochen und 2 h in Paraformaldehyd bei RT (4% PFA in 0,15 M PBS, pH 7,2) fixiert, um das Gewebe zu stabilisieren. Anschließend wurden die Präparate mehrmals in PBS gewaschen und in eine aufsteigende Reihe wässriger Saccharose-Lösung überführt und inkubiert, um bei der anschließenden Kryoeinbettung die Bildung größerer Eiskristalle zu verhindern:

1x 30 min in 10%iger Sacharoselösung (bis Probe absinkt)

2x 30 min in 20%iger Sacharoselösung (bis Probe absinkt)

1x über Nacht in 30%iger Sacharoselösung

1x 1-4 h in 30%iger Sacharoselösung

Zellen wurden 10 min in eiskaltem Methanol mit 0,05% bei -20°C auf sterilen Deckgläschen fixiert. Anschließend bei RT getrocknet und wie in Kapitel 3.2.6.3 beschrieben weiter verfahren.

3.2.6.2. Einbettung und Schneiden der Präparate

Fixierte und unfixierte Gewebe wurden in Blöckchen aus gekochter Leber eingebettet, mit Tissue Tek™ (z.B. Fa. Miles Laboratories) überschichtet und ausgerichtet. Anschließend wurden die Leberblöckchen mit der Probe mit Tissue-Tek auf einer Korkscheibe befestigt, das Präparat mit Tissue-Tek nochmals überschichtet und über das Kryogen Isopentan (2-Methylbutan) schockgefroren. Die Präparate wurden anschließend gleich verarbeitet oder bei -80°C weggefroren.

Von den Präparaten wurden 8-10 µm dicke Schnitte bei -15 bis -25°C hergestellt und auf Deckgläschen aufgenommen, die zuvor mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet wurden. Dies erfolgte durch Benetzung der einzelnen Deckgläschen mit jeweils 800 µl 0,001%iger PLL-Lösung und anschließender Trocknung bei RT über Nacht.

3.2.6.3. Indirekte Immunfluoreszenzmarkierungen

Die frisch auf den Deckgläschen anhaftenden Schnitte wurden in feuchte Kammern der immunohistochemischen Behandlung unterzogen. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet, um die geringen Volumina auf den Schnitten zu halten. Die Proben wurden 10 min mit 40 µl TWEEN 20 (0,04% in PBS) gewaschen, um die Zellmembranen für Antikörper permeabel zu machen. Paraformaldehyd-fixierte Gewebeproben wurden nun mit 40 µl NH₄Cl (in PBS) inkubiert, um freie Aminogruppen abzusättigen. Nachfolgend wurden alle Proben 20 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Absättigung freier Epitope 35 min mit 40 µl Blockierungslösung. Der primäre Antikörper wurde antikörperspezifisch in Blockierungslösung verdünnt (Tab. 3.2) und vor Gebrauch kurz zentrifugiert (5 min, 14.000 g, 4°C), um mögliche Präzipitate zu entfernen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Am folgenden Tag wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen (je 40 µl PBS, 10 min) mit dem sekundären Antikörper (in Blockierungslösung) inkubiert, der an ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist (Tab. 3.3). Da die Farbstoffe lichtempfindlich sind, wurden die folgenden Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach 2 h Inkubation bei RT wurde der sekundäre Antikörper abgezogen und das Präparat wie oben beschrieben dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden kurz in *dd*H₂O eingetaucht und mit den Proben nach unten in 20 µl Mowiol (mit 1 µg/µl DAPI) eingebettet. DAPI lagert sich an die DNA an, so dass die Zellkerne im Fluoreszenzmikroskop blau angefärbt sind. Die Präparate wurden mit einem Leica Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

Lösungen:

PBS

137 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

in *dd*H₂O

pH 7,4

Blockierungslösung

0,01% (v/v) TWEEN 20

0,5 M NaCl

0,1% Ovalbumin

0,5% Fischgelatine

in PBS

PBS mit NH₄Cl

50 mM NH₄Cl

in PBS (pH 7,2)

3.2.7. Elektronenmikroskopie

3.2.7.1. Fixierung und Einbettung des Gewebes für Immunogoldmarkierung

Die Augen der Versuchstiere wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben präpariert und anschließend in 3% Paraformaldehyd, 0,1% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) für zwei Stunden bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,1 M Phosphatpuffer (pH 7,4) wurden die Präparate in einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2 x 100% EtOH) für jeweils 10 min bei RT entwässert. Anschließend wurden die fixierten Augäpfel mit einer Rasierklinge geviertelt und für jeweils 1 h mit einem 30%-, 50%- und 70%- LR-White/EtOH Gemisch infiltriert. Danach sind die Präparate in Gelatinekapseln (Fa. Plano) überführt und mit 100%igem LR-White (Härtegrad: „hard“; Fa. Mikrotechnik) überschichtet worden. Die Polymerisation der Proben erfolgte unter UV-Licht bei 4°C für 2 bis 3 Tage.

3.2.7.2. Anfertigung von Ultradünnschnitten

LR-White-Präparate wurden unter zu Hilfenahme eines Ultracut S Mikrotoms (Fa. Reichert) und eines Diamantmessers (Fa. Diatom) Ultradünnschnitte (60 nm) hergestellt. Ultradünnschnitte von LR-White-Präparaten wurden auf Formvar beschichtete Nickel-Netzchen („75 square mesh“; Fa. Plano) transferiert und bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.7.3. Immunogoldmarkierung

Die Immunogoldmarkierungen wurden nach dem Protokoll von Wolfrum (1998) durchgeführt. Die beschichteten Nickel-Netzchen wurden zunächst für 2 min auf jeweils 20 µl Tröpfchen einer gestättigten Natriumperjodat Lösung (Fa. Fluka) aufgelegt. Nachdem die Oberfläche der in LR-White eingebetteten Schnitte etwas angeätzt wurde, wurden diese zweimal mit d_dH_2O gewaschen. Anschließend wurden die „Nickel-Grids“ mit 20 µl 0,01% Tween 20 Lösung (in PBS, pH 7,2) 10 min lang inkubiert. Es folgte eine Absättigung der freien Aldehydgruppen durch 50 mM NH_4Cl in PBS (pH 7,2) für weitere 10 min bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit 0,1 M PBS Lösung entfernt, gefolgt von einer Inkubation mit Blockierungslösung (pH 7,2), für 30 min bei Raumtemperatur. Nach der Blockierungsreaktion folgte die Inkubation mit dem primären Antikörper in einer Feuchtkammer bei 4°C für 72 Stunden. Anschließend wurden

nichtgebundene Antikörper mit 0,1 M PBS Lösung (pH 7,2) aus einer Plastikspritzflasche (sog. „jet wash“) von den Schnitten entfernt und diese auf jeweils 20 µl Tropfen 0,1 M PBS (pH 7,2) für 5 min überführt. Daraufhin wurden die Nickel-Netzchen mit IgG-Goldpuffer (0,1% Ovalbumin, 0,5% Fischgelantine, 0,5% NaCl, 0,01% Tween 20 in 10 mM Phosphatpuffer, pH 7,3) bei Raumtemperatur für 15 min vorinkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit den jeweiligen sekundären goldgekoppelten Antikörpern (Fa. Nanoprobes) für 2 h bei Raumtemperatur. Die Präparate wurden erneut mehrmals mit 0,1 M PBS und zusätzlichem „jet wash“ von den überschüssigen sekundären Antikörpern gewaschen. Um die spezifischen Bindungen der Antikörperkomplexe an ihre jeweiligen Antigene zu verstärken, wurden die Ultradünnschnitte mit 1% Glutaraldehyd in 0,1 M PBS (pH 7,2) für 5 min bei Raumtemperatur fixiert. Die Fixierungslösung wurde durch mehrmaliges Waschen mit d_4 H₂O entfernt. Anschließend wurden die Präparate für mindestens 2 h bei RT getrocknet, bevor eine Silberverstärkung (Danscher, 1981) erfolgte.

Lösungen:

PBS 0,15 M CM-frei

137 mM NaCl

3 mM KCl

8 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

in d_4 H₂O

pH 7,4

Blockierungslösung

0,5% cold water fish gelatin

0,1% Ovalbumin in PBS

Immunogoldpuffer

0,5% cold water fish gelatin

0,1% Ovalbumin in PBS

0,01% Tween20

0,5 M NaCl in 10 mM PBS

pH 7,3

3.2.7.4. Silberverstärkung nach Danscher (1981)

Da die goldgekoppelten sekundären Antikörper (Goldpartikelgröße 1-10 nm) im Elektronenmikroskop nicht oder nur sehr schwer zu erkennen sind, wurde eine „Partikelvergrößerung“ mit Silberionen durchgeführt (Danscher, 1981). Durch eine chemische Reaktion katalysieren die Goldpartikel die Reduktion von Silberionen durch Hydrochinon, so dass die Goldkörnchen von metallischem Silber umgeben werden. Die Entwicklerlösung besteht aus folgenden Komponenten:

- 60% Gummi arabicum (als Schutzkolloid)
- 10% Citratpuffer (pH 3,6)
- 15% 75 mM Hydrochinon (als Reduktionsmittel)
- 15% 5,5 mM Silberlactat

Die viskose Lösung wurde unter Rotlicht intensiv gemischt. Nachfolgend wurden die Präparate auf jeweils einen 30 µl Tropfen Entwickler überführt und für 20-30 min bei Dunkelheit inkubiert. Abschließend wurden die Ultradünnschnitte mehrmals intensiv mit ddH_2O gewaschen.

3.2.7.5. Kontrastierung der Schnitte

Im Anschluß an die Immunogoldmarkierung und die Silberverstärkung wurden die Ultradünnschnitte für 8 min mit 2% Uranylacetat in 50% Ethanol in Dunkelheit kontrastiert. Die Präparate wurden danach intensiv mit ddH_2O gewaschen und getrocknet. Es folgte eine zweite Kontrastierung (Reynolds, 1963) für 4 min mit Bleinitrat (0,13 M Bleinitrat, 0,3 M Natriumcitrat in 30 ml frisch abgekochten ddH_2O). Erneut wurden die Schnitte intensiv mit ddH_2O gewaschen, über Nacht bei Raumtemperatur oder im Exikator getrocknet und anschließend im Elektronenmikroskop LEO EM 906E (Fa. Zeiss) analysiert.

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, einen Beitrag zur molekularen und zellbiologischen Charakterisierung von Centrinen in der Retina von Vertebraten zu leisten. Dabei wird ein Schwerpunkt auf die vier unterschiedlichen Centrin-Isoformen in Säugern gelegt. Kenntnisse zur Lokalisation bzw. Expression und von Interaktionspartnern von Centrinen sind essenziell, um die Funktion von Centrinen in der Retina oder auch in unspezialisierten Zellen zu verstehen.

Zur Verwirklichung dieser Analysen wurden umfassende biochemische, zellbiologische und molekularbiologische Methoden sowie hochauflösende fluoreszenz- und elektronenmikroskopische Verfahren eingesetzt. Auf den folgenden Seiten werden die Ergebnisse dieser Experimente dargestellt.

4.1. Analyse der Expression der Centrin-Isoformen in der Retina von *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* auf Transkriptionsebene

Der erste Schritt bei der Analyse der Funktion von Proteinen sind Untersuchungen zur Genaktivität bzw. Expression der Proteine in verschiedenen Geweben. Da keine Antikörper zur Verfügung standen, die zwischen den Centrin-Isoformen diskriminieren konnten, wurden die Expressionsmuster der Centrin-Isoformen auf mRNA-Ebene, mittels RT-PCR („*reverse transcription-polymerase chain reaction*“), untersucht. Da in der Literatur noch nie mit allen Centrin-Isoformen gleichzeitig gearbeitet wurde und auch gewisse Diskrepanzen in den verschiedenen Expressionsdaten bestehen (Middendorp *et al.*, 1997; Wolfrum und Salisbury, 1998; Hart *et al.*, 1999; Gavet *et al.*, 2003), wurden Expressionsanalysen aller vier Centrin-Isoformen in verschiedenen Geweben von Rodenten durchgeführt. Vorausgegangene Untersuchungen zur Expression der Centrin-Isoformen 1 und 4 weisen darauf hin, dass Centrin 1 und 4 nicht ubiquitär exprimiert werden (Wolfrum und Salisbury, 1998; Wolfrum *et al.*, 2002; Gavet *et al.*, 2003). Im Gegensatz

dazu, werden die Isoformen 2 und 3 ubiquitär als Bestandteile der Centrosomen exprimiert (Baron *et al.*, 1992; Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Paoletti *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997; Wolfrum und Salisbury, 1998; Hart *et al.*, 2001).

Für die RT-PCR-Experimente dieser Arbeit wurden Kombinationen von verschiedenen Isoform-spezifischen Primern generiert (Tab. 3.5), die über Exon-Intron-Grenzen hinweg binden (Abb. 1.6). Auf diese Weise konnte zum einen zwischen den Centrin-Isoformen diskriminiert werden, zum anderen schließen Exon-Intron-Grenzen überlappende Primer auch die Amplifikation von genomischer DNA aus. Da Centrin 1 keine Introns besitzt, musste in diesen Versuchen ein DNase Verdau vorgenommen werden, um sicher zu gehen, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde. Ein weiteres Ziel war, die kompletten kodierenden cDNA-Sequenzen von Centrin 2, 3 und 4 zu isolieren, um diese in späteren Experimenten in Bakterienvektoren zu klonieren.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gen-Expression aller vier Centrin-Isogene in verschiedenen Geweben, mit Fokus auf der Retina, von Maus und Ratte analysiert. Zum Nachweis der Centrin-Expression wurde mRNA aus verschiedenen frischen Gewebeproben von adulten Mäusen und Ratten isoliert und mittels Reverser Transkription zuerst in komplementäre DNA (cDNA) transkribiert und in Kombination mit anschließender PCR vervielfältigt und visualisiert. Dabei wurden Centrin-Primer (Tab. 3.5) verwendet, die, insofern nicht anders beschrieben, ca. 516 Basenpaare (bp) lange Konstrukte, entsprechend der jeweiligen Isoform, amplifizieren (Abb. 4.1). Die dargestellten RT-PCR-Experimente der Retinae von Rodenten wurden mit folgenden Primern durchgeführt: Centrin 1: *MmCen1 Δ EF34*; Centrin 2: *MmCen2 Δ Nterm* und *MmCen2 Δ EF12*; Centrin 3: *MmCen3Holo* und Centrin 4: *MmCen4 Δ Nterm* (Tab. 3.2). Sowohl in Ratten- als auch in Mausretinae konnte spezifische Banden von allen vier Centrin-Isoformen amplifiziert werden. Zusätzlich wurde bei der Maus mit den Centrin 4 Primern eine weitere kleinere Bande gefunden, die ca. bei 330 bp lag [Abb. 4.1(B), Pfeil]. Da keine Bande in den Kontrollen von DNase inkubierter totaler RNA zu erkennen sind, zeigt das Experiment, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde. Die Amplifikate aller vier Centrin-Isoformen zeigen deutlich, dass in der Retina adulter Ratten und Mäusen die mRNA-Transkripte aller vier Centrin-Isoformen vorliegen und somit alle vier Centrin-Isoformen dort exprimiert werden.

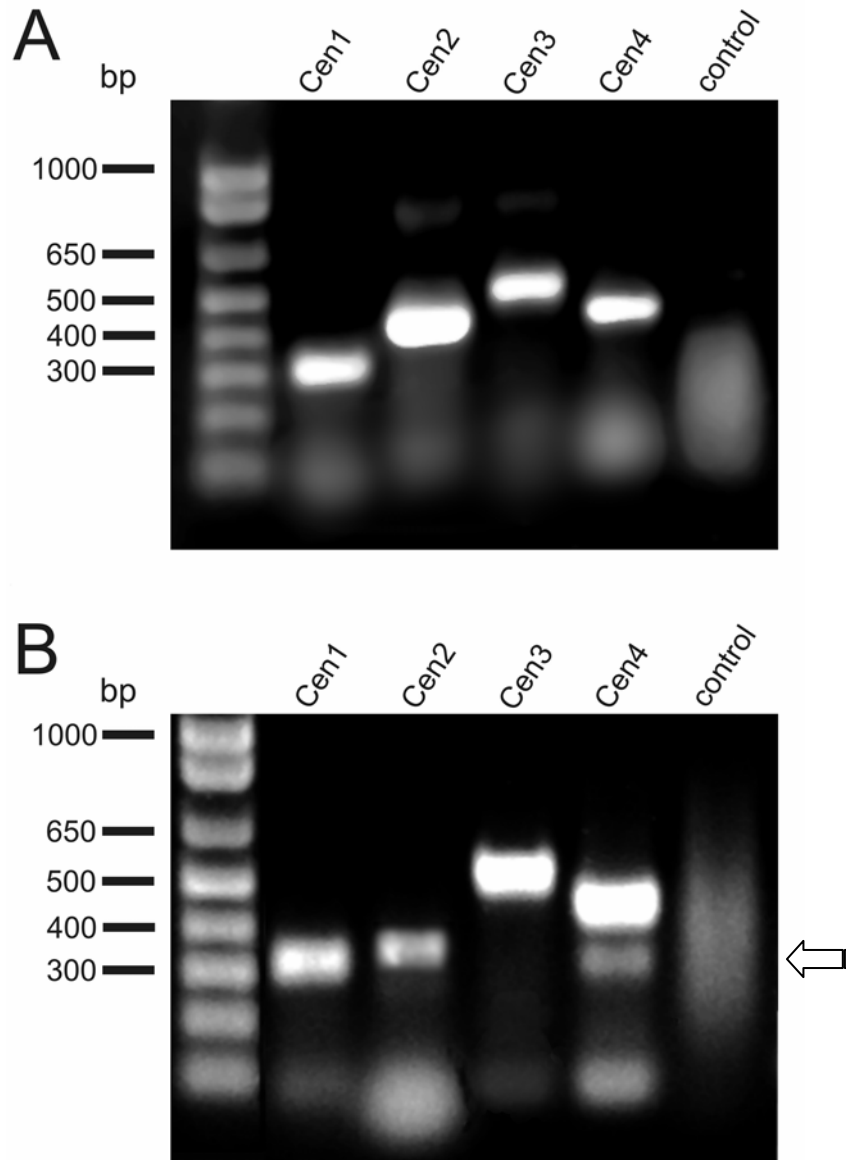


Abbildung 4.1 Expressionsanalysen von den Centrin-Isoformen 1 bis 4 in adulten Ratten- und Mausretinae mittels RT-PCR

RT-PCR-Analysen mit Maus spezifischen Primern (Tab. 3.2), die unterschiedliche Konstrukte der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in Ratte- (**A**) und Mausretina (**B**) amplifizieren. Die totale RNA für alle RT-Experimente wurde mit DNase I vorinkubiert, um genomische DNA zu degradieren. In der ersten Spur ist jeweils eine DNA-Leiter als Marker aufgetragen. Als Kontrolle (control) wurde DNase I vorinkubierte, nicht in cDNA umgeschriebene totale RNA verwendet. Diese wurde mit Centrin 1 Primern getestet, um zu zeigen, dass keine genomische DNA amplifiziert ist. Alle vier Centrin-Isoformen werden in Retina von Ratte und Maus exprimiert. Der weiße Pfeil in (B) markiert eine niedrigere Bande mit den *holo*-Primern von Centrin 4.
bp: Basenpaare.

Im Folgenden wurden die Analysen mittels RT-PCR-Experimente auf weitere Gewebe von adulten Rodenten ausgedehnt. Als weiteres Beispiel für die Expression aller vier Centrin-Isoformen wurden Gehirnproben der Ratte dargestellt. Hier wurden spezifische Primer

verwendet, welche den gesamten Protein-kodierenden RNA Bereich von Centrin 1 bis 4 nachweisen konnten (*holo*-Centrine). Alle vier Centrin-Isoformen wurden im Gehirn der Ratte mit den erwarteten Längen der Amplifikate nachgewiesen (Abb. 4.2). In der letzten Spur wurde ein Fragment von dem Protein β -Aktin als Positiv-Kontrolle visualisiert.

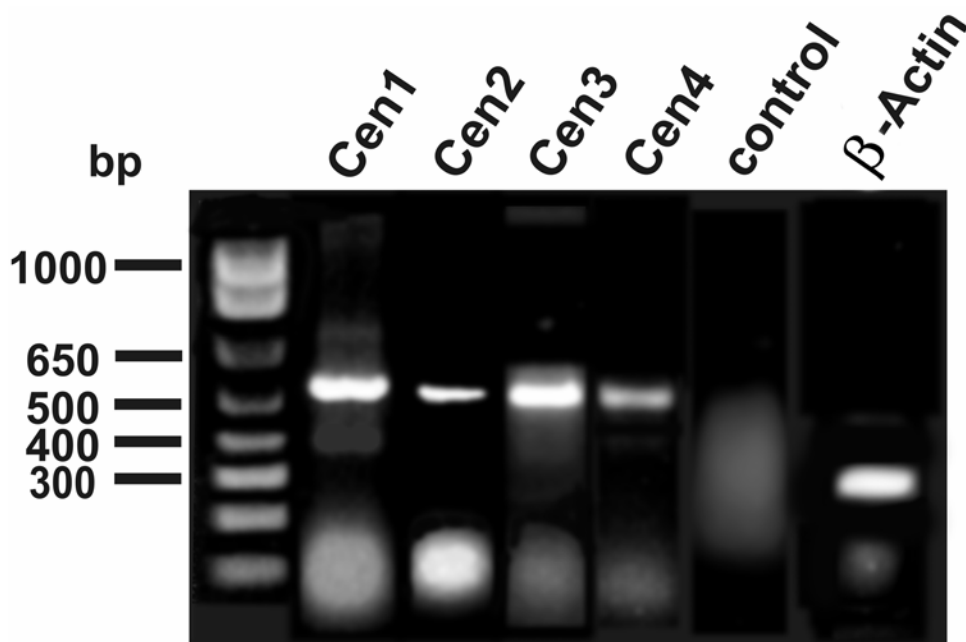


Abbildung 4.2 Expressionsanalysen von den Centrin-Isoformen 1 bis 4 aus Gehirngewebe von adulten Ratte mittels RT-PCR

RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern (Tab. 3.5), welche die kompletten kodierenden RNA Sequenzen (*holo*-Sequenz) der Centrin-Isoformen 1 bis 4 im Gehirngewebe der Ratte amplifizieren (Cen1 und 2: 516 Basenpaare (bp), Cen3: 501 bp, Cen4: 504 bp). Die Gesamt-RNA für alle RT-Experimente wurde mit DNase I vorinkubiert, um genomische DNA zu degradieren. Als Kontrolle (control) wurde DNase I vorinkubierte, nicht in cDNA umgeschriebene Gesamt-RNA verwendet. Diese wurde mit Centrin 1 Primern getestet, um zu zeigen, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Fragment der RNA von β -Aktin amplifiziert.

Alle weiteren RT-PCR-Analysen der vier Centrin-Isoformen in verschiedenen Geweben von adulten Ratten und Mäusen wurden in Tabelle 4.1 zusammengefasst und dargestellt. Dabei fällt auf, dass die Isoformen von Centrin 2 und 3 in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden konnte. Centrin 1 Amplifikate konnten aus Testis, Retina, Chochlea, Riechepithel und Gehirn von Rodenten amplifiziert werden. Im Wesentlichen stimmt das Expressionsmuster von Centrin 4 mit dem von Centrin 1 überein. Einzige Ausnahme stellt das Gewebe der Cochlea dar, in dem kein Centrin 4 amplifiziert werden konnte.

Tabelle 4.1 Zusammenfassung der durchgeführten Expressionsanalysen der vier Centrin-Isoformen mittels RT-PCR in Rodenten

Expressionsanalysen der Centrine mittels RT-PCR mit spezifischen Centrin-Isoform Primern von verschiedenen Gewebe der Ratte (Rn) und der Maus (Mm). + = DNA-Fragmente der jeweiligen Isoform konnten amplifiziert werden. - = DNA-Fragmente konnten nicht amplifiziert werden. na = die Expressionsanalyse wurde nicht ausgeführt. Als Positiv-Kontrolle wurden spezifische Primer für ein β -Aktin Fragment verwendet. Die dunkelgrauen Felder heben die Gewebe und Primer hervor, bei denen kein Amplifikat analysiert werden konnte.

	Testis	Retina	Gehirn	Cochlea	Riech-epithel	Leber	Skelett-muskel	Herz-muskel
Rn/Mm Centrin 1	+/+	+/+	+/na	+/na	+/na	-/-	-/-	-/na
Rn/Mm Centrin 2	+/+	+/+	+/+	+/na	+/na	+/+	+/+	+/+
Rn/Mm Centrin 3	+/+	+/+	+/+	+/+	+/na	+/+	+/+	+/na
Rn/Mm Centrin 4	+/+	+/+	+/+	-/na	+/na	-/na	-/-	-/-
Rn/Mm β-Aktin	+/+	+/+	+/+	+/+	+/na	+/+	+/+	+/+

Wie in Tabelle 4.1 zusammengefasst, deuten die erzielten Ergebnisse auf eine ubiquitäre Expression der Centrin-Isoformen 2 und 3 hin, während Centrin 1 und 4 dagegen nur in Geweben exprimiert werden, in denen ciliäre Zellen vorkommen.

Wie in den Seiten vorher beschrieben, konnten die Isoformen von Centrin 1 bis 4 durch RT-PCR mittels spezifischer Centrin-Isoform-Primer aus verschiedenen Geweben der Ratte und Maus amplifiziert werden. Da RT-PCR-Analysen auf den Nachweis von mRNA beruhen, kann mit dieser Methode nicht bewiesen werden, ob tatsächlich das Transkript des jeweiligen Proteins in Aminosäuren bzw. in das ganze Protein translatiert wird. Um weitere Erkenntnisse bezüglich der Expression auf Proteinebene zu erlangen, war es essenziell spezifische Antikörper herzustellen, die zwischen den einzelnen Centrin-Isoformen diskriminieren. Dabei wurde sich auf die Centrin-Isoformen 2 bis 4 beschränkt, da ein pAb gegen Maus-Centrin 1 (pMmC1) in einer vorausgegangenen Dissertation in dieser Arbeitsgruppe bereits generiert wurde (Schmitt, 2000).

4.1.1. Klonierung der Centrin-Isoformen 2 bis 4 aus Maus-Gewebe

Für Untersuchungen von Expressionsmustern der Centrin-Isoformen auf proteinbiochemischem Niveau, war die Herstellung von spezifischen Antikörpern gegen diese Proteine unabdingbar. Dazu war es nötig, diese Proteine für eine Immunisierung bakteriell zu exprimieren. Im ersten Schritt wurden mittels RT-PCR aus Geweben der Maus die kompletten Centrin-Isoformen amplifiziert und in bakteriellen Bluescript-Vektoren (Fa. Amersham) kloniert. Die dabei isolierten Klone wurden anschließend zur Kontrolle der klonierten cDNA sequenziert und die erhaltenen DNA-Sequenzen mit Hilfe des Computerprogramms *Omiga 2.0* analysiert. Der Vergleich der Aminosäuresequenzen der isolierten Klone mit den bereits bekannten Sequenzen aus der NCBI-Datenbank ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Es zeigt sich, dass die Aminosäuresequenzen der Centrine aus der Gendatenbank von NCBI und die Aminosäuren-Sequenzen der Klone identisch sind. Lediglich durch Primer eingefügte Aminosäuren zeigen in den Klonen einen Unterschied zu den publizierten Sequenzen. Dabei handelt es sich am N-Terminus um die Aminosäuren Glycin (G) und Serin (S) und am C-Terminus um Leucin (L) und Glutamat (E). Die Basentriplets dieser Aminosäuren dienen den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI als Schnittstellen im Plasmid.

Die drei Klone enthalten somit die Inserts, welche für die Aminosäuresequenz von Maus-Centrin 2 (MmCen2), Maus-Centrin 3 (MmCen3) und Maus-Centrin 4 (MmCen4) codieren. Diese Klone wurden für weiterführende Experimente wie bakterielle rekombinante Expression, Antikörperherstellung oder Transfektionen in eukaryotische Zellen im Rahmen dieser Arbeit verwendet. Um ein Protein aus der Ca^{2+} -bindenden Familie als Kontrollprotein für Untersuchungen bereit zu stellen, wurde zusätzlich ein Klon von Maus-Calmodulin (MmCaM) für Kontrollexperimente hergestellt (Alignment: Abb. 8.1). Maus-Centrin 1 (MmCen1) wurde im Rahmen einer Dissertation dieser Arbeitsgruppe bereits in Expressionsvektoren kloniert und mit den Schnittstellen BamHI und EcoRI versehen (Schmitt, 2000). Der ursprüngliche Klon von MmCen1 wurde unserem Labor von J. L. Salisbury, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota (USA) zu Verfügung gestellt.

4. Ergebnisse

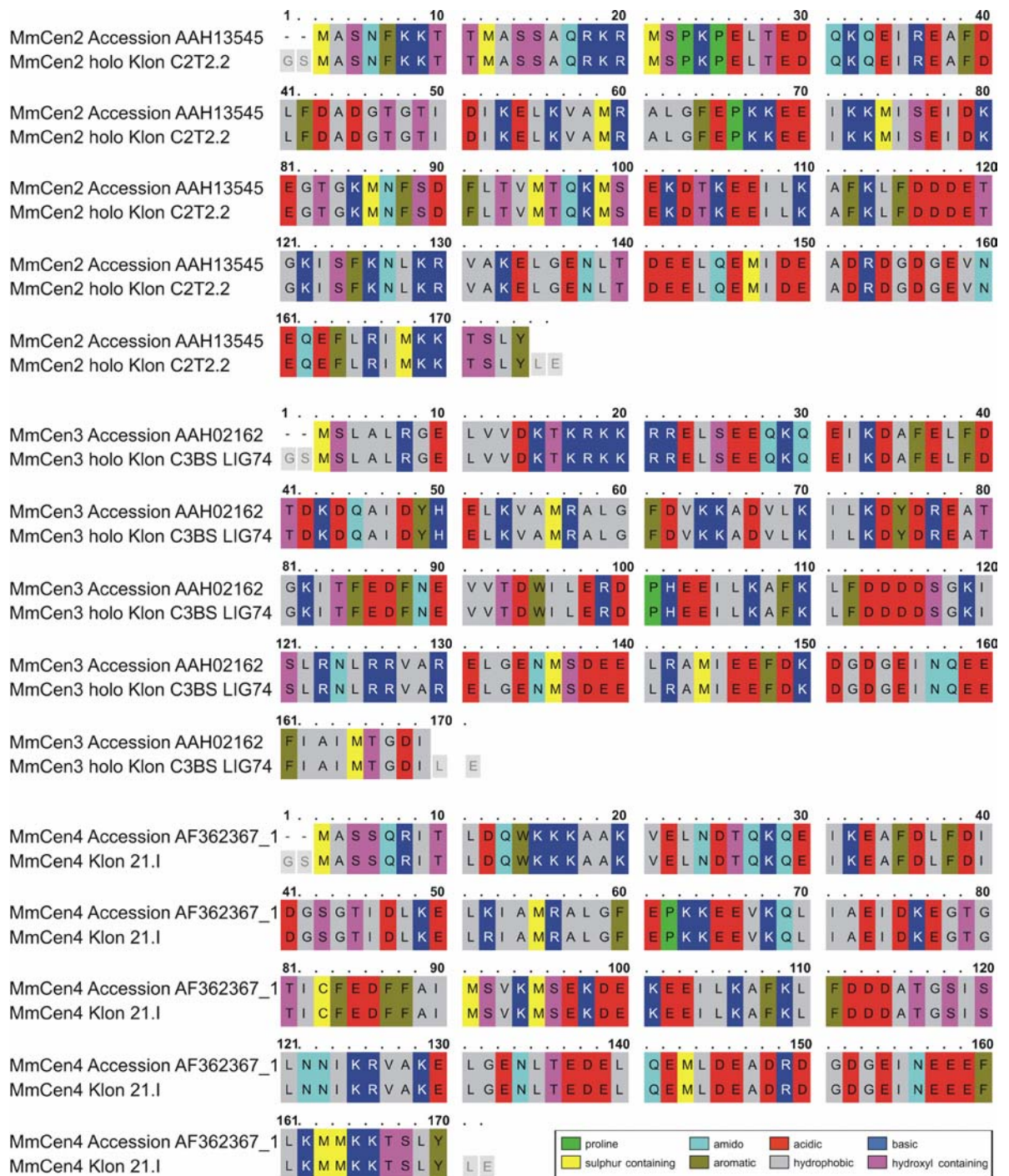


Abbildung 4.3 Aminosäuresequenz-Alignment der Maus-Centrin Klone 2 bis 4

Omiga-Alignment der Centrin-Klone MmCen2 C2T2.2 mit Centrin 2-Klon mit der „Accession Number“ (AN) AAH13545 (NCBI-Datenbank), MmCen3 C3BS LIG74 mit Centrin 3 Klon (AN) AAH02162 und MmCen4 21.I mit Centrin 4 Klon (AN) AF362367_1. Die Alignments zeigen keine Unterschiede zwischen den Aminosäuresequenzen der NCBI-Datenbank und den klonierten Centrin-Isoformen. Durch die verwendeten Primer wurden während der PCR Restriktionsschnittstellen eingefügt (grau hinterlegt). N-terminal sind dies die AS (Aminosäuren) G und S, C-terminal die AS L und E. Die entsprechenden Basentriplets der AS dienen den Restriktionsenzymen BamHI und XhoI als Schnittstellen.

4.1.2. Rekombinante Expression der Centrin-Isoformen

Für weiterführende Protein-Expressions-, Lokalisations- und Interaktionsanalysen war es notwendig, die einzelnen Isoformen in sog. Expressionsvektoren zu klonieren. Es wurde für die bakterielle Expression der Expressionsvektor pGex4T3 verwendet, mit dem ein Glutathion S-Transferase-Fusionsprotein (GST) synthetisiert wird, von dem das gewünschte rekombinante Protein nach der Aufreinigung wieder abgespalten werden kann. Weiterhin hat dieses Expressionssystem den Vorteil, dass mit dem Fusionsprotein auch Interaktionsstudien mit anderen Proteinen oder Extrakten von Geweben durchgeführt werden können, indem das Fusionsprotein an „Beads“ gekoppelt werden kann.

Während der vorliegenden Arbeit wurden für die Maus-Centrin-Isoformen 2 bis 4 jeweils Klone hergestellt, exprimiert und die Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel analysiert (Abb. 4.4).

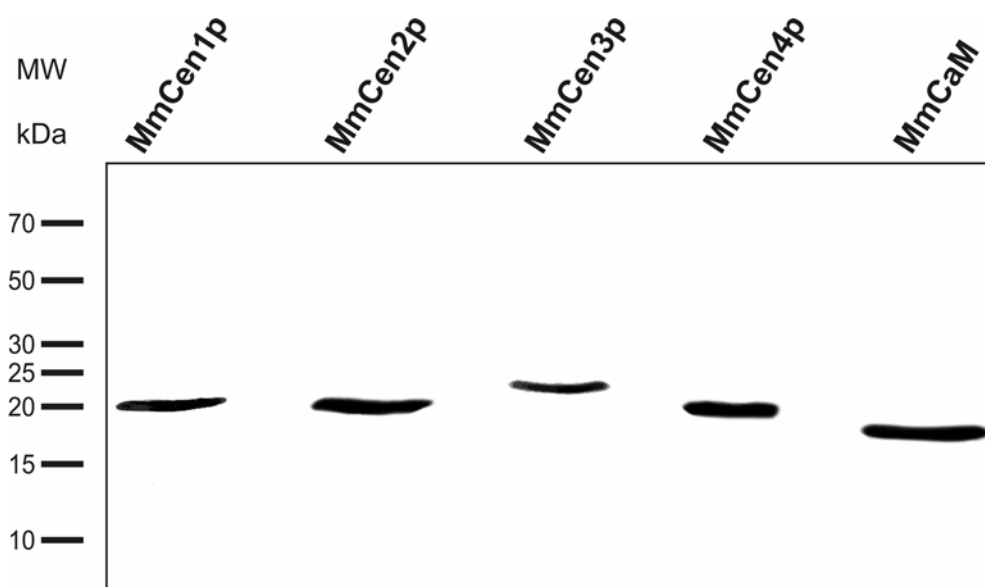


Abbildung 4.4 SDS-Polyacrylamid Gel Analyse mit rekombinant exprimierten Maus-Centrinen 1 bis 4 und Maus-Calmodulin

Coomassie-blue gefärbtes 15%iges SDS-Gel mit aufgereinigten Expressionsprodukten (Proteine ohne GST-Tag) der Klone Maus-Centrin 1 bis 4 und Calmodulin. Es wurden jeweils 4 µg Protein/Spur aufgetragen. Die Centrine migrieren zwischen 21 und 19 kDa (Kilodalton). Die Banden von MmCen1p (Maus-Centrin 1 Protein) und MmCen2p (Maus-Centrin 2 Protein) liegen bei ca. 20 kDa. Die Bande von MmCen3p (Maus-Centrin 3 Protein) liegt bei ca. 21 kDa, während die Bande von MmCen4p (Maus-Centrin 4 Protein) bei ca. 19 kDa liegt. Als Kontrolle wurde in der ersten Spur rekombinantes MmCen1p und in der letzten Spur das rekombinante Maus-Protein Calmodulin (MmCaM) aufgetragen. Das Molekulargewicht (MW) von MmCaM beträgt in diesem Gel ca. 17 kDa.

MW: Molekulargewicht in Kilodalton (kDa).

Das SDS-Gel wurde mit Coomassie-blue gefärbt, um die Proteinen zu visualisieren. In den ersten beiden Spuren wurden Maus-Centrin 1 und 2 (MmCen1p und MmCen2p) aufgetragen. Die visualisierten Banden (Abb. 4.4) befinden sich auf der gleichen Höhe bei einem Molekulargewicht (MW) von ca. 20 Kilodalton (kDa). Damit entsprechend die beiden Banden dem MW, das von dem Computerprogramm *Omega 2.0* [MmCen1p 19.7 kDa und MmCen2p 19.8 kDa; (Abb. 4.13)] berechnet wurde. In der nächsten Spur wurde Maus-Centrin 3 Protein (MmCen3p) aufgetragen. Mit einer Bande bei ca. 22 kDa entspricht diese nicht dem zuvor errechneten MW von 19.5 kDa. Allerdings wurde dieses Phänomen schon in anderen Arbeiten gezeigt und ist wohl auf die Struktur des Proteins zurückzuführen (Middendorp *et al.*, 1997). In der Spur MmCen4p wurde Maus-Centrin 4 Protein aufgetragen und zeigt eine Bande bei ca. 19 kDa. Diese stimmt wiederum mit dem errechneten MW von 19.2 kDa überein. In der letzten Spur wurde rekombinantes Maus-Calmodulin (MmCaM) aufgetragen. Die Bande zeigt eine charakteristische Höhe von ca. 17 kDa.

Um die eventuellen unterschiedlichen Expressionsmuster in verschiedenen Geweben untersuchen zu können, wurde zunächst überprüft, ob bereits hergestellte Antikörper zwischen den Centrin-Isoformen diskriminieren. Dazu wurden die 4 rekombinant exprimierten Centrin-Isoformen in einem Western Blot analysiert und mit einem Antikörper, der gegen das Centrin der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* [pan-Centrin (clone 20H5)] gerichtet ist, untersucht (Abb. 4.5).

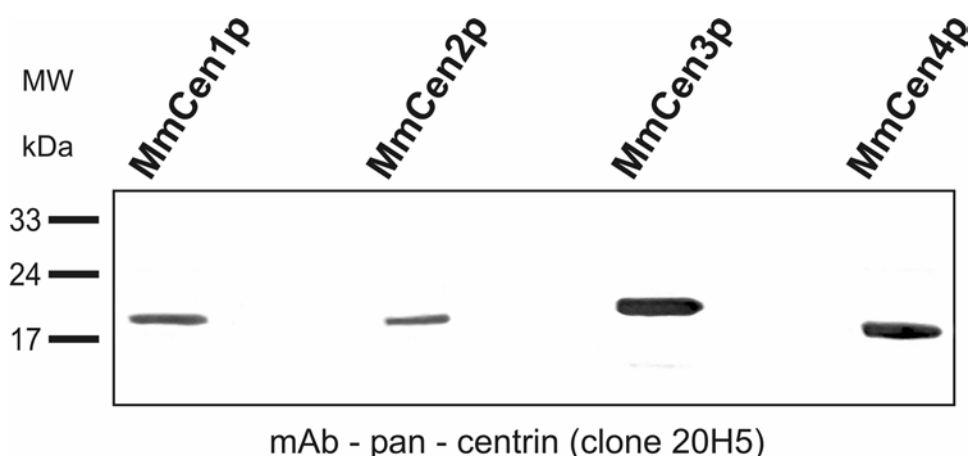


Abbildung 4.5 Western Blot Analyse der vier verschiedenen rekombinanten Maus-Centrin-Isoformen mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5)

Jeweils 0,5 µg Protein wurden pro Spur in einem 15%igen SDS-Gel aufgetragen und die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Mit dem monoklonalen Antikörper (mAb) pan-Centrin (clone 20H5) wurden dann die Maus-Centrine 1 bis 4 (MmCen1p bis MmCen4p) mit einem MW von ca. 19 bis 22 kDa nachgewiesen. Der mAb pan-Centrin (clone 20H5) detektiert dabei alle rekombinante Maus-Centrin-Isoformen 1 bis 4.

In Abbildung 4.5 ist eine Analyse der Proteine MmCen1p, MmCen2p, MmCen3p und MmCen4p dargestellt. Dabei detektiert der monoklonale Antikörper (mAb) pan-Centrin (clone 20H5) in jeder Spur eine prominente Bande zwischen 19 und 22 kDa. Der Antikörper, der gegen das Grünalgen-Centrin generiert wurde, ist also nicht spezifisch für eine bestimmte Isoform, sondern kreuzreagiert mit allen vier bekannten Isoformen der Vertebraten mit ähnlicher Affinität. Der Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) ist somit nicht für die Diskriminierung zwischen den Säuger-Centrinen geeignet.

4.1.3. Herstellung und Aufreinigung von Antikörpern gegen MmCen2p, MmCen3p und MmCen4p

Um auf die Expression der Centrin-Isoformen in Geweben Rückschlüsse ziehen zu können, war es essenziell, spezifische Antikörper für alle Isoformen zu generieren. Die Kenntnis der Expressionsmuster von Proteinen in Geweben ist sehr wichtig, um auf ihre Funktion Rückschlüsse ziehen zu können. Da kein getesteter Centrin-Antikörper die Säuger-Centrine unterscheiden konnte und andere Labore keine spezifischen Antikörper zu Verfügung stellten, wurden polyklonale Antikörper gegen die verschiedenen Maus-Centrin-Isoformen generiert.

Mit den erhaltenen Centrin-Klonen von Maus-Centrin 2, 3 und 4 wurde rekombinantes Protein exprimiert, gereinigt und mit diesem polyklonale Antikörperseren hergestellt. Mit dem Maus-Protein MmCen3p und MmCen4p wurde jeweils ein Kaninchen immunisiert, mit MmCen2p eine Ziege. Die Seren wurden in bestimmten Zeitabständen auf die Immunreaktivität getestet. Nachdem die Antiseren mit Western Blot Analysen mit den rekombinanten Centrinen reagierten, wurden die polyklonalen Antiseren über Affinitätschromatographie am Antigen aufgereinigt. Nach den Affinitätsaufreinigungen wurden Western Blot Analysen zur Reaktivität der verschiedenen Antikörper durchgeführt. Der pAb aus Kaninchen gegen MmCen1p wurde pMmC1, der pAb aus Ziege gegen MmCen2p pMmC2, der pAb aus Kaninchen gegen MmCen3p pMmC3 und der pAb aus Kaninchen gegen MmCen4p pMmC4 genannt.

4.1.4. Analyse der Spezifität der Antikörper gegen die Centrin-Isoformen

Nach der Affinitätsaufreinigung der vier polyklonalen Centrin-Antiseren wurden Spezifitätsanalysen mit den vier rekombinanten Isoformen von Centrin (MmCen1p bis MmCen4p) zu Evaluierung der Kreuzreaktivität der Antikörper durchgeführt (Abb. 4.6).

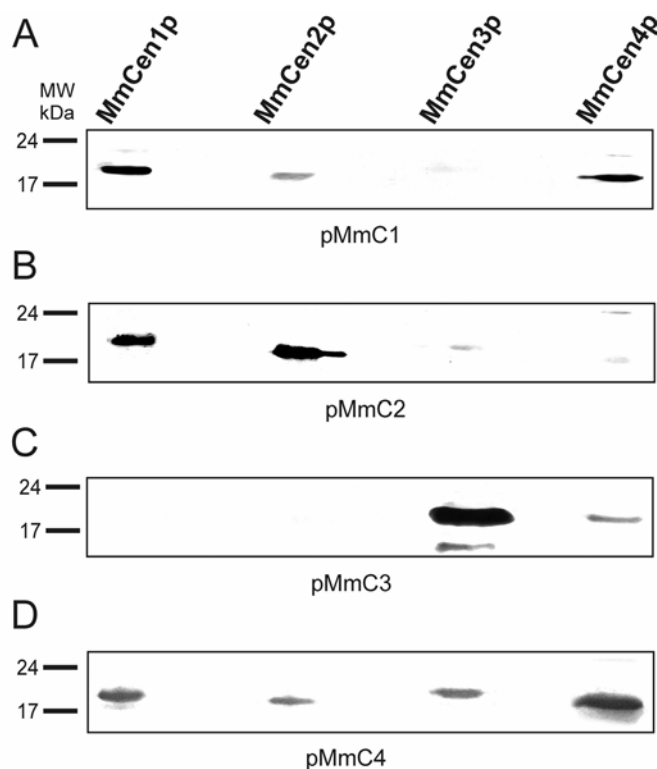


Abbildung 4.6 Analyse zur Kreuzreaktivität der Centrin-Isoform-Antikörper pMmC1 bis pMmC4 gegen die rekombinanten Centrin-Isoformen

Western Blot Analyse aller Centrin-Isoformen (0,5 µg Protein/Spur) mit den affinitätsaufgereinigten polyklonalen Antikörpern gegen die Centrin-Isoformen. Alle Antikörper gegen die Maus-Centrin-Isoformen 1-4 (pMmC1 bis pMmC4) zeigen Kreuzreaktionen mit anderen rekombinant exprimierten Centrin-Isoformen (MmCen1p bis MmCen4p). (A) pMmC1 zeigt Kreuzreaktionen mit MmCen2p und MmCen4p. (B) pMmC2 reagiert mit allen Isoformen. (C) pMmC3 zeigt nur mit MmCen4p eine Kreuzreaktivität. (D) Der pAk gegen Centrin 4 (pMmC4) reagiert mit allen vier Centrin-Isoformen.

Die vier rekombinanten Centrin-Isoformen (MmCen1p bis MmCen4p) wurden mit den verschiedenen affinitätsaufgereinigten Centrin-Antikörpern gegen die Centrin-Isoformen (pMmC1 bis pMmC4) inkubiert. Alle Centrin-Antikörper detektierten im Western Blot nicht nur ihr Antigen, sondern kreuzreagierten mit einem (pMmC3) oder mehreren rekombinanten Centrin-Isoformen (Abb. 4.6). Der polyklonale affinitätsgereinigte Ab pMmC1 reagierte in den Western Blot Analysen mit seinem Antigen (MmCen1p) und den rekombinanten Proteinen MmCen2p und MmCen4p. Der Antikörper pMmC2 detektierte

alle Isoformen. pMmC3 zeigte eine Reaktion mit seinem Antigen und eine Kreuzreaktion mit MmCen4p. pMmC4 reagierte mit allen vier Centrin-Isoformen. Alle Antikörper kreuzreagierten mit den Proteinen anderer Isoformen. Dabei kann nur mit dem pMmC3 eindeutig MmCen3p und 4p von MmCen1p und 2p unterschieden werden. Dieses Ergebnis war zu erwarten, da alle bekannten Centrin-Isoformen sehr nah miteinander verwandt sind (Abb. 1.3 und 1.5) (Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004b). Kreuzreaktionen anderer Centrin-Antikörper mit Proteinen der Centrin Familie wurden schon beschrieben (Wolfrum und Salisbury, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2002) Selbst Peptid-Antikörper konnten nicht zwischen den Isoformen diskriminieren (Wolfrum, 1998).

Um die Kreuzreaktivität der Antikörper zu minimieren oder sogar ganz auszuschließen, wurden die Antikörper mit rekombinanten Proteinen gegen die jeweiligen anderen Antikörper prä-adsorbiert (Abb. 4.7)

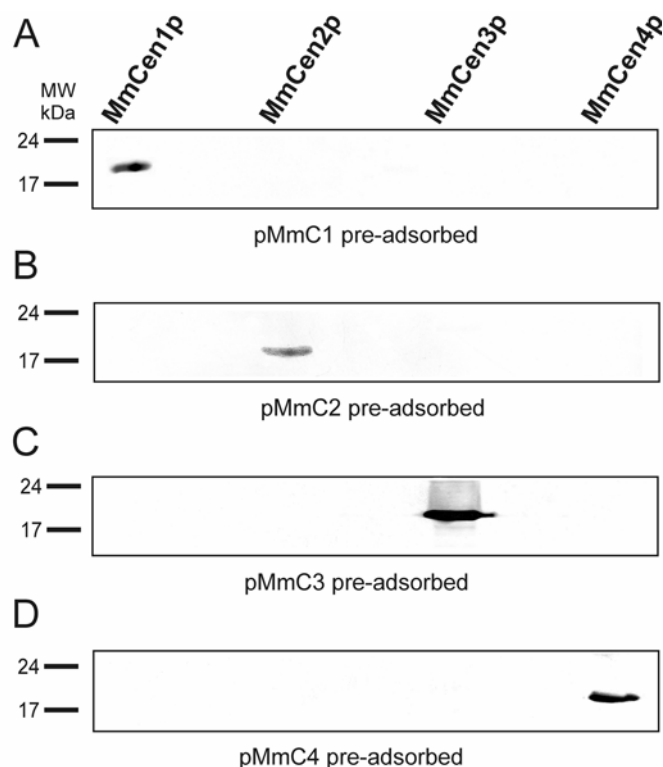


Abbildung 4.7 Nachweis der Spezifität der prä-adsorbierten Isoform-Antikörper

Western Blot Analyse aller Centrin-Isoformen (0,5 µg Protein/Spur) mit den prä-adsorbierten affinitätsaufgereinigten polyklonalen Antikörpern gegen die Centrin-Isoformen. Alle prä-adsorbierten Antikörper reagieren spezifisch nur mit ihrem Antigen. **(A)** So reagiert pMmCen1 nur mit MmCen1p, **(B)** pMmC2 mit MmCen2p, **(C)** pMmC3 mit MmCen3p und **(D)** pMmC4 mit MmCen4p.

Nach mehreren Versuchen mit verschiedenen alternativen Methoden und Experimentansätzen, wurde die Prä-Adsorption als die beste Methode ermittelt. Hierbei

wurden die nicht Antigen-Centrin-Isoform-Proteine auf Blot Membranen immobilisiert und mit den verdünnten Antikörpern in Blockierungslösung inkubiert, um die unspezifischen Ab zu binden. Nachdem alle unspezifischen Antikörper mit den immobilisierten Centrinen entfernt wurden, konnte mit den prä-adsorbierten Antikörpern zwischen den vier Centrin-Isoformen diskriminiert werden (Abb. 4.6 und Abb. 4.7). So beseitigte z.B. die Prä-Adsorption des Antikörpers pMmC1 (Antigen MmCen1p) mit den rekombinanten Proteinen MmCen2p, MmCen3p und MmCen4p die Kreuzreaktivität mit den anderen rekombinanten Isoformen. Alle prä-adsorbierten Antikörper reagierten so spezifisch nur gegen ihr Antigen, so dass pMmC1 nur MmCen1p, pMmC2 nur MmCen2p, pMmC3 nur MmCen3p und pMmC4 nur MmCen4p in Western Blot Analysen detektierten (Abb. 4.7). Die so behandelten, nun spezifischen Antikörper, konnten im Anschluss für weitere Analysen verwendet werden, um die Unterscheidung zwischen den Centrin-Isoformen in Geweben zu gewährleisten. Ein weiterer spezifischer Antikörper (HsCetn2.4) wurde im Laufe dieser Arbeit von J. L. Salisbury, Mayo Clinic, Rochester, Minnesota (USA) zu Verfügung gestellt. Dieser Antikörper HsCetn2.4 ist gegen das humane Centrin 2 (HsCen2p) gerichtet und zeigte sich in unseren Tests auch als spezifisch für MmCen2p (Abb. 8.3).

4.1.5. Expressionsanalyse der Centrin-Isoformen in der Retina

Mit Hilfe der spezifischen Antikörper gegen die vier Centrin-Isoformen konnte die Proteinexpression in der Retina untersucht werden. Dabei zeigten Western Blot Analysen mit Proteinextrakten von Rindern- und Mausretinae mit den prä-adsorbierten Centrin-Antikörpern, dass alle vier Centrin-Isoformen (Cen1p bis Cen4p) in der Retina von Rind (Abb. 4.8) und Maus (Daten nicht gezeigt) exprimiert werden. In diesen Versuchen wurden SDS-Gelelektrophoresen durchgeführt, bei den in allen Spuren der gleiche Rinderretinaextrakt („*bovine retina extract*“) aufgetragen wurde. Die aufgetrennten Proteine wurden auf PVDF-Membranen transferiert und mit den spezifischen prä-adsorbierten Antikörpern gegen Centrin 1 bis 4 inkubiert und visualisiert.

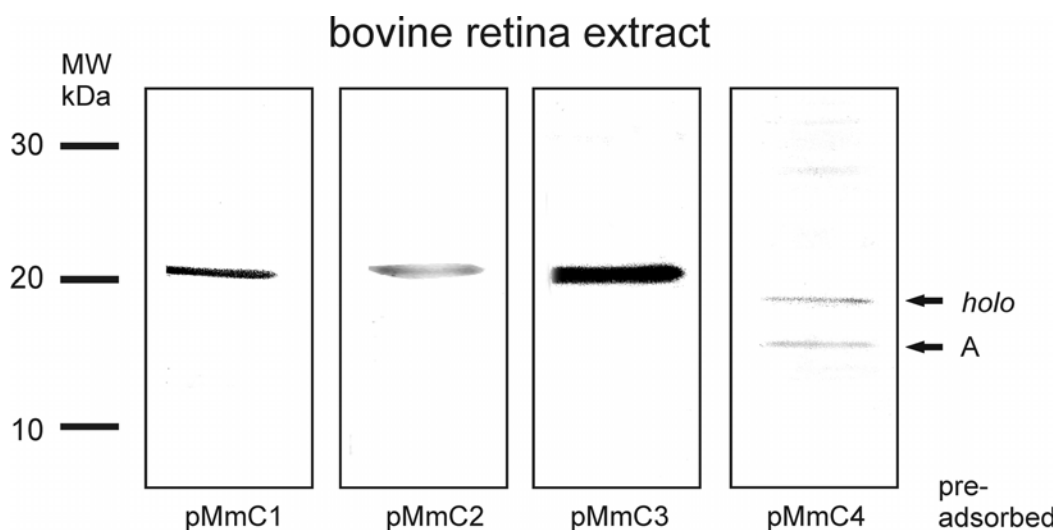


Abbildung 4.8 Western Blot Analysen mit spezifischen prä-adsorbierten affinitätsgereinigten pAb gegen die vier Centrin-Isoformen

Western Blot Analysen von Rinderretinaextrakten („*bovine retina extract*“) mit den prä-adsorbierten spezifischen Antikörpern gegen Centrin 1 bis 4. Die Antikörper pMmC1 bis pMmC3 detektieren eine spezifische Bande bei ca. 20 kDa (pMmC1 bis pMmC3). Bei den prä-adsorbierten Ab pMmC4 werden zwei Banden visualisiert, welche bei ca. 15 kDa (A) und 19 kDa (*holo*) liegen. Diese beiden Banden (Pfeile) werden als die Centrin-Isoform 4 (*holo*) und als eine kleinere Splice-Variante (A) Mmsplice4A (Gavet *et al.*, 2003) bezeichnet.

Alle vier prä-adsorbierten Antikörper gegen die Centrin-Isoformen detektierten spezifische Banden im Rinderretinaextrakt. pMmC1, pMmC2 und pMmC3 reagierten mit jeweils einer Bande, die dem angegebenen MW der jeweiligen Centrin-Isoform entsprach (Abb. 4.8). Der Ab gegen Centrin 4 (pMmC4) hingegen detektierte zwei Banden mit unterschiedlichem MW. Die Obere lag bei ca. 19 kDa (*holo*) und die Untere bei ca. 15 kDa (A). Die obere Bande (*holo*) wurde als die Isoform Centrin 4 und die untere (A) als die erste kleinere Splice-Variante Mmsplice4A (Gavet *et al.*, 2003) identifiziert.

Mit Hilfe der Prä-Adsorption der affinitätsaufgereinigten Ab gegen die vier Centrin-Isoformen konnte erstmals in einem Gewebe zwischen den vier Proteinen-Isoformen differenziert werden. Zusätzlich konnte die Koexpression von allen Centrin-Isoformen in der Säugetierretina gezeigt werden. Weiterhin wurde zum ersten Mal auf Proteinniveau zwischen zwei Centrin 4 Varianten in einem Gewebe unterschieden.

4.2. Lokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in Photorezeptorzellen

Die räumliche Anordnung der Zellschichten und Kompartimente in der Retina macht es relativ einfach, die subzelluläre Verteilung von Proteinen mittels Lichtmikroskopie und entsprechender Antikörper festzustellen. Aus der Verteilung der Proteine in der Retina können erste Hinweise auf eventuelle Funktionen oder auch Interaktionspartner gefunden werden.

Um die Lokalisation von Centrinen in der Retina zu bestimmen, wurden Kryostatschnitte durch die Augen und Retinae von Mäusen und Ratten angefertigt und anschließend mit den zu Verfügung stehenden Antikörpern mittels Immunofluoreszenzmikroskopie analysiert. Immunocytochemische Untersuchungen mit dem Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) und MC1 (polyklonaler Ab gegen das Grünalgen Centrin von *Chlamydomonas*) an den Retinae aller bislang untersuchten Vertebratenspezies zeigten einheitlich, dass Centrine in zwei prinzipiell unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten konzentriert sind. Zum einen sind Centrine an den Centriolen von Centrosomen und an Basalkörpern zu finden. Zum anderen konzentrieren sie sich im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen (Abb. 4.9) (Wolfrum und Salisbury, 1995; 1998; Wolfrum, 1998; Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004b).

Die affinitätsaufgereinigten Antikörper pMmC1 bis pMmC4 zeigten die gleichen Markierungen in der Retina wie der Antikörper gegen das Algen-Centrin pan-Centrin (clone 20H5) (Abb. 4.9), der nicht zwischen den verschiedenen Centrin-Isoformen diskriminieren konnte (Abb. 4.5). Sie visualisierten das Verbindungscilium, den Basalkörper und die Centrosomen in der Retina (Daten nicht gezeigt). Mit diesen Daten spiegelte sich die Aussage der Western Blots wider, wo die nur affinitätsaufgereinigten Ab pMmC1 bis pMmC4 auch Kreuzreaktionen mit den anderen Centrin-Isoformen zeigten (Abb. 4.6). Um Aussagen treffen zu können, in welchen subzellulären Kompartimenten der Photorezeptorzelle die verschiedenen Centrin-Isoformen lokalisiert sind, wurden die prä-adsorbierten affinitätsaufgereinigten spezifischen Antikörper gegen die verschiedenen Centrin-Isoformen (pMmC1 bis pMmC4), die schon auf Western Blots validiert wurden, auf longitudinalen Kryostatschnitten von Mäuse- und Rattenretinae verwendet.

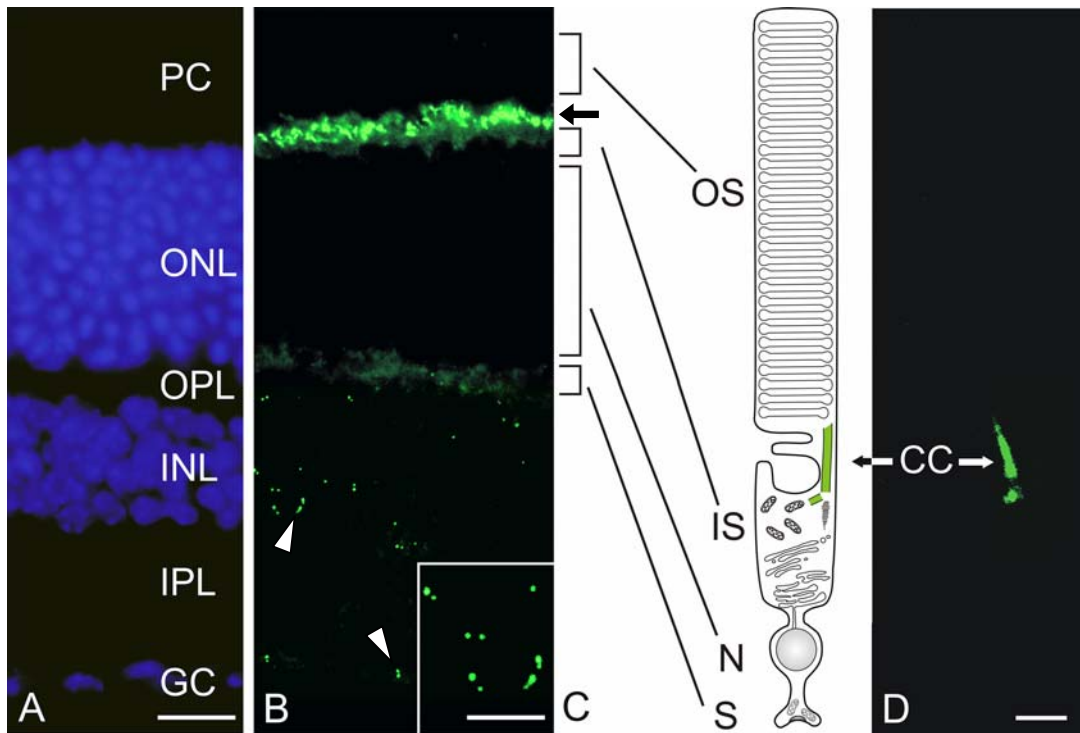


Abbildung 4.9 Lokalisation von Centrinen in einer Rattenretina durch indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit dem Ab pan-Centrin (clone 20H5)

(A) DAPI-Färbung der DNA in einem longitudinalen Kryoschnitt durch die Retina der Ratte. Die DNA der Zellkerne wurde in den Bereichen der äußeren Körnerschicht (ONL), inneren Körnerschicht (INL) und in der Ganglienzellschicht (GC) blau angefärbt. Außerdem sind noch die Bereiche der Innen- und Außensegmente (PC), der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der inneren plexiformen Schicht unterschieden und beschriftet. (B) Indirekte Anti-Centrin [pan-Centrin (clone 20H5)] Immunofluoreszenz in einem Kryoschnitt durch die Rattenretina. Der Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) markiert eine Stelle zwischen dem Innensegment und dem Außensegment der Photorezeptorzelle, wo das Verbindungscilium lokalisiert ist (Pfeil). Außerdem werden noch paarweise punktförmige centrosomale Strukturen in der INL (Pfeilspitze) und in der GC detektiert. Rechts unten ist ein Ausschnitt aus der INL vergrößert dargestellt, der die paarweisen Markierungen der Centrosomen zeigt. (C) Schematische Darstellung eines Säugetierstäbchens. Das lichtempfindliche Außensegment (OS) ist über das nicht-motile modifizierte Verbindungscilium (CC) mit dem Innensegment (IS) verbunden. N = Perikaryon mit Nukleus, S = Synapsenregion. Die Lokalisation von Centrin wird durch die grüne Markierung im Schema angedeutet. (D) Indirekte Anti-Centrin Immunofluoreszenz mit dem Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) von einer isolierten Photorezeptorzelle der Rattenretina, aufgenommen mit einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop. Das Bild zeigt eine Centrin-Färbung des Verbindungsciliums und des Basalkörpers der Photorezeptorzelle.

Größenbalken: (A, B): 20 μm ; (B) Vergrößerung: 7 μm ; (D): 2 μm .

Im Gegensatz zu den „nur“ affinitätsaufgereinigten Antikörpern, zeigen die zusätzlich prä-adsorbierten Ab pMmC1 bis pMmC4 unterschiedliche spezifische Markierungen in unterschiedlichen Kompartimenten der Photorezeptorzelle (Abb. 4.10) von Mäusen.

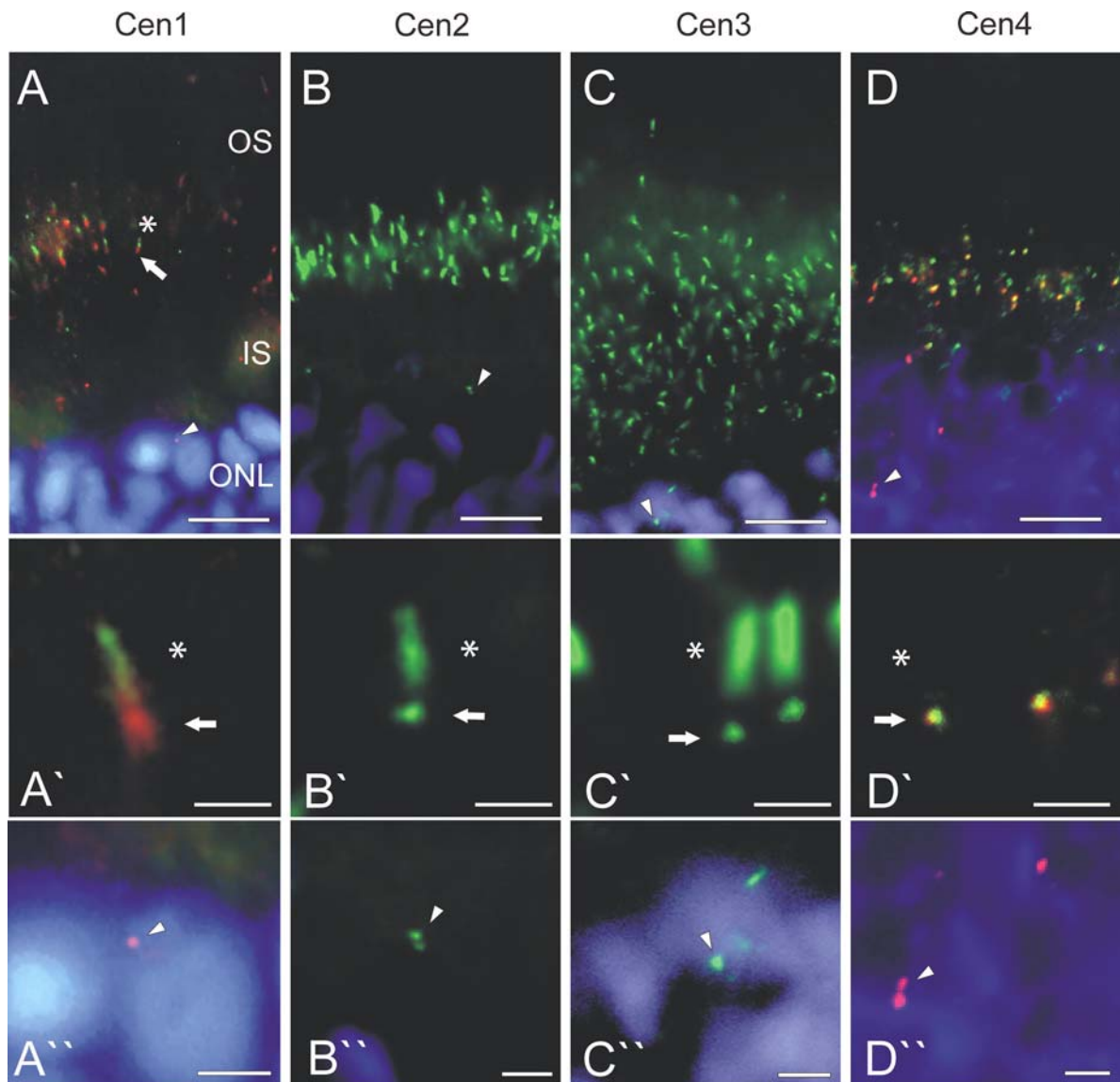


Abbildung 4.10 Subzelluläre Lokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in Mausretinae durch Immunfluoreszenzanalysen

Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung der vier Centrin-Isoformen (MmCen1p bis MmCen4p) in longitudinalen Kryostatschnitten durch Mausretinae. Es wurden die prä-adsorbierten affinitätsaufgereinigten Antikörper pMmC1 bis pMmC4 verwendet. Die Zellkerne der äußeren Körnerschicht wurden mit DAPI angefärbt (blau). In (A) und (D) wurde ein Marker für Centriolen γ -Tubulin verwendet (rot). (A' bis D' und A'' bis D'') sind vergrößerte Ausschnitte aus (A bis D). In allen Abbildungen markiert ein Stern das Verbindungscilium, ein Pfeil den Basalkörper und eine Pfeilspitze Centrosomen in Müller Gliazellen. **(A)** Indirekte Immunfluoreszenz des prä-adsorbierten Ab pMmC1 (grün) und dem Ab γ -Tubulin (rot). Centrin 1 ist nur in dem Verbindungscilium zwischen Innen- und Außensegment lokalisiert [Stern in (A und A')], aber nicht in den Centriolen des Basalkörpers [Pfeil, Anti- γ -Tubulin Markierung] und der Centrosomen (Pfeilspitze), welche man deutlich als rote Punkte in (A und A'') erkennen kann (Anti- γ -Tubulin Markierung). **(B)** Indirekte Immunfluoreszenz des prä-adsorbierten Ab pMmC2 (grün). Centrin 2 ist deutlich im Verbindungscilium [Stern in (B')], in den Centriolen des Basalkörpers [Pfeil in (B')] und in den Centriolen der Centrosomen lokalisiert, welche als grüne Punkte [Pfeilspitze in (B und B'')] gefärbt sind. **(C)** Indirekte Immunfluoreszenz des prä-adsorbierten Ab pMmC3 (grün). Centrin 3 ist wie Centrin 2 deutlich im Verbindungscilium [Stern in (C')], in den Centriolen des Basalkörpers [Pfeil

in (C'') und in den Centriolen der Centrosomen lokalisiert, welche als grüne Punkte [Pfeilspitze in (C und C'')] in Erscheinung treten. **(D)** Indirekte Immunofluoreszenz des prä-adsorbierten Ab pMmC4 (grün) und dem Ab γ -Tubulin (rot). Centrin 4 zeigt keine Markierung im Verbindungscilium [Stern in (D')], sondern es kolokalisiert mit γ -Tubulin in den Centriolen der Basalkörper [Pfeil in (D')] als gelbe Punkte im übereinander gelegten Bild. Centrin 4 fehlt vollkommen in den Centriolen der Centrosomen, welche als rote Punkte in nicht-Photorezeptorzellen [Pfeilspitzen in (D und D'')] mit Anti- γ -Tubulin markiert sind.

Größenbalken: (A bis D): 7,5 μm ; (A' bis D'): 1 μm ; (A'' bis D''): 1,9 μm .

Indirekte Immunofluoreszenz zeigt, dass MmCen1p nur im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle lokalisiert ist [Abb. 4.10 (A, A')]. Im Gegensatz dazu steht die Markierung des prä-adsorbierten Antikörpers pMmC4, der nur eine Färbung im Basalkörper des Verbindungsciliums zeigt [Abb. 4.10 (D, D')]. Indirekte Immunofluoreszenzaufnahmen mit dem Ab pMmC2 und 3 visualisieren eine Markierung sowohl im Verbindungscilium, als auch im Basalkörper [Abb. 4.10 (B, B' und C, C')]. Weiterhin zeigt die Abbildung 4.10 (B'' und C''), dass MmCen2p und MmCen3p in den Centriolen von Centrosomen in Müller Gliazellen der Retina lokalisiert sind, während MmCen1p und MmCen4p dort nicht detektiert werden [Abb. 4.10 (A'' und D'')].

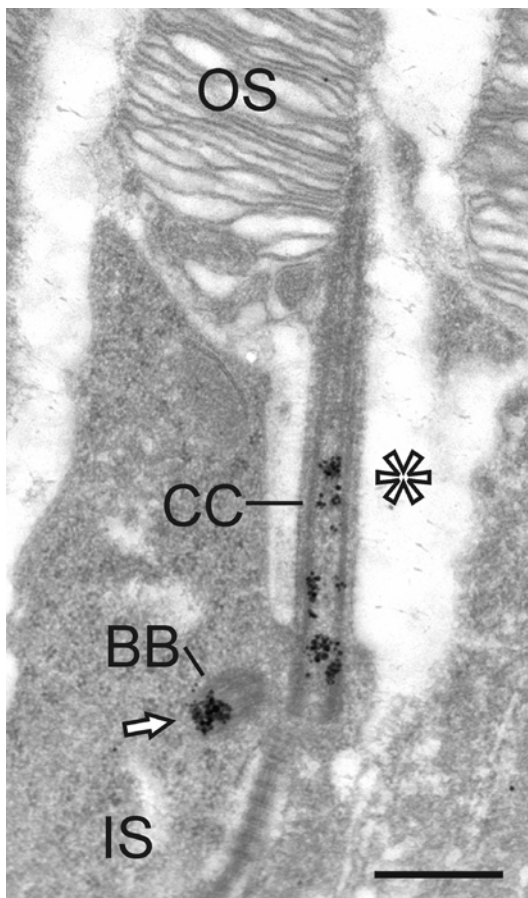


Abbildung 4.11 Immunoelektronenoptische Lokalisation von Centrin 3

Subzelluläre silberverstärkte immunoelektronenmikroskopische Lokalisation von Centrin 3 mit dem affinitätgereinigten prä-adsorbierten Ab pMmC3 durch einen longitudinalen Ultradünnschnitt einer Mausretina. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt einer Stäbchen-Photorezeptorzelle aus der Maus. MmCen3p ist im nicht-motilen Verbindungscilium (CC, Stern), welches das Innensegment (IS) mit dem lichtsensitiven Außensegment (OS) verbindet, lokalisiert. Weiterhin ist eine prominente spezifische Anti-Centrin 3 Markierung am Basalkörper (BB, Pfeil) des Cilienapparates zu finden.

Größenbalken: 500 nm.

Zusätzliche silberverstärkte immunoelektronenoptische Inkubationen mit dem prä-adsorbierten affinitätsaufgereinigten Antikörper pMmC3 konnten die Lokalisation von MmCen3p in der Retina von Mäusen im Verbindungscilium und im Basalkörper nochmals bestätigen.

Mit Hilfe der spezifischen prä-adsorbierten Antikörper pMmC1 bis pMmC4 konnte das erste Mal gezeigt werden, dass alle Centrin-Isoformen in ein- und derselben Zelle, der Photorezeptorzelle, koexprimiert werden und dabei in subzellulären Bereichen partiell kolokalisiert sind. Weiterhin konnte validiert werden, dass Centrin 2 und 3 an den Centrosomen von nicht-Photorezeptorzellen lokalisiert sind, während die spezifischen Antikörper gegen MmCen1p und MmCen4p dort keine Markierungen zeigten. HsCetn2.4 (spezifisch für Centrin 2) zeigte die gleichen Markierungen in der Retina wie der prä-adsorbierte pMmC2 (Daten nicht gezeigt).

4.2.1. Lokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in HeLa-Zellen

Erste Hinweise zu der Lokalisation von Centrinen am Centrosom ergaben sich aus den Immunofluoreszenzanalysen in Abbildung 4.10 von der Retina. Frühere Publikationen postulierten eine Lokalisation von Centrin 2 in den Centriolen von Centrosomen, während Centrin 3 im pericentriolären Material lokalisiert ist, welches die Centriolen in Zellen umgibt (Baron *et al.*, 1992; Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Paoletti *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997; Laoukili *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2001; D'Assoro *et al.*, 2001). Allerdings konnten auch in diesen Publikationen keine spezifischen Antikörper gegen alle Centrin-Isoformen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen markiert, die in den meisten Publikationen als Modellsystem für somatische Zellen verwendet wurden, um Centrosomenlokalisationen von Centrinen darzustellen. Um die Ergebnisse der Centrin-Markierungen an den Centrosomen in der Retina noch einmal zu validieren, wurden die affinitätsaufgereinigten prä-adsorbierten Centrin-Antikörper und HsCetn2.4 auf HeLa-Zellen inkubiert und in Immunofluoreszenzanalysen ausgewertet.

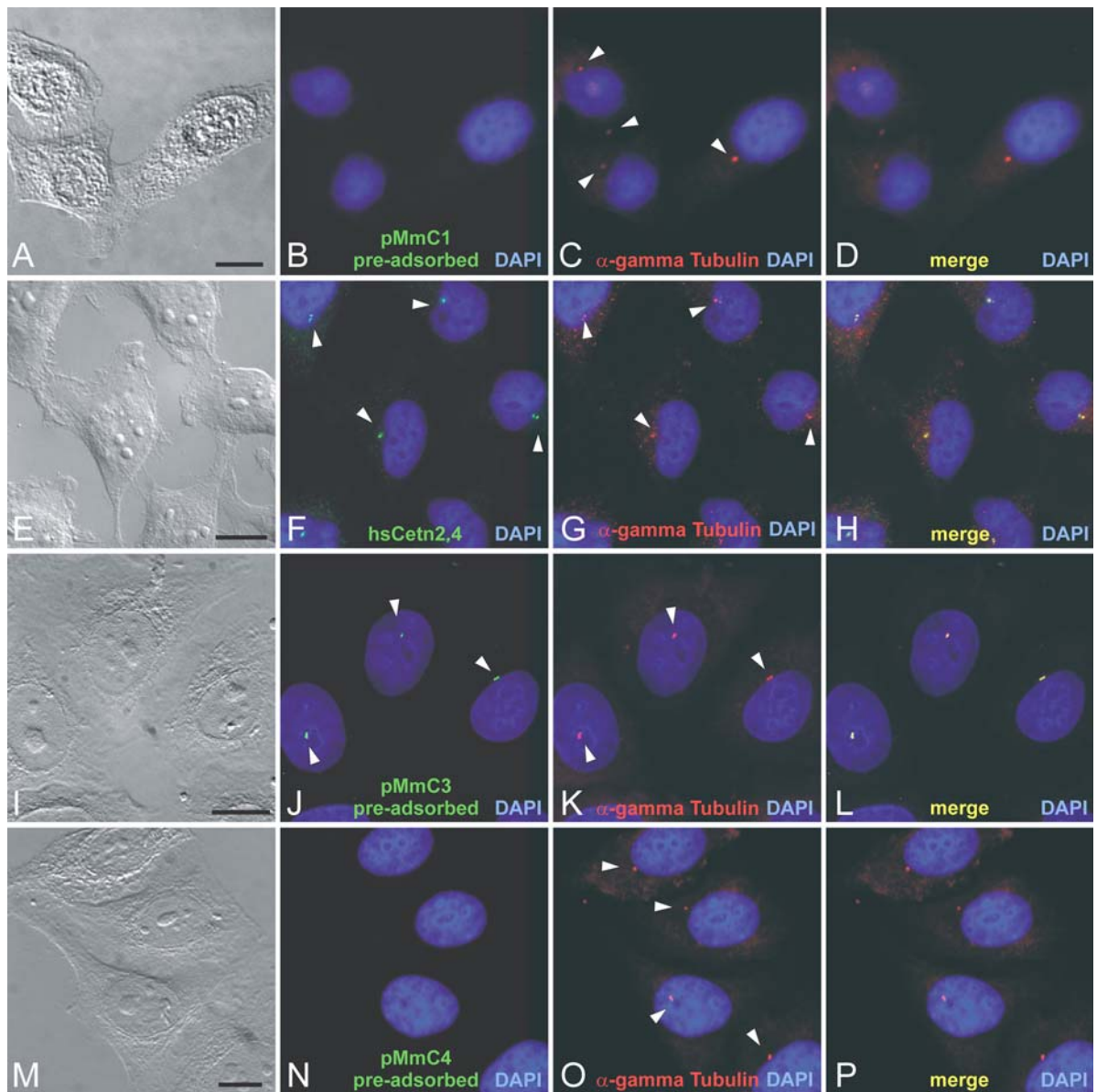


Abbildung 4.12 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-Zellen mit prä-adsorbierten spezifischen Antikörpern pMmC1 bis 4 und γ -Tubulin

Indirekte Immunfluoreszenz von HeLa-Zellen mit den spezifischen prä-adsorbierten Antikörpern pMmC1, 3, 4 und HsCetn 2.4, die nachweislich zwischen den Centrin-Isoformen diskriminieren. (A, E, I, M) zeigen differenzielle Interferenzkontrast-Bilder der HeLa-Zellen, während alle anderen Bilder Fluoreszenzaufnahmen darstellen, die mit einer blauen Zellkernfärbung der DNA (DAPI) abgebildet sind. In allen Versuchen werden Doppelmarkierungen mit dem Centrosomen Marker Anti- γ -Tubulin (rot) dargestellt (B, C) Indirekte Immunfluoreszenz Markierung mit dem prä-adsorbierten Ab pMmC1 (grün) und Anti- γ -Tubulin (rot). In (B) findet man keine Markierung, während in (C) die Centrosomen sehr gut zu erkennen sind (Pfeilspitzen). (D) Überlagerung („merge“) der Bilder aus (B) und (C). (F) Markierung mit HsCetn2.4, der hier die Centrosomen (Pfeilspitzen) der Zellen zeigt. (G) zeigt eine Doppelmarkierung mit (F) mit dem Antikörper gegen γ -Tubulin (rot). In (H) ist die Überlagerung der beiden Markierungen aus (F und G) dargestellt. Man erkennt deutlich eine Kolokalisation beider Proteine am Centrosom. (J) Indirekte Immunfluoreszenz Markierung mit dem prä-adsorbierten Ab pMmC3 (grün). (K) Anti- γ -Tubulin Markierung (rot). In (J) detektiert der spezifische Ab gegen Centrin 3 (grün) die Centrosomen (Pfeilspitzen), was in (K) mit

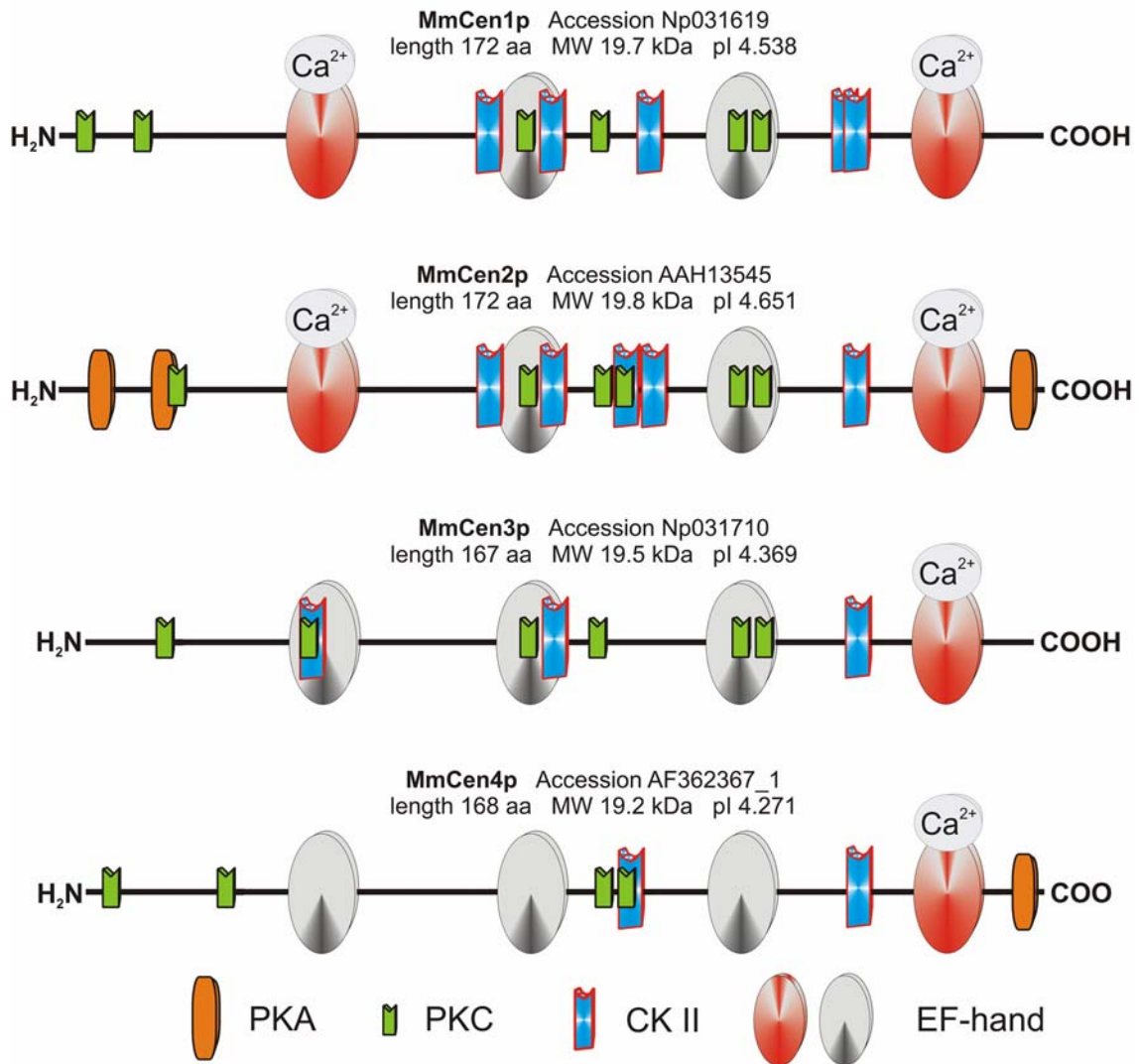
dem Centrosomen Marker Anti- γ -Tubulin sehr gut validiert werden konnte (Pfeilspitzen). In **(L)** ist eine Überlagerung der Bilder aus **(J)** und **(K)** dargestellt, in der man erkennen kann, dass beide Proteine kolokalisiert sind. **(N und O)** Indirekte Immunofluoreszenz Markierung mit dem prä-adsorbierten Ab pMmC4 (grün) und Anti- γ -Tubulin (rot). In **(N)** findet man keine Markierung, während in **(O)** die Centrosomen sehr gut markiert sind (Pfeilspitzen). **(P)** stellt eine Überlagerung der Bilder aus **(L)** und **(M)** dar, bei der zu erkennen ist, dass Centrin 4 nicht am Centrosom lokalisiert ist.

Größenbalken: (A, M): 6,6 μm ; (E, I): 8,25 μm .

Dabei zeigte sich, dass mit den spezifischen Antikörpern pMmC1 und pMmC4 keine Markierung in den HeLa-Zellen festgestellt werden konnte (Abb. 4.12). Um die Centrosomen in allen Analysen zu markieren, wurden die Centriolen der Centrosomen mit einem Marker für Centrosomen Anti- γ -Tubulin visualisiert. Die Antikörper pMmC2 (Abb. 8.4), HsCetn2.4 und pMmC3 zeigten eine Kolokalisation in den Centriolen der Centrosomen mit γ -Tubulin (Abb. 4.12). Damit konnte noch einmal eindeutig gezeigt werden, dass die Centrine 1 und 4 nicht ubiquitär in Geweben mit Centrosomen exprimiert werden, sondern sich auf Cilien tragende Gewebe, wie die Retina beschränken. Im Gegensatz dazu, werden Centrin 2 und 3 in Centrosomen beinhaltenden Geweben exprimiert bzw. sind sogar Bestandteile der Centrosomen. Da Centrosomen in nahezu jedem Gewebe vorhanden sind, ist dies der Grund, warum diese zwei Isoformen auch ubiquitär in allen Geweben exprimiert werden (Middendorp *et al.*, 1997; Wolfrum und Salisbury, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2002; Gavet *et al.*, 2003).

4.3. *Centrin-Phosphorylierung in der Retina*

Die Bindung von Ca^{2+} ist ein wichtiger Bestandteil des Regulationsmechanismus der Centrine in ihrer zellulären Funktion (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gavet *et al.*, 2003; Giebl *et al.*, 2004a; Giebl *et al.*, 2004b). Darüber hinaus gibt es verschiedene Hinweise, dass die Funktionen von Centrinen auch durch Phosphorylierungen reguliert werden können (Salisbury *et al.*, 1984; Martindale und Salisbury, 1990; Lingle *et al.*, 1998; Lutz *et al.*, 2001). *In vitro* Studien von Human-Centrinen zeigten, dass diese während des Zellzyklus durch die Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert wurden (Lutz *et al.*, 2001). Mittels computergestützter Aminosäuresequenzanalysen mit dem Computerprogramm *Omega 2.0* konnten in den Maus Centrin-Isoformen Motive identifiziert werden, die verschiedenen Proteinkinasen als Zielsequenzen dienen können (Abb. 4.13).

Abbildung 4.13 Schematische Darstellung der *Omega*-Analysen der Maus

Centrin-Isoform-Proteine 1 bis 4

In den Schemata der Centrin-Isoformen MmCen1p bis MmCen4p sind die Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) und Caseinkinase II (CK II) dargestellt. Dabei zeigt nur MmCen2p und MmCen4p PKA Bindemotive. Zusätzlich sind die jeweils vier EF-Hand Motive in aktiver (Ca^{2+} bindend) und inaktiver Form (nicht Ca^{2+} bindend) eingezeichnet. Aktive EF-Hand Motive sind rot und nicht aktive sind grau dargestellt. Außerdem sind zu allen vier Isoformen die „Accession Number“ von NCBI, das errechnete Molekulargewicht (MW), die Länge der Aminosäuresequenz („length aa“) und der errechnete isoelektrische Punkt angegeben.

Die vier Maus Centrine besitzen Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC) und die Proteinkinase CKII (CKII). Zusätzlich konnten in Maus Centrin 2 und 4 noch drei bzw. ein Proteinkinase A (PKA) Bindemotiv festgestellt werden. Zur Klärung der Frage, ob Centrine auch in Säugetierretinae phosphoryliert werden, wurden verschiedene *in vitro* und *ex vivo* Ansätze gewählt. Zusätzlich sollte untersucht werden, welche Kinasen für die Phosphorylierung von Maus-Centrinen in der Retina verantwortlich sind.

Nach langwieriger methodischer Entwicklungsarbeit wurden Versuchsbedingungen validiert, mit deren Hilfe Phosphorylierungen von verschiedenen Centrinen in der Säugetierretina erfasst werden konnten. Die Strategien bewegten sich von *in vitro* Experimenten mit rekombinanten Centrin-Isoformen, *in vitro* Experimenten mit rekombinanten Centrin-Isoformen in Rinderretinaextrakten bis hin zu *ex vivo* Experimenten mit isolierten Rattenretinae.

4.3.1. *Ex vivo* Phosphorylierungen explantierter Rattenretinae

Für die Darstellung von Phosphorylierungen von Centrinen in Säugerretinae konnte eine *ex vivo*-Strategie entwickelt werden. Hier wurden Centrine in explantierten hell- und dunkel adaptierten Rattenretinae mit Hilfe von Immunopräzipitationen untersucht. Dazu wurden hell- bzw. dunkel-adaptierte Rattenretinae explantiert und mit radioaktivem Phosphat im Hellen oder im Dunklen inkubiert. Da die Retinae während der Inkubation mit Phosphat weiterhin biologisch aktiv waren, konnte davon ausgegangen werden, dass nur die Lichtverhältnisse während der Inkubation entscheidend für die Phosphorylierungen waren. Als Kontrollen wurden Retinae ohne Zugabe von radioaktivem Phosphat verwendet. Anschließend wurden die Centrine der Retina über Immunopräzipitationen mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5) aus dem Lysat isoliert und analysiert.

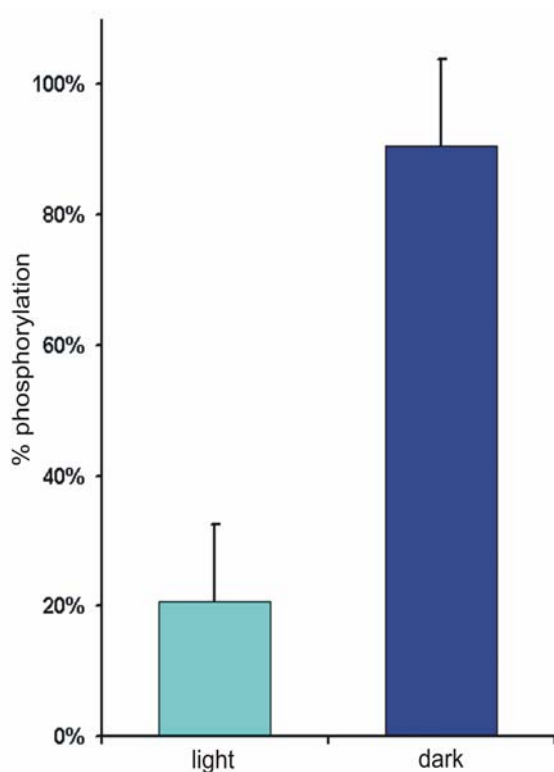


Abbildung 4.14 Licht-abhängige Phosphorylierung von Centrinen in explantierten Retinae von adulten Ratten

Explantierte Rattenretinae wurden mit radioaktivem Phosphat inkubiert und hell (hellblauer Balken, „light“) oder dunkel (dunkelblauer Balken, „dark“) adaptiert. Die Radioaktivität der Proben wurde nach einer Immunopräzipitation mit dem Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) mit einem Szintillationszähler bestimmt. Die präzipitierten Centrine sind nach Dunkel-Adaption dreimal stärker phosphoryliert als nach der Hell-Adaption. Die Standardabweichung wurde aus vier Versuchsansätzen errechnet. Dabei wurde der höchste Wert auf 100% gesetzt.

Durch Western Blot Analysen mit dem Centrin-Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) der Immunopräzipitationen konnte Centrin als Hauptbestandteil der analysierten Proben identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Alle Ansätze zeigten Banden bei ca. 20 kDa, entsprechend des MW von Centrin. Die Messungen der Radioaktivität mittels Szintillationszähler ergaben Unterschiede zwischen den analysierten hell- und dunkel-adaptierten Proben (Abb. 4.14). Die endogenen Centrine wurden durch die angewendete *ex vivo* Methode phosphoryliert. Es konnte ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung der Centrine in dunkel-adaptierten Rattenretinae gezeigt werden.

Die Phosphorylierungsexperimente mit radioaktivem Phosphat an isolierten Rattenretinae bestätigten die Endogen-Centrin-Phosphorylierung in Ratten Retinae. Weiterhin zeigten die Immunopräzipitationen eine dreifach höhere lichtabhängige Phosphorylierung dunkel-adaptierter Rattenretinae. Dabei konnte nicht validiert werden, welche Centrin-Isoform in diesem Experiment phosphoryliert wurde, weil der Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) alle Isoformen der Retina (Centrin 1 bis Centrin 4) immunopräzipitierte. Weiterhin war unklar, welche Kinase für diese Phosphorylierung verantwortlich war.

4.3.2. *In vitro* Phosphorylierungen rekombinanter Maus-Centrine mittels Rinderretinaextrakten

Durch erste Hinweise von lichtabhängigen Phosphorylierungen von Centrinen in der Retina von Säugern wurde versucht, durch *in vitro* Phosphorylierungen von den rekombinanten Maus-Centrinen MmCen1p bis MmCen4p zu validieren, welche der vier Centrin-Isoformen von Kinasen aus Säugerretinae phosphoryliert werden können.

Zum Nachweis der Phosphorylierung von Centrinen in der Retina, wurden rekombinante MmCen1p bis MmCen4p in einem *in vitro* „Assay“ durch Rinderretinaextrakte phosphoryliert. Es wurden Extrakte von hell- bzw. dunkel-adaptierten Rinderretinae verwendet. Nach Inkubation mit radioaktivem ATP und den verschiedenen rekombinanten Centrin-Isoformen wurden diese mittels Immunopräzipitation isoliert und das radioaktiv markierte Centrin mit Hilfe eines Szintillationszählers analysiert.

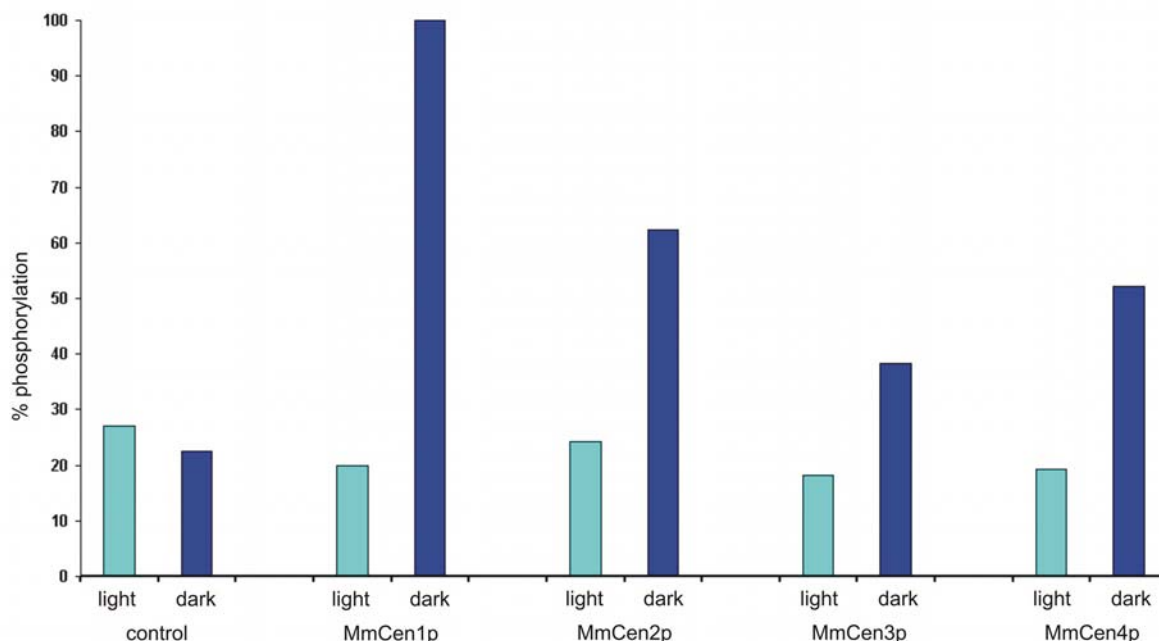


Abbildung 4.15 Lichtabhängige *in vitro* Phosphorylierung rekombinanter Centrin-Isoformen 1-4 in Rinderretinaextrakten

Rekombinant exprimierte MmCen1p bis MmCen4p wurde durch aktive Kinasen in dunkel- (dunkelblaue Balken, „dark“) und hell- (hellblaue Balken, „light“) adaptierten Rinderretinaextrakten phosphoryliert. Zum Nachweis der Phosphorylierung wurde radioaktives ATP verwendet. Mittels Immunopräzipitation mit mAb pan-Centrin (Clone 20H5) wurden die Centrine aus den Extrakten isoliert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe des Szintillationszählers und wurde prozentual aufgearbeitet, wobei sich alle Prozentangaben auf den höchsten Wert beziehen („dark“ MmCen1p). Alle Isoformen wurden durch hell-adaptierte Rinderretinaextrakte nicht über den Kontrollwert (Immunopräzipitation ohne Ab) phosphoryliert. Mit dunkel-adaptiertem Rinderretinaextrakt wurden alle Centrin-Isoformen phosphoryliert. Die Isoformen MmCen1 und 2p wurden am stärksten phosphoryliert.

Durch Western Blot Analysen der durchgeführten Immunopräzipitationen konnten die Centrin-Isoformen als Hauptbestandteile der Immunopräzipitation identifiziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Messung der Radioaktivität ergab Unterschiede zwischen den verschiedenen Centrin-Isoform Proben. Die Inkubation von rekombinant exprimierten Centrin-Isoformen mit Proteinextrakten aus hell- und dunkel-adaptierten Rinderretinae und radioaktiv markiertem ATP führte zu Phosphorylierungen von Centrinen. Allerdings konnte diese nur in den Ansätzen mit den dunkel-adaptierten Retinaextrakten festgestellt werden. Die Centrin-Isoformen die mit dem hell-adaptierten Rinderretinaextrakt inkubiert wurden, zeigten keine höhere Radioaktivität, also Phosphorylierung, als die Kontrolle, welche eine Inkubation mit MmCen1p und eine anschließende Immunopräzipitation ohne Antikörper darstellte. Centrin 1, 2 und 4 wurden verstärkt durch Kinasen in dunkel-adaptierten Rinderretinaextrakten phosphoryliert. In den dunkel-adaptierten Geweben wiesen die

Kinasen, die für die Centrin-Phosphorylierung verantwortlich waren, eine deutlich höhere Aktivität auf. Lediglich das rekombinante MmCen3p wurde mit den unterschiedlichen Extrakten nicht mehr als die Kontrolle phosphoryliert. Mit Hilfe des durchgeführten *in vitro* „Assays“ wurde gezeigt, dass rekombinante Centrine durch die Kinasen in dunkel-adaptierten Retina Geweben stärker phosphoryliert wurden, als in hell-adaptierten. Dabei zeigte sich, dass die Isoformen MmCen1p und MmCen2p am stärksten durch die aktiven Kinasen in dunkel-adaptierten Retinaextrakten phosphoryliert wurden.

4.3.3. *In vitro* Phosphorylierungen rekombinanter Maus-Centrine

Um die Kinase für die Phosphorylierungen von Centrinen in der Retina einzugrenzen, wurden *in vitro* Phosphorylierungs „Assays“ mit rekombinant exprimierten Centrin-Polypeptiden und verschiedenen Kinasen vorgenommen. Diese Experimente wurden in dem Labor unseres Kooperationspartners AG Hofmann am Institut für medizinische Physik und Biophysik in Berlin (Charité) durchgeführt. Die isolierten Proteinkinasen PKA, PKC und CKII phosphorylierten die verschiedenen Centrin-Isoformen differenziell. Alle Experimente wurden mit den Klonen durchgeführt, die während der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden. Beispielhaft wurden die Phosphorylierungsexperimente der CKII für alle Kinasen in der Abbildung 4.16 dargestellt.

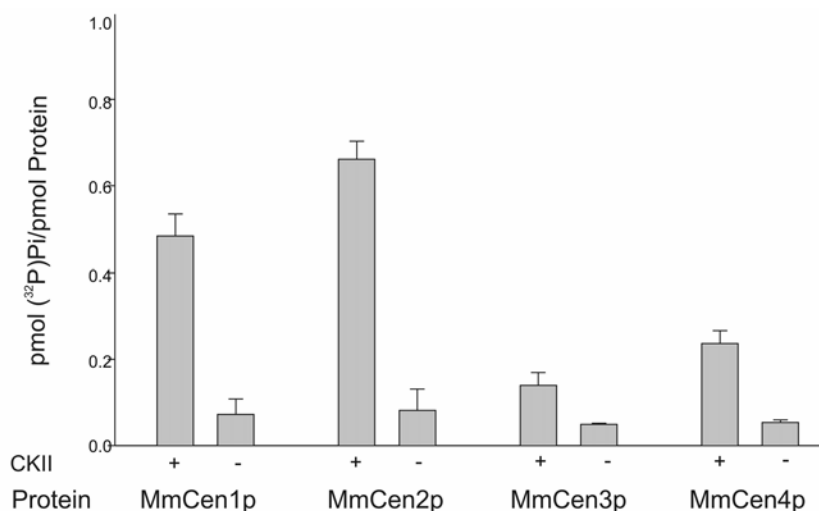


Abbildung 4.16 *In vitro* Phosphorylierung rekombinanter Centrin-Isoformen durch die CKII

MmCen1p und MmCen2p werden durch die CKII am stärksten phosphoryliert, wogegen MmCen3p und MmCen4p weniger phosphoryliert werden.
Einheiten: Verbrauch von piko Mol ATP/piko Mol Protein (pmol (³²P)Pi/pmol Protein).

Alle *in vitro* Experimente wurden nach Lutz *et al.* (2001) durchgeführt. Es zeigte sich, dass alle Centrine durch die Kinasen PKA, PKC (Daten nicht gezeigt) und CKII *in vitro* phosphoryliert werden können. Dabei zeigten die Centrin-Isoformen MmCen1p und MmCen2p deutlich höhere Phosphorylierungen bei allen Kinasen als die Isoformen MmCen3p und MmCen4p.

4.3.4. Reduktion der Centrin-Phosphorylierung in explantierten Rattenretinae durch Proteinkinase-Inhibitoren

Da die *in vitro* Experimente keinen Unterschied zwischen den Kinasen zeigten, musste auf anderen Versuchswegen gezeigt werden, welche Kinasen in der dunkel-adaptierten Retina für die Phosphorylierung von den Centrin-Isoformen verantwortlich sind. Da die Aminosäuresequenz der verschiedenen Centrin-Isoformen Motive beinhaltet, die von verschiedenen Proteinkinasen erkannt werden, wurden membrangängige Inhibitoren der verschiedenen in Betracht kommenden Proteinkinasen in den Phosphorylierungs „Assay“ der explantierten Rattenretinae eingesetzt.

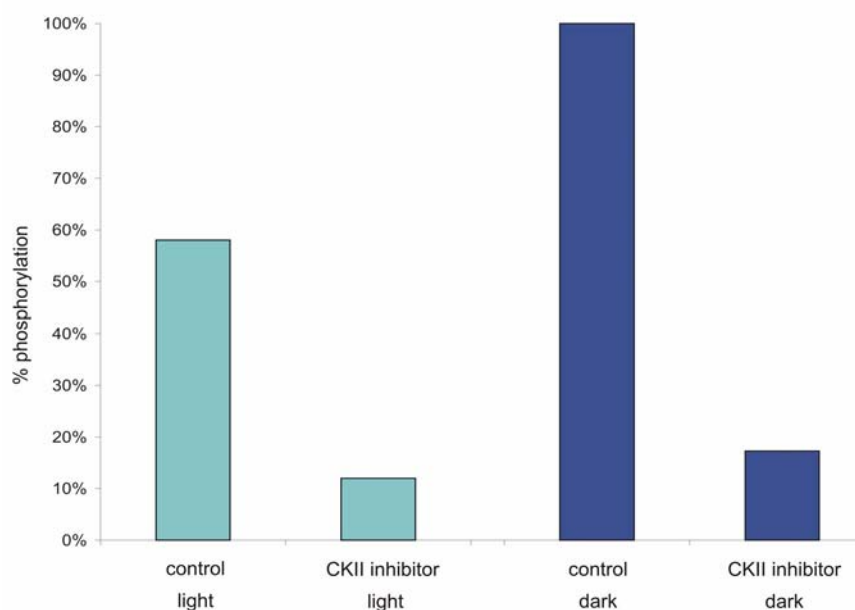


Abbildung 4.17 Inhibition der Centrin-Phosphorylierung durch CKII-Inhibitor

Hell- und dunkel-adaptierte Rattenretinae wurden in *ex vivo* Experimenten mit dem membrangängigen CKII-Inhibitor [5,6-Dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidazol (DRB)] inkubiert und untersucht. Der spezifische CKII-Inhibitor reduziert die Centrin-Phosphorylierung in der isolierten dunkel-adaptierten („*dark*“) Rattenretina um 80% und in der isolierten hell-adaptierten („*light*“) Rattenretina um 40%. Die Messung der Radioaktivität erfolgte mit Hilfe des Szintillationszählers und wurde prozentual aufgearbeitet, wobei sich alle Prozentangaben auf den höchsten Wert beziehen („*control dark*“).

Im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen ohne Inhibitor, konnte nur in den Immunopräzipitationen der Rattenretinae mit CKII Inhibitor eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung im Szintillationszähler festgestellt werden (Abb. 4.17). Hierbei fiel die dramatische Reduktion der Phosphorylierung der CKII in den hell- aber vor allem in den dunkel-adaptierten Retinae auf. Diese Vorversuche zeigten weiterhin eine deutlich höhere Phosphorylierung in hell-adaptierten Rattenretinae, als in den zuerst gezeigten Versuchen (Abb. 4.14). Dieser Unterschied kann hier nicht geklärt werden, zeigt aber deutlich, dass mehrere Versuche notwendig sind, als hier vorgenommen werden konnten. Diese vorbereitende Experimente mit Kinase-Inhibitoren weisen darauf hin, dass vor allem die Proteinkinase CKII eine bedeutende Rolle bei der Phosphorylierung von Centrinen in der Retina einnimmt (Abb. 4.17). Um zu zeigen, dass die CKII in der Retina exprimiert wird, wurden Western Blot Analysen und indirekte Immunofluoreszenzanalysen mit spezifischen Antikörpern gegen die CKII durchgeführt.

4.3.5. Kolokalisation der CKII mit Centrin in der Retina

CKII wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als Komponente der Centrosomen, assoziiert mit Mikrotubuli und dem Spindelapparat von mitotischen Zellen, beschrieben (Faust *et al.*, 2002). Immunocytochemische Untersuchungen in Kryostatschnitten von Mäuseretinae ließen nun erstmals erkennen, dass die CKII auch im Cilienapparat der Photorezeptorzellen lokalisiert ist und zwar sowohl im Basalkörper als auch im Verbindungscilium. Die Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Centrin [pan-Centrin (clone 20H5)] weisen darauf hin, dass dort die CKII mit Centrinen partiell kolokalisiert vorliegt (Abb. 4.18). Zusätzlich konnten auch Kolokalisationen von CKII und Centrinen in den Schnitten an den Centrosomen der inneren Körnerschicht und der Ganglienzellschicht visualisiert werden (Daten nicht gezeigt). Um unspezifische Markierungen auszuschließen, wurden Rinderretinaextrakte mit den spezifischen Antikörpern gegen die CKII in Western Blot Analysen untersucht. Diese Experimente zeigten in den Rinderretinaextrakten eine spezifische Bande bei 44 kDa, die der Höhe der Caseinkinase II entsprach.

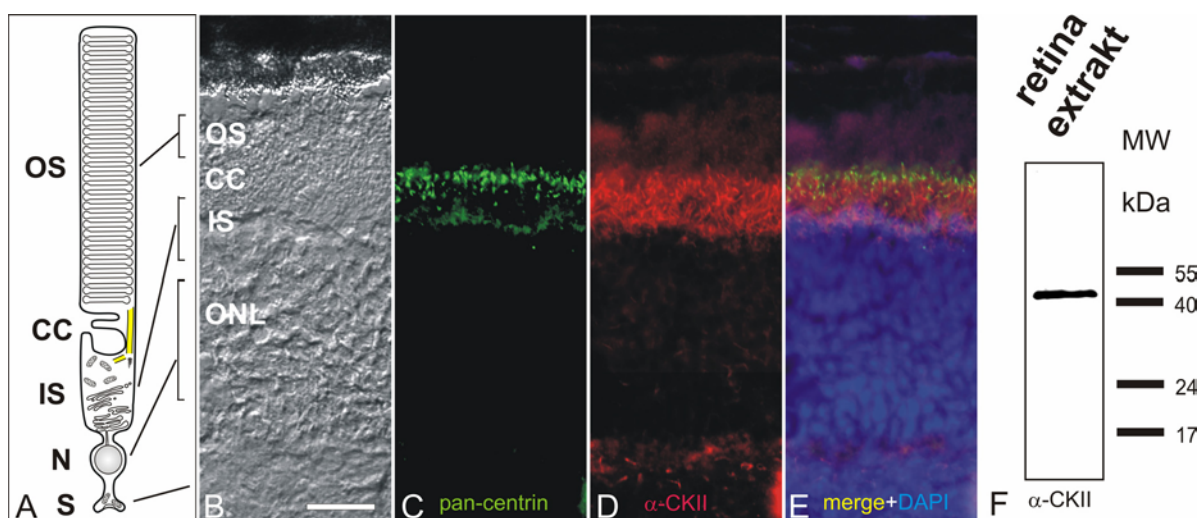


Abbildung 4.18 Kolokalisation von Centrinen mit CKII im Verbindungscilium von Stäbchen Photorezeptorzellen

(A) Schema einer Stäbchen Photorezeptorzelle. Photorezeptorzellen gliedern sich in ein licht-sensitives Außensegment (OS), das über ein nicht-motiles modifiziertes Verbindungscilium (gelb, CC) mit dem Innensegment (IS) verbunden ist [Synapsenregion (S)]. Zellkerne im Perikaryon der Zellen sind in der äußeren Körnerschicht (ONL) lokalisiert. (B) Differenzieller Interferenzkontrast-Aufnahme (DIK) eines Longitudinalschnittes durch Rattenretina. (C-E) Analyse der Dreifachfluoreszenz-Markierung des Retinaschnittes mit dem Antikörper pan-Centrin (clone 20H5), Anti-CKII und DAPI. (C) Centrine sind im Verbindungscilium und den Basalkörpern des Cilienapparates der Photorezeptorzellen lokalisiert. (D) Anti-CKII zeigt Markierungen im Innensegment und an den Synapsen der Photorezeptorzellen. (E) Die Übereinanderlagerung beider indirekten Immunofluoreszenzen (gelbe Farbe) zeigt eine partielle Kolokalisation von Centrinen und der CKII im Cilienapparat der Photorezeptorzellen. Zusätzlich wurde die DNA der Zellkerne mittels DAPI gefärbt. (F) Western Blot Analyse von Rinderretinaextrakt mit dem Antikörper gegen CKII (α -CKII). Es wurde eine spezifische Bande bei 44 kDa detektiert, die der Höhe der CKII entspricht. Größenbalken: (B): 13 μ m.

Die vorliegenden Ergebnisse zur Phosphorylierung von Centrinen in der Retina sind einzigartig und spektakulär. Centrine sind die ersten Cytoskelettkomponenten, von denen bekannt ist, dass ihr Phosphorylierungsgrad licht-abhängig moduliert wird.

4.4. Interaktionspartner von Centrinen

Neben der spezifischen subzellulären Lokalisation in Kompartimenten einer Zelle und verschiedenen Regulationsmechanismen wird die Funktion eines Proteins häufig durch seine Wechselwirkungspartner spezifiziert. Daher ist es zur Aufklärung der zellulären Funktion von Proteinen essenziell, nach Wechselwirkungspartnern zu suchen und diese zu identifizieren. Protein-Protein-Interaktionen spielen bei fast allen biologischen Prozessen eine essenzielle Rolle.

Bei der Suche nach Interaktionspartnern von Centrinen in Vertebraten war man bislang recht erfolglos. Lediglich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte mit Karp1p (Biggins und Rose, 1994; Vallen *et al.*, 1994; Spang *et al.*, 1995; Geier *et al.*, 1996) ein Protein identifiziert werden, dessen Interaktion mit dem Centrin Cdc31p am Spindelpolkkörper (SPB) für die Teilung der Hefen notwendig ist (Spang *et al.*, 1995; Paoletti *et al.*, 2003). Das Centrin Cdc31p von *S. cerevisiae* ist das homologe Protein der Hefe zu Centrin 3 in Säugern (Abb. 1.4). Obwohl Kar1p *in vitro* an Säugetier-Centrine binden kann, wurde bislang kein Kar1p-Homolog in Säugern identifiziert (Geier *et al.*, 1996). Mit Mps3p wurde ein weiteres Protein an dem SPB der Hefe entdeckt (Jaspersen *et al.*, 2002), welches mit Cdc31p an der Halbbrücke (engl. „*half bridge*“) des SPB verankert ist und mit Cdc31p interagiert. Die bislang nicht publizierten Ergebnisse aus einer Doktorarbeit an der Universität zu Köln, in der mittels Hefe-Zwei-Hybrid-System nach Centrin-bindenden Proteinen gesucht wurde, waren wenig aussagekräftig und die Interaktionen mit den gefundenen Proteinen [Phosphatase PTPκ, Laminin-bindendes Protein (LBP)] konnten nicht konkretisiert werden (Paschke, 1997). In einer erst kürzlich erschienenen Arbeit wurde mit Sfi1p ein weiteres Hefe-Protein identifiziert, das Ca²⁺-unabhängig an Centrine bindet (Kilmartin, 2003) und dessen Säugetier-Homolog (hSfi1p) auch in Säugetierzellen die Bildung eines Centrin-enthaltenden Filamentsystems unterstützen könnte (Salisbury, 2004). Koimmunopräzipitationen mit Antikörpern gegen das Grünalgen-Centrin aus *Chlamydomonas* [pan-Centrin (clone 20H5)] zeigten eine Interaktion mit den Hitzeschock Proteinen HSP70 und HSP90 („*heat shock protein*“) im Cytoplasma von Frosch (*Xenopus*) Oozyten (Uzawa *et al.*, 1995). Zwar konnten HSP70 und HSP90 in der Retina lokalisiert werden, allerdings zeigten bisher durchgeführte Experimente, dass keines dieser Proteine mit Centrinen in der Retina interagiert.

Für die Suche nach Interaktionspartnern wurden unterschiedliche Strategien verwendet: Zum einen wurde eine ganz neue Strategie entwickelt, um mehrere Interaktionspartner von Centrin in der Retina zu identifizieren („*Overlay Assay*“). Zum anderen wurden etablierte Methoden wie GST-„*Pull-down Assays*“ oder Immunopräzipitationen verwendet, um diese Ergebnisse zu validieren. Dabei wurde stets im Auge behalten, dass Centrine Ca²⁺-bindende Proteine sind und die Ca²⁺-Bindung auch Auswirkungen auf die Bindeeigenschaften von Centrinen haben könnte.

4.4.1. Identifikation von Centrin-Interaktionsproteinen in Säugerretinae mit Ca^{2+} -aktiviertem Centrin

Es erwies sich als schwierig möglichst viele Proteine aus der Retina als Bindepartner von Centrinen zu testen. Eine alternative Möglichkeit stellte ein Retina cDNA-Bank „Screen“ mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems dar. Leider kann bei solchen Versuchsansätzen eine mögliche Ca^{2+} -abhängige Bindung nicht getestet werden (Paschke, 1997). Um Interaktionspartner von Ca^{2+} -aktivierten Centrinen in der Retina zu identifizieren, wurde eine Strategie entwickelt, bei der sowohl alle Proteine der Retina getestet werden konnten als auch Centrine im Ca^{2+} -aktivierten und nicht aktivierten Zustand. Dabei wurde Rinderretinalysat auf eine Membran transferiert und diese mit rekombinantem MmCen1p in Gegenwart von Ca^{2+} (oder EGTA) inkubiert. In einem weiteren Schritt wurde der Blot gewaschen und mit affinitätsaufgereinigten Antikörpern gegen das rekombinante Centrin oder dem Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) inkubiert und visualisiert. Durch diese Technik war es möglich, viele verschiedene Centrin 1 Bindeproteine in der Säugetierretina zu visualisieren (Abb. 4.19).

Allerdings zeigte nur Ca^{2+} -aktiviertes MmCen1p Interaktionen mit vielen verschiedenen Polypeptiden aus der Rinderretina. In der ersten Spur wurde als Kontrolle Centrin im Lysat nachgewiesen. Weiterhin wurden „Overlays“ mit Ca^{2+} -aktiviertem ($1 \mu\text{M CaCl}_2$) MmCen1p und mit nicht Ca^{2+} -aktiviertem Centrin (6 mM EGTA) vorgenommen. Dabei konnten mindestens sechs Proteinbanden als mögliche Interaktionsproteine visualisiert werden, die nach ihrer Größe (kDa) P 27 bis P 46 genannt wurden.

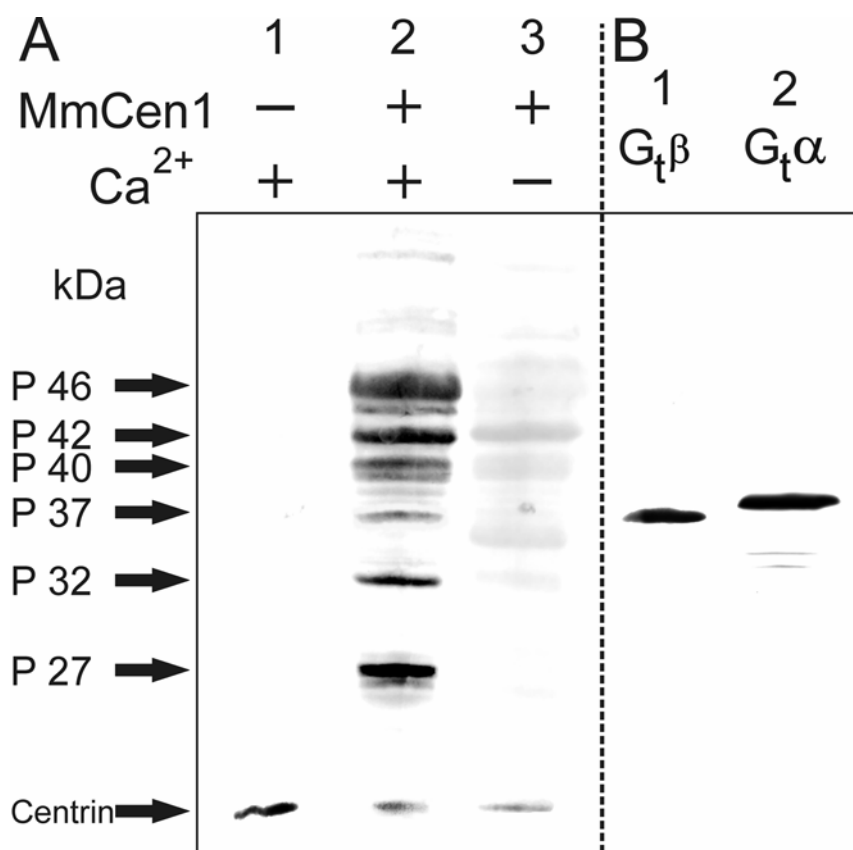


Abbildung 4.19 Analyse eines „*Overlay Assays*“ mit Rinderretinaextrakten

(A) Analyse eines Rinderretina „*Overlay Assays*“ mit rekombinatem MmCen1p (67 µg/ml). Auf eine PVDF-Membran transferierte Rinderretinaextrakte wurden mit Ca²⁺-aktiviertem oder mit EGTA-inaktiviertem MmCen1p überschichtet und anschließend gewaschen. Gebundenes Centrin wurde in einem zweiten Schritt mit dem Antikörper gegen Centrin pan-Centrin (clone 20H5) visualisiert. In Spur 1 ist eine Kontrolle aufgetragen, bei der im „*Overlay*“ rekombinantes Centrin 1 weggelassen wurde. Es konnte nur die Centrin Bande (ca. 20 kDa) aus dem Lysat detektiert werden. In Spur 2 und 3 wurde mit rekombinatem MmCen1p überschichtet (Spur 2 mit 1 µM CaCl₂ und Spur 3 mit 6 mM EGTA). In Spur 2 konnten sechs Banden interagierendes Centrin mit Interaktionspartnern detektiert werden. Diese wurden nach ihrem MW benannt (z.B. P 27 = Protein 27 kDa). (B) zeigt Detektionen mit Antikörpern gegen die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins Transducin (Spur 1: G_tβ, Spur 2: G_tα). Es wurde das gleiche Lysat wie in (A) verwendet. Dabei kann man erkennen, dass beide Transducinbanden mit der Bande P 37 im „*Overay Assay*“ komigrieren.

Auffällig dabei war, dass in Abbildung 4.19 nur in Spur 2 Bindungen von MmCen1p an Interaktionspartnern visualisiert werden konnten. Unter Zugabe von EGTA (Spur 3) in den Bindepuffer konnten keine Interaktionen mit Proteinen aus dem Rinderretinalysat festgestellt werden. Dabei wurden vorhandene freie Ca²⁺-Ionen im Lysat durch das EGTA neutralisiert. Ca²⁺-Aktivierung von Centrin 1 ist also notwendig, um Bindungen an Interaktionspartnern in der Retina feststellen zu können. Dies korreliert mit den Experimenten der Bindung des Hefe Centrins Cdc31p mit Kar1p (Schiebel und Bornens, 1995), wo nachgewiesen wurde, dass eine Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Bindungs

„Assay“ die Affinität zwischen Cdc31p und Kar1p steigerte (Geier *et al.*, 1996; Wiech *et al.*, 1996). In Abbildung 4.19 (B) wurden weiterhin Transducin-Antikörper auf demselben Retinalysat wie in (A) getestet. Es zeigte sich, dass die Bande P 37 [Spur 2, (A)] mit den Banden der Antikörper gegen die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins Transducin $G_t\beta$ und $G_t\alpha$, [Pfeil, (B)] komigrieren.

Um das Protein P 37 näher zu untersuchen, wurden weitere Interaktionsversuche mit dem „*Overlay Assay*“ unternommen. Die Spuren der Rinderretinalysate auf der Western-Blot-Membran wurden halbiert und die rechte Seite für ein „*Overlay Assay*“ mit MmCen1p (plus Ca^{2+} oder plus EGTA) und die linken Seite für Nachweisreaktionen mit verschiedenen Antikörpern verwendet (Abb. 4.20).

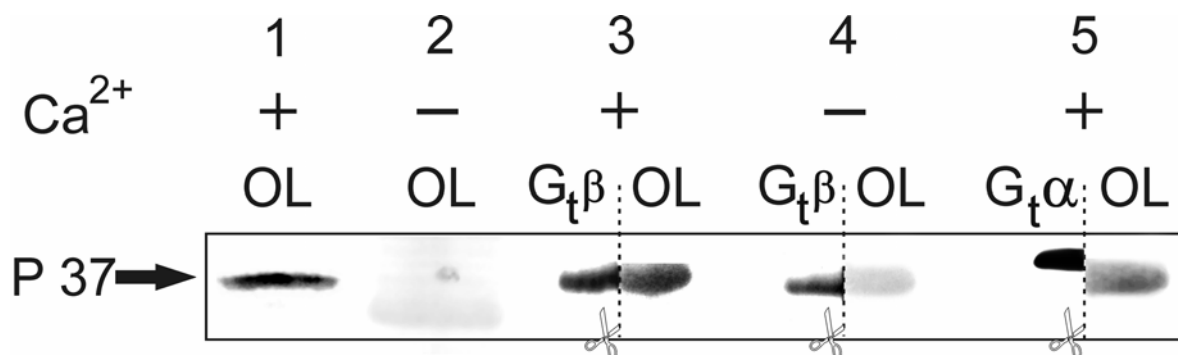


Abbildung 4.20 Identifikation von β -Transducin mittels „*Overlay*“-Strategie

Analyse eines Centrin 1 Western-Blot „*Overlay Assays*“ mit Rinderretinaextrakt. Der Western Blot wurde mit rekombinantem MmCen1p (67 $\mu\text{g/ml}$) überschichtet. Gebundenes Centrin wurde mittels einer Antikörperreaktion mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5) visualisiert. Spur 1 zeigt bei einer Ca^{2+} -Konzentration von 1 μM $CaCl_2$ eine starke Bindung von MmCen1p an ein Protein (P 37) bei ca. 37 kDa. Spur 2 visualisiert in der gleichen Höhe (37 kDa), ohne Ca^{2+} (6 mM EGTA), nur eine schwache Bindung. Für eine Identifizierung der Bande bei 37 kDa wurden die Western-Blot Spuren halbiert und parallel mit Antikörper gegen β -Transducin ($G_t\beta$) (Spur 3 und 4) und α -Transducin ($G_t\alpha$) (Spur 5) inkubiert und die rechte Hälfte mit MmCen1p (Spur 3 und 5 mit Ca^{2+} , Spur 4 ohne Ca^{2+}) überschichtet. Dabei zeigt sich nur unter Zugabe von Ca^{2+} eine Interaktionsbande von MmCen1p mit dem Protein P 37 (Spur 3 und 5). In Spur 5 wird nachgewiesen, dass P 37 nicht mit der Bande von $G_t\alpha$ im Western-Blot korreliert. Allerdings zeigt die Spur 3 eine Übereinstimmung der Größe (37 kDa) von dem Protein P 37 aus dem „*Overlay Assay*“ und der β -Untereinheit von Transducin.

In den „*Overlay Assays*“ zeigten sich erneut nur Bindungen mit Ca^{2+} -aktiviertem rekombinanten MmCen1p (Abb. 4.20, Spur 1 und 2) mit dem Protein P 37. Bei genauer Untersuchung der halbierten Blot-Spuren konnte eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von MmCen1p mit der Untereinheit $G_t\alpha$ des heterotrimeren G-Proteins Transducin ausgeschlossen werden, weil die Größen der Proteine im „*Overlay Assay*“ nicht mit der

Bande in der Antikörperreaktion von $G_i\alpha$ korrelierten (Spur 5). Allerdings konnte in Spur 3 eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von MmCen1p mit dem Protein P 37 festgestellt werden, welches sich in der gleichen halbierten Spur im Western Blot als die β -Untereinheit $G_i\beta$ identifiziert wurde. Da Transducin aus drei Untereinheiten besteht, wurden auf der Suche nach $G_i\gamma$ (8 kDa) auch kleineren Banden als 20 kDa analysiert (Daten nicht gezeigt). Da keine kleineren Banden als 20 kDa visualisiert wurden, wird eine Bindung an die γ -Untereinheit ($G_i\gamma$) ausgeschlossen, welche z.B. in Extrakten fest an $G_i\beta$ gebunden ist und somit als $G_i\beta\gamma$ bezeichnet wird. Mit $G_i\beta$ konnte somit der erste Ca^{2+} -abhängige Bindepartner von Centrin 1 in einer Säugerretina identifiziert werden.

4.4.2. Centrin/Transducin-Komplex

Auf der Suche nach Centrin 1 Interaktionspartnern in der Retina von Vertebraten, wurde eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion mit der β -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins Transducin in „*Overlay Assay*“ Experimenten festgestellt. Um zusätzliche Hinweise für diese Interaktion zu finden, wurden weitere unterschiedliche Interaktionsversuche durchgeführt. Als nächstes Interaktionsexperiment wurden Koimmunopräzipitationen mit verschiedenen Centrin-Antikörpern vorgenommen.

In den Koimmunopräzipitationen wurden Centrine aus dunkel-adaptierten Außensegment-Präparationen (OS) mit Antikörpern gegen Centrin präzipitiert. Bei der Anwesenheit von Ca^{2+} während der Koimmunopräzipitation mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5) gegen das Grünalgen-Centrin konnten in Western Blot Analysen $G_i\alpha$ und $G_i\beta$ nachgewiesen werden. $G_i\alpha$ und $G_i\beta$ koimmunopräzipitierten mit endogenem Centrin aus den Retinaextrakten. In den Kontrollexperimenten ohne Antikörper konnten die Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins nicht detektiert werden (Abb. 4.21).

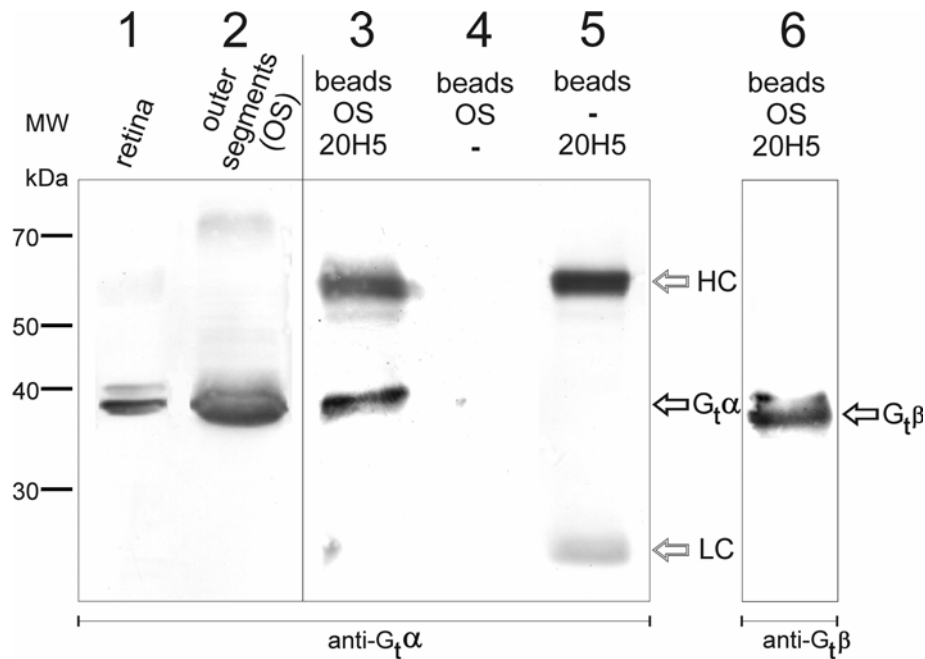


Abbildung 4.21 Koimmunopräzipitation von G_t -holo mit Centrin-Antikörpern

Western Blot Analysen von Koimmunopräzipitationen von Transducin aus Rinderretina Außensegment-Präparationen mit $100 \mu\text{M CaCl}_2$ mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5) gegen das *Chlamydomonas* Centrin. Spur 1 und 2 zeigen eine Western Blot Analyse von Rinderretinaextrakt (retina, Spur 1) und Außensegment-Präparationen von Rinderretinae [outer segments (OS), Spur 2] mit dem mAb gegen $G_t\alpha$, der in beiden Lysaten eine ca. 39 kDa Bande detektiert. Spur 3 (beads, OS, 20H5) zeigt eine Western Blot Analyse mit Anti- $G_t\alpha$ von einer Koimmunopräzipitation mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5) gegen Centrin [die hohe und niedrige Bande korrespondieren mit der schweren und leichten Kette (HC, LC) von Maus-Antikörpern] mit Außensegment-Präparationen. Spur 4 (beads, OS, -) zeigt eine Kontrolle ohne den mAb pan-Centrin (clone 20H5) in der Koimmunopräzipitation. Spur 5 (beads, -, 20H5) zeigt die Kontrolle der Koimmunopräzipitation ohne Außensegment-Lysat und färbt dabei den HC und LC des mAb pan-Centrin (clone 20H5). Spur 6 (beads, OS, 20H5) zeigt die gleiche Koimmunopräzipitation wie in Spur 3, nur im Western Blot mit dem pAb gegen $G_t\beta$ gefärbt. $G_t\alpha$ und $G_t\beta$ koimmunopräzipitieren mit Centrin aus OS-Präparation-Lysat unter Zugabe von $100 \mu\text{M CaCl}_2$ (Spur 3 und 6).

Bei diesem Versuch konnte nicht festgestellt werden, mit welcher Centrin-Isoform Transducin koimmunopräzipitiert, weil der mAb pan-Centrin (clone 20H5) mit allen Isoformen reagiert. Allerdings sind in den Außensegment-Präparationen nur die Centrin-Isoformen anwesend, die sich im Cilium befinden, weil die Außensegmente direkt am Cilium isoliert werden. Weiterhin war nicht klar, ob das gesamte G-Protein oder die einzelnen Untereinheiten mit Centrin Ca^{2+} -abhängig einen Komplex bilden.

Zuerst wurde validiert, ob Ca^{2+} bei der Koimmunopräzipitation wie in den „*Overlay Assays*“ eine wichtige Rolle spielt. Deshalb wurde die Menge an freiem Ca^{2+} in einem Koimmunopräzipitations-Ansatz durch EGTA reduziert und in den anderen extrazelluläres

Ca²⁺ zugegeben. In diesem Versuch wurde der affinitätsaufgereinigte pAb pMmC1 und dunkel-adaptiertes Rinderretinalysat verwendet. In Spur 1 wurde das Rinderretinalysat aufgetragen und zeigte mit den Antikörpern gegen G_tα eine Bande bei ca. 39 kDa. In Spur 2 und 3 wurden zwei Kontrollen einmal ohne Lysat und einmal ohne Antikörper durchgeführt. Beide Kontrollen zeigten keine unspezifische Bindung von Transducin z.B. an die „Beads“. In Spur 4 wurde eine Koimmunopräzipitation mit freiem Ca²⁺ und in Spur 5 ohne freies Ca²⁺ (mit EGTA) durchgeführt und aufgetragen (Abb. 4.22).

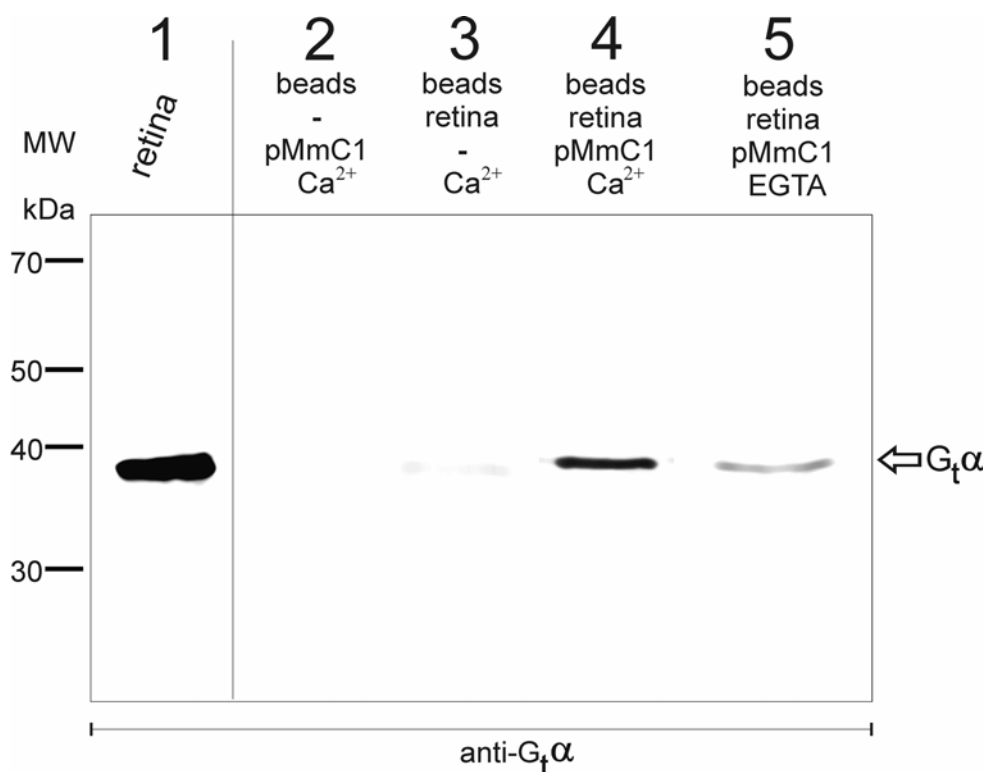


Abbildung 4.22 Ca²⁺-abhängige Koimmunopräzipitation von Transducin mit Centrin-Antikörpern aus Rinderretinaextrakten

Western Blot Analyse einer Ca²⁺-abhängigen Koimmunopräzipitation von Transducin mit dem pAb pMmC1 gegen MmCen1p aus Rinderretina. Western Blot Analysen zeigen in Spur 1 (retina), dass der mAb gegen G_tα eine Bande bei ca. 39 kDa detektiert. Die Spuren 2 bis 5 zeigen eine Ca²⁺-abhängige (25 μM CaCl₂) Koimmunopräzipitation: Spur 2 (beads, -, pMmC1, Ca²⁺) ist eine Kontroll-Präzipitation ohne Lysat, Spur 3 (beads, retina, -, Ca²⁺) zeigt eine Kontrolle mit Rinderretinalysat aber ohne Ab, Spur 4 (beads, retina, pMmC1, Ca²⁺) und 5 (beads, retina, pMmC1, EGTA) analysieren die Koimmunopräzipitation, mit dem Unterschied, dass in der Koimmunopräzipitation in Spur 4 Ca²⁺ zugegeben wurde und in Spur 5 EGTA (1 mM). G_tα koimmunopräzipitiert bei dem Antikörper gegen MmCen1p an Ca²⁺-aktiviertem Centrin (Spur 4). Reduziert man die Menge an freiem Ca²⁺ mit EGTA, so verschlechtert man die Koimmunopräzipitation deutlich (Spur 5).

In Spur 4 zeigte sich eine Koimmunopräzipitation von $G_t\alpha$ mit Centrin. In Spur 5 konnte eine drastische Verminderung der Transducin-Bindung an Centrin festgestellt werden. Das gleiche Ergebnis konnte auch mit dem Ab gegen $G_t\beta$ validiert werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass beide Untereinheiten ($G_t\alpha$ und $G_t\beta$) oder das gesamte heterotrimere G-Protein Transducin mit Ca^{2+} -aktiviertem Centrin interagiert. Leider konnten wir in den vorangegangenen Experimenten nicht genau analysieren, welche der drei übrigen Isoformen von Centrin (Centrin 2 bis 4) noch an der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion mit Transducin beteiligt sind, weil die Centrin-Antikörper, die verwendet wurden, nicht zwischen den Isoformen diskriminierten.

Um zu unterscheiden, welche der Centrin-Isoformen mit welchen Untereinheiten von Transducin Ca^{2+} -abhängig interagieren, wurden weitere Interaktionsexperimente mit den rekombinanten Glutathion S-Transferase (GST)-Centrin Fusionsproteinen 1 bis 4 durchgeführt. Die so genannten „*Pull-down Assays*“ mit Rinderretinaextrakten und mit aufgereinigten $G_t\alpha$ und $G_t\beta\gamma$ Untereinheiten aus Rinderretinae trugen zur Validierung der Ergebnisse bei (Abb. 4.23).

Die aufgereinigten Untereinheiten aus der Rinderretina wurden von dem Labor unseres Kooperationspartners Prof. K. P. Hofmann (Charité, Berlin) für diese Experimente zur Verfügung gestellt. In diesem Set an GST-„*Pull-down*“ Experimenten wurde mit den unterschiedlichen Centrin-Isoformen gearbeitet. Die GST-Maus-Centrin-Isoformen wurden an „*Beads*“ immobilisiert und mit Rinderretinaextrakten inkubiert. Später wurden die GST-Fusionsproteine und an ihnen gebundene Proteine von den Glutathion-Sepharose-„*Beads*“ eluiert und die Proteine mittels SDS-PAGE und Western Blot Analysen ausgewertet.

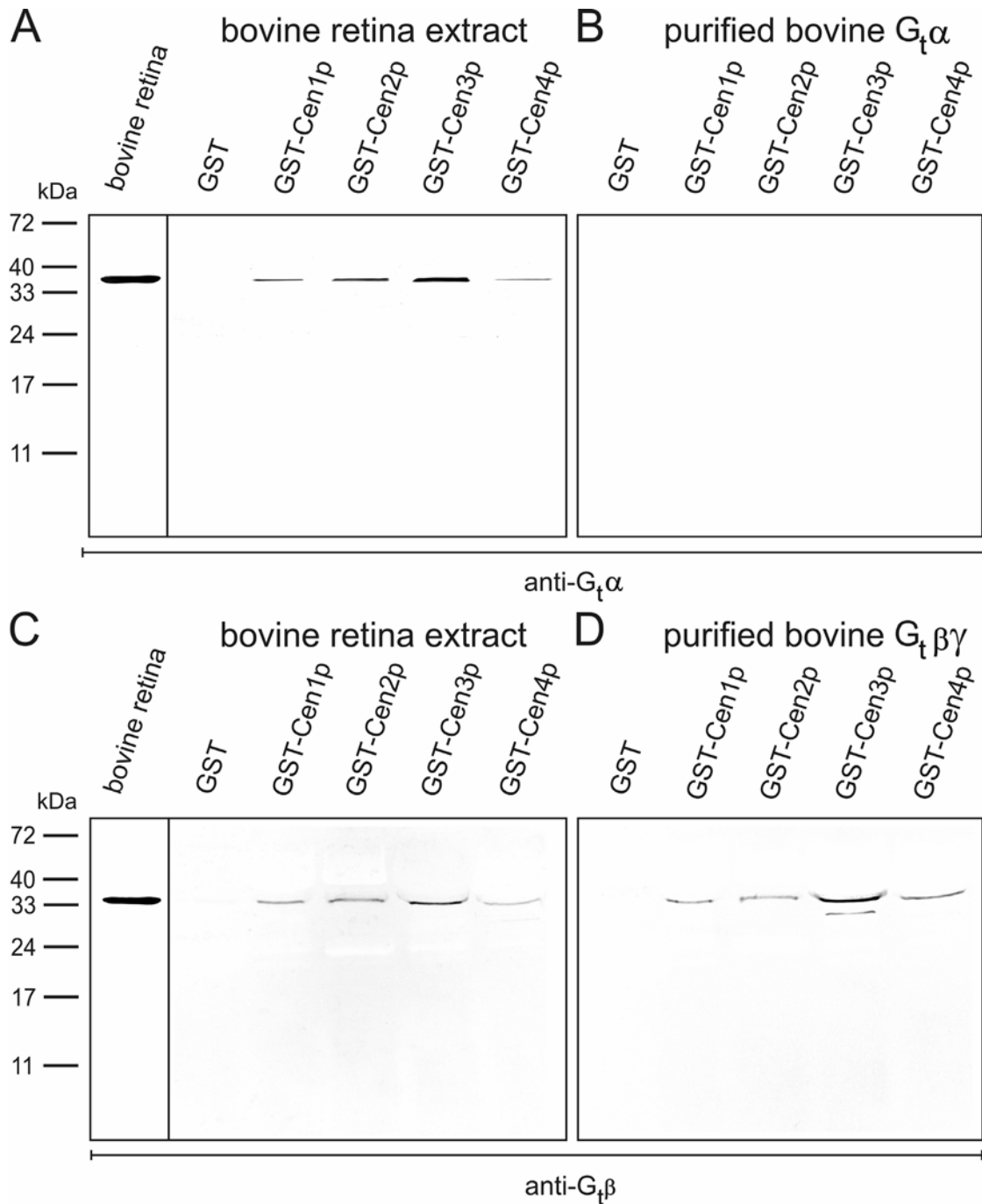


Abbildung 4.23 GST-Centrin „Pull-down Assays“ von Transducin

GST-Fusionsproteine von Maus-Centrin 1 bis 4 wurden mit Rinderretinaextrakt (A, C) und mit biochemisch aufgereinigten Untereinheiten von Transducin $G_t\alpha$ und $G_t\beta\gamma$ (Interaktionspuffer 10 mM CaCl_2) inkubiert (B, D). Das „Pull-down Assay“ wird mit Ab gegen $G_t\alpha$ (A, B) und gegen $G_t\beta$ analysiert. In Rinderretinaextrakten detektieren die Antikörper spezifische Banden für die G-Protein Untereinheiten (bovine retina, Spur 1 in (A, C)). Keiner der Kontrollversuche zeigt eine Interaktion zwischen den Transducin Untereinheiten und GST alleine. **(A)** Alle GST-Centrin Fusionsproteine interagieren mit $G_t\alpha$ aus dem Rinderretinaextrakt, aber keine mit dem aufgereinigten $G_t\alpha$ **(B)**. **(C)** Alle GST-Centrin Fusionsproteine interagieren sowohl mit $G_t\beta$ aus dem Rinderretinaextrakt als auch mit dem aufgereinigten heterodimeren $G_t\beta\gamma$ **(D)**. Diese Ergebnisse zeigen, dass alle vier Centrin-Isoformen sowohl mit dem heterotrimeren G_t -holo Protein aus dem Extrakt als auch mit dem aufgereinigten $G_t\beta\gamma$ -Komplex und nicht mit $G_t\alpha$ alleine interagieren.

Die Western Blot Analysen der GST-„Pull-down Assays“ mit den Antikörpern gegen $G_t\alpha$ und $G_t\beta$ zeigten, dass natives Transducin (G_t -*holo*), welches in den Retinalysaten vorhanden war, spezifisch mit allen vier Centrin-Isoformen interagiert, aber nicht mit GST alleine [Abb. 4.23 (A, C)]. Um die Untereinheit von Transducin zu identifizieren, welche mit den Centrinen interagiert, wurden die gleichen Versuchsansätze mit aufgereinigtem (aus Rinderretina Außensegmenten) $G_t\alpha$ und $G_t\beta\gamma$ unternommen. Alle GST-Centrin-Isoformen kopräzipitierten nur die nicht-dissoziierbare $G_t\beta\gamma$ Untereinheiten. $G_t\alpha$ konnte in keiner der „Pull-down Assays“ in Western Blot Analysen nachgewiesen werden [Abb. 4.23 (B, D)].

Zusammenfassend zeigten die Experimente, dass alle Centrin-Isoformen im Ca^{2+} -aktivierten Zustand sowohl mit dem isolierten heterodimeren $G_t\beta\gamma$ als auch dem heterotrimeren G_t -*holo* ($G_t\alpha\beta\gamma$) interagierten. Zum ersten Mal konnte eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion zwischen einem Cytoskelettprotein (Centrin) und einem Protein der Signaltransduktionskaskade in der Retina nachgewiesen werden.

Weiterführende Experimente unserer Kooperationspartner im Labor der AG Hofmann am Institut für medizinische Physik und Biophysik in Berlin (Charité) bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit mit verschiedenen anderen Interaktions-„Assays“. Alle Versuche wurden mit den Klonen durchgeführt, die während der vorliegenden Arbeit hergestellt wurden. Es konnten die Interaktionen zwischen Transducin und den Ca^{2+} -aktivierten Centrin-Isoformen mittels Zentrifugations-Experimenten, „Size-Exclusion“-Chromatographien und „Light-Scattering“-Experimenten (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b) nachgewiesen werden.

In den Zentrifugations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass MmCen1p mit Transducin (*holo*) Ca^{2+} -abhängig einen Komplex bildete, der wiederum mit Rhodopsin in den „Disk“-Membranen interagiert und so bei Ultrazentrifugationen im Pellet zu finden war (Pulvermüller *et al.*, 2002). In den „Size-Exclusion“-Chromatographie-Experimenten werden Proteine nach ihrer Größe (Durchlaufgeschwindigkeit) in einer Matrix aufgetrennt. Werden verschiedene Proteine zusammen vor der Chromatographie inkubiert und bilden diese einen Komplex, dissoziiert dieser während der Chromatographie nicht. Nach dem Lauf über die Chromatographie-Säule ist dieser Komplex an dem höheren Molekulargewicht bzw. an der niedrigeren Durchlaufgeschwindigkeit zu erkennen. Weiterhin können die Proben mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen werden. So wurden alle rekombinanten Centrin-Isoformen mit $G_t\alpha$, $G_t\beta\gamma$ und dem G_t -*holo* inkubiert und über die Säule aufgetrennt. Auch dieses Experiment zeigt, dass alle Centrin-

Isoformen mit $G_i\beta\gamma$ und G_i -*holo* Ca^{2+} -abhängig interagierten (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a). In „*Kinetic-Light-Scattering*“-Experimenten, die die Bindung von Centrin- $G_i\beta\gamma$ und dem Centrin- G_i -*holo* an Rhodopsin durch Lichtaktivierung zeigten, konnten zusätzlich Aussagen über die Bindungsaffinität der Centrine zu Transducin gemacht werden. Dabei stellte sich heraus, dass Centrin 3 die geringste Affinität zu Transducin besitzt. Weiterhin konnten weitere Ca^{2+} -abhängige Interaktionen von Centrin mit anderen Proteinen der Signaltransduktionskaskade (Arrestin und Rhodopsinkinase) ausgeschlossen werden. Zudem wurde Calmodulin noch als möglicher Bindungspartner von Transducin getestet. Calmodulin zeigte aber eine wesentlich geringere Affinität zu Transducin als z.B. Centrin 3 und wird deshalb als Wechselwirkungspartner ausgeschlossen (Pulvermüller *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b).

Übereinstimmend zeigten alle Experimente folgende zusammengefassten Ergebnisse:

- Alle vier Centrin-Isoformen interagieren mit Transducin, wobei die Isoform Centrin 3 die geringste Affinität zu Transducin zeigt (Gießl *et al.*, 2004a).
- Die Centrine binden sowohl an das isolierte $G_i\beta\gamma$ -Heterodimer als auch an den heterotrimeren G_i -*holo*-Proteinkomplex, nicht aber an $G_i\alpha$.
- Die Assemblierung der Centrin/ G -Protein-Komplexe ist strikt Ca^{2+} -abhängig.
- Andere Proteine der visuellen Signaltransduktionskaskade (z.B. Arrestin) interagieren nicht mit Centrin (Gießl *et al.*, 2004b).

Um Aussagen über das Kompartiment treffen zu können, wo Centrine und Transducin interagieren, bzw. wo sie in der Säugerretina kolokalisiert sind, wurden verschiedene Experimente mit verschiedenen Antikörpern mit immunofluoreszenzmikroskopischen- und immunoelektronenmikroskopischen Methoden durchgeführt.

4.5. Subzelluläre Lokalisation von Centrin und Transducin

Transducin (G_t) ist das gewebespezifische G-Protein der visuellen Signaltransduktionskaskade der Photorezeptoren von Vertebraten. Um eine genaue Lokalisation und Verteilung von Transducin in der Säugerretina zu untersuchen, wurden Mäuse 12 h hell- und dunkel-adaptiert, die Augenbecher präpariert und Kryostatschnitte hergestellt. Diese Schnitte wurden mit Antikörpern gegen Centrin [pan-Centrin (clone 20H5)] und Antikörpern gegen α - und β -Transducin inkubiert und mikroskopisch analysiert.

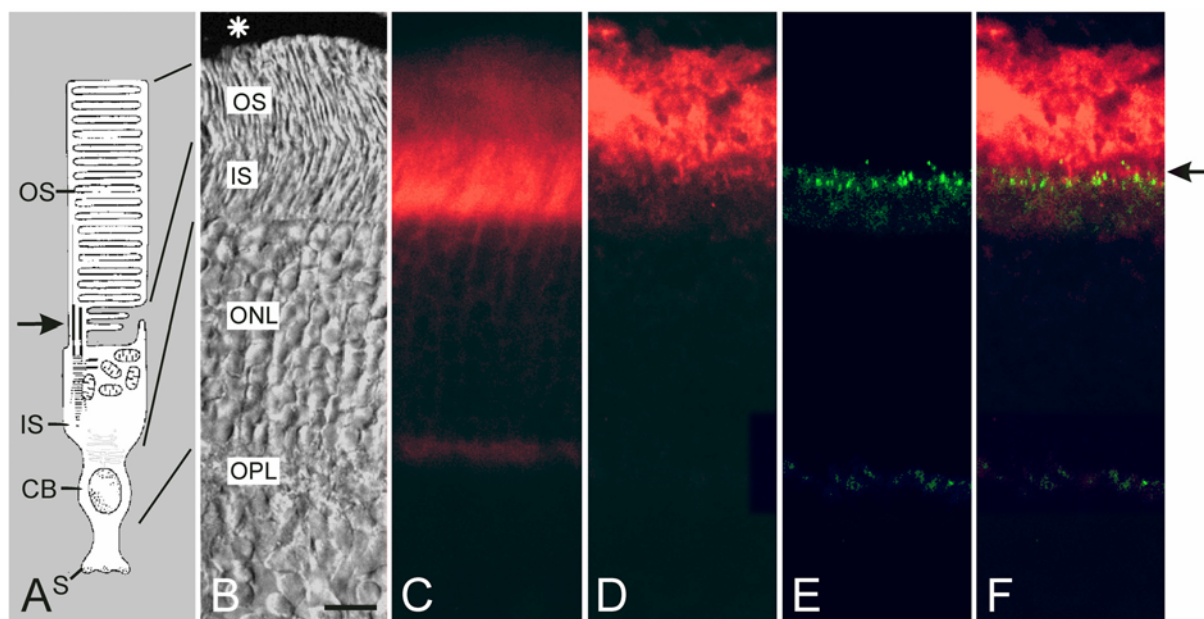


Abbildung 4.24 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse der lichtstimulierten

Translokation von $G_t\alpha$ auf Kryostatschnitten von Mäuseretinae

(A) zeigt die schematische Darstellung einer Stäbchen Photorezeptorzelle. Vertebraten Photorezeptorzellen sind in unterschiedliche Kompartimente aufgeteilt: Das photosensitive Außensegment (OS) mit den „Disk“-Membranen; das Innensegment (IS), welches die biosynthetische Maschinerie enthält; der Zellkern (CB), der sich in der äußeren Körnerschicht [ONL in (B)] befindet; und der synaptische Bereich (S), der sich in der äußeren plexiformen Schicht [OPL in (B)] befindet. Der Pfeil zeigt das Verbindungscilium, welches das Außensegment mit dem Innensegment verbindet. (B) Differenzielle Interferenzaufnahme eines longitudinalen Schnittes durch eine hell-adaptierte Mausretina. Der Stern markiert das retinale Pigmentepithel. (C) Indirekte Anti- $G_t\alpha$ Immunfluoreszenzaufnahme von dem Kryoschnitt in (B) durch die hell-adaptierte Mausretina. Die rote Markierung zeigt, dass $G_t\alpha$ hauptsächlich im Innensegment lokalisiert ist. (D bis F) zeigen indirekte Immunfluoreszenz Doppeltmarkierungen von $G_t\alpha$ und Centrin [pan-Centrin (clone 29H5)] auf Kryoschnitten dunkel-adaptierter Mausretinae. (D) Die rote Anti- $G_t\alpha$ Markierung zeigt $G_t\alpha$ hauptsächlich im Außensegment von dunkel-adaptierten Mäuseretinae. (E) Die grüne Anti-Centrin Immunfluoreszenz markiert das Verbindungscilium zwischen dem Innen- und Außensegment. (F) zeigt eine Überlagerung der Bilder (D) und (E), in der eine Kolokalisation von Transducin und Centrin im Bereich des Verbindungsciliums

verdeutlicht wird. Transducin ist bei hell-adaptierten Säugerretinae im Innensegment und bei dunkel-adaptierten Retinae im Außensegment zu finden.

Größenbalken (B): 10 μm .

Wird die Verteilung von Transducin in hell- und dunkel-adaptierten Retinae verglichen, so erfolgt eine lichtabhängige Translokation von Transducin vom Außen- ins Innensegment der Photorezeptorzellen (Abb. 4.24). In dunkel-adaptierten Photorezeptorzellen von Stäbchen ist G_t hauptsächlich im Außensegment, dem Ort der Signaltransduktionskaskade, konzentriert, während in hell-adaptierten Photorezeptoren ein Großteil der Proteine sich ins Innensegment, den Ort der Proteinbiosynthese, bewegt. In anderen Publikationen war dieses Phänomen Anstoß zu einigen Untersuchungen (Brann und Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Organisciak *et al.*, 1991; Pulvermüller *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b). Lichtinduzierte Bewegungen von cytoplasmatischen Komponenten zwischen den Photorezeptorsegmenten sind bereits von anderen Photorezeptor-spezifischen Proteinen, z.B. Arrestin (Broekhuysen *et al.*, 1985; Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Mangini und Pepperberg, 1988) bekannt.

Allerdings konnte nie genau festgestellt werden, in welchem Kompartiment und mit welchem Mechanismus Transducin vom Innen- ins Außensegment und umgekehrt transportiert wird. Elektronenmikroskopische Immunogold-Analysen mit Antikörpern von $G_t\alpha$ und $G_t\beta$ sollten in weiteren Experimenten Aufschluss über diesen Transport geben.

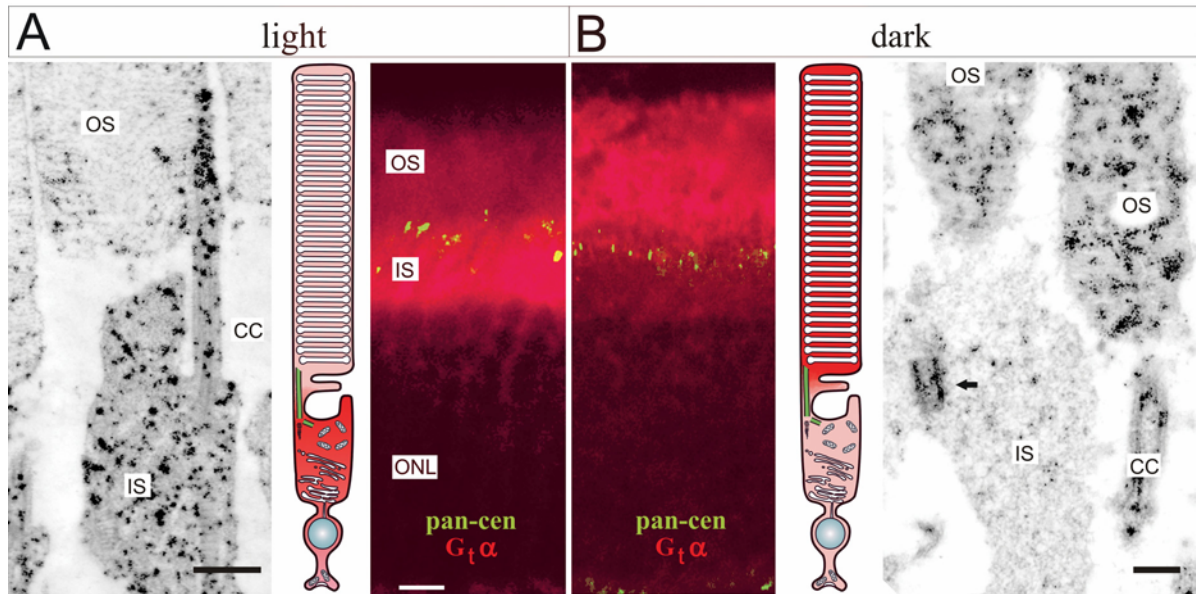


Abbildung 4.25 Vergleich der lichtstimulierten Translokation von Transducin in elektronenmikroskopischen Aufnahmen und Immunfluoreszenzanalysen in Mäuseretinae

(A, B) Subzelluläre Lokalisation von Transducin und Centrin in hell- und dunkel-adaptierten Mäuseretinae. Immunlokalisation von $G_t\alpha$ und Centrin [pan-Centrin (clone 20H5), der alle Isoformen detektiert], in hell („light“)- und dunkel („dark“)-adaptierten Maus Photorezeptorzellen mittels roter und grüner Immunfluoreszenz (A rechts, B links) und silberverstärkte immunoelktrooptische Lokalisation von $G_t\beta$ (Ab T-20) (A links, B rechts). Schema der Verteilungen von G_t (rot) und Centrin (grün) in hell- und dunkel-adaptierten Vertebraten Stäbchen (A Mitte, B Mitte). (A) Nach 12stündiger Lichtadaption wird G_t überwiegend im inneren Segment (IS), der äußeren Körnerschicht (ONL), welche die Zellkerne beinhaltet, bis zu den Synapsen der äußeren plexiformen Schicht lokalisiert. Nur wenig Immunomarkierung von Transducin zeigt das äußere Segment (OS). Die silberverstärkten Goldpartikel zeigen eine Markierung hauptsächlich im IS und Anhäufung im Verbindungscilium (CC), welches das IS mit dem OS verbindet. (B) In dunkel-adaptierten Photorezeptorzellen ist G_t hauptsächlich im OS lokalisiert. Das CC ist nicht so stark gefärbt und im IS erkennt man nur eine Markierung an der Centriole des Basalkörpers (Pfeil). Die grüne indirekte Immunfluoreszenz lokalisiert Centrin in (A und B) im CC und am Basalkörper der Photorezeptorzelle und ist mit G_t kolokalisiert. Größenbalken: (A links): 0,5 μm ; (A rechts, B links): 10 μm ; (B rechts) 0,3 μm .

Zum ersten Mal konnte eine lichtinduzierte Translokation von Transducin in der Mausretina auf subzellulärer Ebene gezeigt werden.

In Kontrollenexperimenten für die Hell- und Dunkel-Adaption wurden in parallelen Gefrierschnitten von Mäuseretinae indirekte Immunfluoreszenzanalysen mit Antikörpern gegen Arrestin durchgeführt. Eine gegensätzliche lichtinduzierte Translokationsbewegung von Arrestin zu Transducin ist in vielen Publikationen schon dargestellt worden (Broekhuysen *et al.*, 1985; Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Mangini und Pepperberg, 1988; Mendez *et al.*, 2003) und konnte auch hier in den Kontrollen bestätigt

werden (Abb. 8.2). Durch diese Arrestin-Analysen wurde nochmals die Hell- und Dunkel-Adaption der Mäuseretinae bestätigt.

Lichtinduzierte Bewegungen cytoplasmatischer Komponenten zwischen den Photorezeptorsegmenten müssen durch oder am Verbindungscilium der Photorezeptorzelle entlang stattfinden, weil dies die einzige intrazelluläre Verbindung zwischen dem Innen- und dem Außensegment darstellt. Doppelmarkierungen mit indirekter Immunfluoreszenz von Transducin mit Centrin zeigten eine signifikante Kollokalisierung von beiden Proteinen in der Verbindungsstelle zwischen Innen- und Außensegment (Abb. 4.24 und Abb. 4.25). Um eine präzise subzelluläre Lokalisation von Transducin und Centrin im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen zu bekommen, wurden longitudinale und transversale Ultradünnschnitte von Rattenretinae angefertigt. Diese wurden mit Antikörpern gegen Transducin und Centrin inkubiert, silberverstärkt, elektronenmikroskopisch analysiert und die Markierungen anschließend quantitativ ausgezählt.

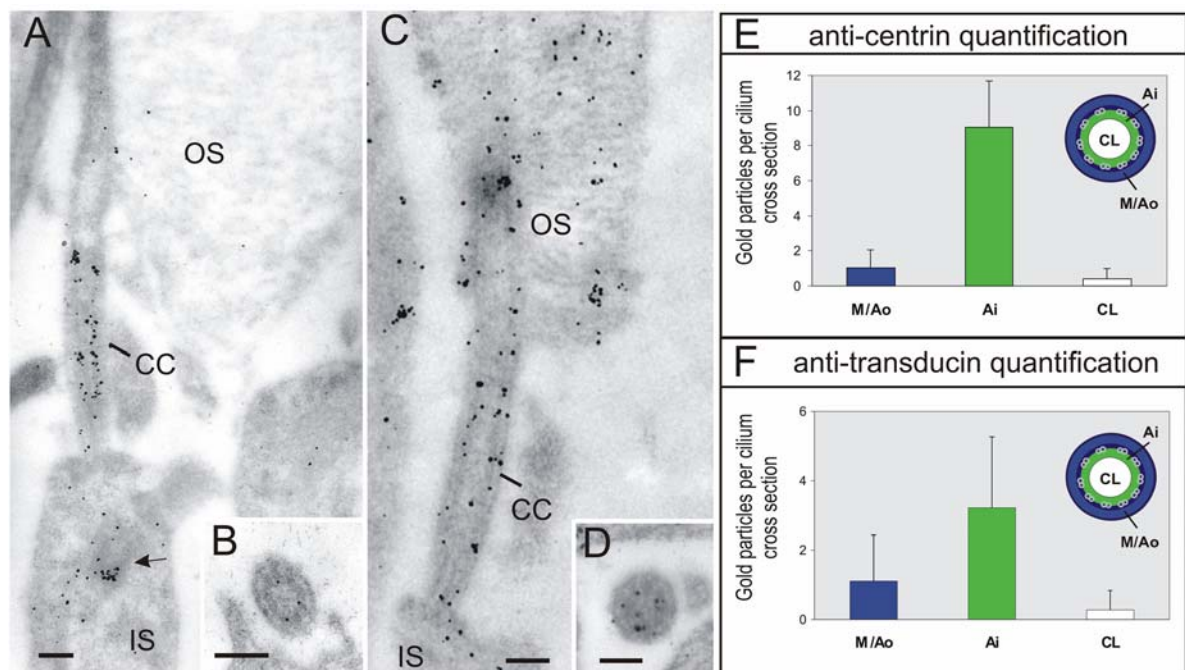


Abbildung 4.26 Immunoelektronenmikroskopische Kollokalisierung von Transducin und Centrin im gleichen Kompartiment des Verbindungsciliums in einer Stäbchen Photorezeptorzelle

(A) Längsschnitt durch eine Stäbchen Photorezeptorzelle einer Ratte, immunomarkiert mit dem mAb pan-Centrin (clone 20H5). Silberverstärkte Immunogold-Markierungen sind ausschließlich im Verbindungscilium (CC) und im Basalkörper (Pfeil) im Innensegment (IS) des Photorezeptors zu finden. (B) Ein Querschnitt durch das Cilium zeigt eine Lokalisation von Centrin in der subciliären Domäne zwischen dem ciliären Lumen und den axonemalen Mikrotubuli-Paarring. (C) Silberverstärkte Immunogold-Markierungen von G_{α} in einem Longitudinalschnitt einer dunkel-adaptierten Ratte

Stäbchen Photorezeptorzelle. Die G_{α} Markierung ist zum größten Teil im Außensegment (OS) zu finden, aber auch im ciliären Lumen des Verbindungsciliums. **(D)** Der Querschnitt durch ein Cilium zeigt, dass G_{α} auch in der zentralen subciliären Domäne lokalisiert ist. **(E)** Durchschnittliche Quantifikation von silberverstärkten Goldpartikel einer Anti-Centrin Immunomarkierung von 20 Querschnitten eines Verbindungsciliums. Das Histogramm zeigt eine signifikante Anreicherung der Centrin-Markierung an der inneren Oberfläche der axonemalen Mikrotubuli-Paarringe. **(F)** Quantifikation einer silberverstärkte Goldpartikel Immunomarkierung von Anti- G_{α} von 20 Querschnitten eines Verbindungsciliums. Das Histogramm zeigt die durchschnittliche Goldpartikelanzahl/Querschnitt. Bei der Quantifikation zeigt Anti- G_{α} eine signifikante Anhäufung der Goldpartikel an der inneren Oberfläche der axonemalen Mikrotubuli-Paarringe. Beide Proteine, Centrin sowie Transducin, sind zusammen im Verbindungscilium im gleichen subzellulären Kompartiment kolokalisiert. Abkürzungen der subciliären Domänen: Ai: Inneren Oberfläche der Axoneme; CL: Cilienlumen; M/Ao: Cilienmembran und Außenseite des Axonems. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (Abb. (A), (B) und (E) verändert nach Wolfrum, 1998). Größenbalken: (A): 150 nm; (B): 170 nm; (C, D): 120 nm.

Die quantitativen Auszählungen der Goldpartikel der Antikörper gegen Transducin und Centrin zeigten deutlich, dass Transducin und Centrin im gleichen Kompartiment des Verbindungsciliums kolokalisiert sind (Abb. 4.26). Genau dort, im inneren Lumen des Verbindungsciliums, könnten die Centrine und Transducin miteinander interagieren.

Centrin Markierungen auf elektronenmikroskopischem (EM) Niveau zeigten eine Lokalisation von Centrin an den Centriolen von Centrosomen (Daten nicht gezeigt) sowie am Basalkörper und im Verbindungscilium von Stäbchen und Zapfen aller bisher untersuchten Vertebraten (Wolfrum und Salisbury, 1995; 1998; Wolfrum, 1998; Pulvermüller *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b). Allerdings wurden die meisten Centrin Untersuchungen mit Antikörpern durchgeführt, die nicht zwischen den Centrin-Isoformen unterscheiden konnten. In dieser Arbeit wurden zum ersten Mal Antikörper hergestellt und verwendet, die zwischen den Centrin-Isoformen diskriminieren können. Diese zeigten, dass die Centrin-Isoformen 1, 2, 3 im Cilium, die Isoformen 2, 3, 4 im Basalkörper und nur 2, 3 in den Centriolen der Centrosomen lokalisiert sind. Die Kolokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 3 und Transducin in der gleichen Subdomäne des Verbindungsciliums, die beim Transport zwischen den Segmenten gezeigt wurde, weist darauf hin, dass Transducin bei der Passage durch das Verbindungscilium mit den Centrinen 1 bis 3 interagiert.

Diskussion

5. Diskussion

Centrine, die auch „Caltractine“ genannt werden, sind kleine, hoch konservierte Proteine der Parvalbumin Überfamilie von Ca^{2+} -bindenden Proteinen (Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995). Das erste Centrin wurde als Hauptkomponente der kontraktilen Flagellenwurzel der einzelligen Grünalge *Tetraselmis striata* beschrieben (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1984). Dort bildet Centrin Polymere aus, die Ca^{2+} -abhängig, aber ATP-unabhängig kontrahieren können. In Vertebraten wurden Centrine zunächst als ubiquitäre Komponenten der Centriolen von Basalkörpern und Centrosomen identifiziert (Salisbury, 1995; Schiebel und Bornens, 1995). Während niedere eukaryotische Organismen (Hefen und Algen) nur ein Centrin-Gen besitzen, konnten in Säugetieren bislang vier Centrin-Isoformen identifiziert werden. Diese vier Isoformen weisen geringe Sequenzunterschiede auf und wurden meist in Expressionsanalysen auf mRNA-Ebene in unterschiedlichen Geweben untersucht (Lee und Huang, 1993; Errabolu *et al.*, 1994; Middendorp *et al.*, 1997; Gavet *et al.*, 2003; Giebl *et al.*, 2004a). Da zur Analyse von Centrinen in Säugetierzellen in der Regel Antikörper gegen das Algen-Centrin aus *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet wurden, die aufgrund der hohen Konservierung der Centrine nicht zwischen den unterschiedlichen Centrin-Isoformen in Säugetieren diskriminieren, gibt es bislang nur sehr wenige verlässliche Informationen zur spezifischen Lokalisation und Funktion der einzelnen Centrin-Isoformen (Laoukili *et al.*, 2000; Gavet *et al.*, 2003). Überdies erschließt sich oftmals die Funktion eines Proteins erst aus der Wechselwirkung des Proteins zu weiteren zellulären Komponenten. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit mögliche Bindeproteine von Centrinen genauer untersucht. Aussagekräftige Interaktionspartner konnten bislang nur in Hefen mit dem Centrin 3-Hefe-Homolog Cdc31p und in *Xenopus* Oocyten mit dem *Xenopus* Centrin XlCenp aufgespürt werden (Biggins und Rose, 1994; Spang *et al.*, 1995; Uzawa *et al.*, 1995; Geier *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1998; Jaspersen *et al.*, 2002; Paoletti *et al.*, 2003; Kilmartin, 2003). Unter den Hefe-Interaktionspartnern konnte bis heute nur ein Säugetier-Homolog (hSfi1p)

identifiziert werden, welches auch in Säugerzellen die Bildung eines Centrin-enthaltenden Filamentsystems unterstützen könnte (Salisbury, 2004). Selbst Versuche mit humanen Centrinen in Hefe-Zwei-Hybrid „Screens“ erbrachten nur wenig aussagekräftige Ergebnisse (Paschke, 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Daten zur Expression und Lokalisation der vier Centrin-Isoformen in verschiedenen Geweben, speziell in der Retina, mit einer Vielzahl verschiedener biochemischer, zellbiologischer und molekularer Methoden zu gewinnen. Außerdem wurden im Zuge dieser Arbeit zum ersten Mal in der Säugetierretina Interaktionspartner, Interaktionsbedingungen und Regulationsmechanismen der unterschiedlichen Centrin-Isoformen 1 bis 4 untersucht, analysiert und in ihrer Bedeutung diskutiert.

5.1. Gewebsspezifische Expression der Centrin-Isoformen 1 bis 4

In vorangegangenen Arbeiten konnte Centrin als Element des Cytoskeletts ciliärer Sinneszellen von Evertebraten identifiziert werden (Wolfrum, 1991; Wolfrum, 1992; Wolfrum, 1997). Da zwischen den untersuchten Sinneszellen der Evertebraten und den ciliären Sinneszellen der Vertebraten umfangreiche strukturelle Übereinstimmungen bestehen (Wolfrum, 1992), wurden umfassende Untersuchungen durchgeführt und der Fragestellung nach der Verteilung der vier verschiedenen Centrin-Isoformen in Vertebraten anhand von Ratten- und Mäuseretinae nachgegangen.

Da in der Vergangenheit keine spezifischen Antikörper gegen die Centrin-Isoformen generiert werden konnten oder „angeblich spezifische“ Antikörper durch andere Labore nicht zur Verfügung gestellt wurden, mussten zur Untersuchung der Proteinexpression und der zellulären Lokalisation der vier verschiedenen Centrin-Proteine spezifische Antikörper hergestellt werden. Zuerst wurden verschiedene Centrin-Klone aus der Maus generiert, um die Centrin-Isoformen 2 bis 4 als rekombinant exprimierte Proteine herzustellen. Mit den verschiedenen rekombinant hergestellten Proteinen wurden Kaninchen immunisiert und polyklonale Antikörper gegen diese Proteine gewonnen. Die Untersuchungen der Centrine auf Proteinniveau gestalteten sich wegen der hohen Konservierung der Centrin-Isoformen als schwierig. Die Herstellung von Antikörpern, die zwischen allen vier Centrin-Isoformen diskriminieren (auch mit Peptid-Antikörpern), war auch schon eine Fragestellung in anderen Arbeiten (Wolfrum und Salisbury, 1998; Tassin *et al.*, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Gavet *et al.*, 2003). Die *Chlamydomonas*-Centrin-Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) und MC1

detektierten in Western Blot Analysen alle Vertebraten-Centrin-Isoformen gleich stark (Hart *et al.*, 2001) (Abb. 4.5). Eine spezifische Detektion der Centrin-Isoformen gelang zum ersten Mal in dieser Arbeit. Die affinitätsgereinigten Antikörper wurde (Abb. 4.6) mit rekombinant exprimierten Polypeptiden der jeweils anderen drei Centrin-Proteine präinkubiert und so die unspezifischen Antikörper aus dem Antikörperpool entfernt (Abb. 4.7).

Um unterschiedliche Expressionsmuster der vier Centrin-Isoformen in verschiedenen Geweben zu validieren, wurde sowohl auf die Methode der RT-PCR-Analyse als auch auf die spezifischen Antikörper zurückgegriffen, da die Bestätigung der spezifischen mRNA in Geweben noch keine Translation in das Protein garantiert. In vorangegangenen Arbeiten wurde die Expression der Centrin-Isoformen 1 bis 3 mit Hilfe von RT-PCR-Analysen in der Retina dargestellt (Wolfrum und Salisbury, 1998; Wolfrum *et al.*, 2002). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal der Nachweis der mRNA und der Proteine von allen vier Centrin-Isoformen mit Hilfe spezifischer Primer und Antikörper in verschiedenen Säugetierretinae (Rind, Ratte und Maus) erbracht werden (Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b). Sowohl bei den RT-PCR-Experimenten als auch in Western Blot Analysen mit den prä-adsorbierten Antikörpern konnten spezifische Banden der vier Centrin-Isoformen detektiert werden. Bei der durchgeführten RT-PCR-Analyse wurde in der Mausretina zusätzlich ein kürzeres DNA-Fragment amplifiziert. Vergleicht man die Länge der Fragmente, so handelt es sich dabei um eine Splicevariante (Mmsplice4A) von Centrin 4, die zuvor bereits in verschiedenen RT-PCR-Experimenten in Maus-Geweben (z.B. Niere und Lunge) beschrieben wurde (Gavet *et al.*, 2003). Der Antikörper gegen Centrin 4 detektierte in der Western Blot Analyse eines Rinderretinaextraktes ebenfalls zwei Banden. Eine Bande bei ca. 19 kDa, bei der es sich um das Centrin 4 *holo*-Protein handelte sowie eine Bande von ca. 15 kDa. Hierbei handelte es sich um die gleiche Splicevariante A (Mmsplice4Ap), die in den RT-PCR-Experimenten in der Mausretina schon detektiert wurde. In dieser vorliegenden Arbeit konnte die Splicevariante A zum ersten Mal in der Mäuseretina beschrieben und darüber hinaus deren Proteinexpression in Western Blot Analysen bestätigt werden. Zum ersten Mal konnte sowohl auf mRNA-Niveau als auch auf Proteinniveau gezeigt werden, dass alle vier Centrin-Isoformen in Säugerretinae exprimiert, also die mRNA-Informationen in Proteine translatiert werden.

In früheren Arbeiten wurde mit Hilfe von Northern Blot- und RT-PCR-Analysen bereits Gen-Expressionen von den Centrin-Isoformen 1 bis 4 durch den Nachweis der jeweiligen spezifischen mRNA in verschiedenen Geweben aus Maus, Ratte und Mensch untersucht (Wolfrum und Salisbury, 1998; LeDizet *et al.*, 1998; Wolfrum, 1998;

Hart *et al.*, 1999; Laoukili *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2001; Gavet *et al.*, 2003). In den vorausgegangenen Analysen wurde vor allem die Centrin 1 Expression kontrovers diskutiert. Während in Wolfrum und Salisbury (1998) und Laoukili *et al.* (2000) eine Expression von Centrin 1 in Cilien tragenden Zellen analysiert wurde, diskutierten Hart *et al.* (1999 und 2001) eine reine Testis-spezifische Expression der Centrin 1 Isoform in Vertebraten. Um die unterschiedliche Darstellung der Expression von Centrin 1 zu untersuchen und die Analysen der anderen drei Isoformen auf andere Gewebe auszuweiten, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in verschiedenen Geweben von Maus und Ratte analysiert. Die gewonnenen Ergebnisse weisen auf eine gewebsspezifische Expression der Isoformen hin. Dabei zeigte sich, dass die Expression der Centrin-Isoformen 1 und 4 auf Cilien tragende Zellen beschränkt ist, während Centrin 2 und 3 ubiquitär exprimiert werden (Tab. 4.1).

Die Centrin 1-Expression konnte mittels spezifischer Primer in Testis, Retina, Cochlea, Riechepithel und Gehirn von Maus und Ratte nachgewiesen werden, nicht aber in Leber, Skelett- und Herzmuskel. Die Expression in Testis, Retina, Cochlea, Riechepithel und Gehirn stimmt mit früheren Beobachtungen überein, nach denen Centrin 1 nur in Cilien tragenden Geweben exprimiert wird (Wolfrum und Salisbury, 1998; Wolfrum, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2002) und schließt eine reine Testis-spezifische Expression (Hart *et al.*, 1999; 2001) aus. In früheren Arbeiten an kultivierten Nasenschleimhautzellen konnte Centrin 1 mRNA nicht aus proliferierenden Zellen amplifiziert werden. Erst als sich die Zellen ausdifferenzierten und Cilien ausbildeten, konnten Centrin 1-Fragmente mittels RT-PCR dargestellt werden (Laoukili *et al.*, 2000). Seltene positive Ergebnisse in nicht-ciliären Geweben sind durch eine Amplifikation aus genomischer DNA zu erklären. Das Säuger-Gen für Centrin 1 (*Cetn1*) besitzt keine Introns. Der „*open reading frame*“ (ORF) wird nicht durch Stop-Codons unterbrochen und die kodierende Sequenz ist von direkten Wiederholungen flankiert (LeDizet *et al.*, 1998; Hart *et al.*, 1999; Laoukili *et al.*, 2000). *Cetn1* wird in der Literatur als Retroposon des Centrin 2-Genes *Cetn2* diskutiert (Hart *et al.*, 1999). *Cetn1* besitzt alle charakteristischen Eigenschaften eines Retroposons (Rogers, 1983; Vanin, 1985). Daher besteht zwischen dem Gen *Cetn1* und der daraus resultierenden mRNA kein struktureller Unterschied im Bereich der Proteintranslation (Abb. 1.6). Somit ist es möglich, dass die verwendeten spezifischen Centrin 1-Primer Bereiche sowohl aus der genomischen DNA als auch aus der mRNA hergestellten cDNA amplifizieren. Deshalb wurden in dieser Arbeit immer Kontrollen mit der totalen RNA und Centrin 1-Primern durchgeführt. Die in dieser Arbeit und in

vorangegangenen Publikationen erzielten Ergebnisse zeigten, dass Centrin 1 ausschließlich in ciliären Zellen exprimiert wird (Wolfrum und Salisbury, 1998; Wolfrum, 1998; Laoukili *et al.*, 2000) und stützen nicht die Hypothese einer Testis-spezifischen Expression von Centrin 1 (Hart *et al.*, 1999; 2001).

Die Expression von Centrin 2 konnte in allen getesteten Geweben von Maus und Ratte validiert werden. Frühere Arbeiten konnten bereits die Expression von Maus und Ratten Centrin 2 in allen bislang untersuchten Geweben zeigen (Wolfrum und Salisbury, 1998; Wolfrum, 1998; Hart *et al.*, 1999; Laoukili *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2001; Gavet *et al.*, 2003). Die erzielten Ergebnisse stehen somit im Einklang mit den bisherigen vorliegenden Publikationen, in denen eine ubiquitäre Expression der Centrin 2 Isoform sowohl in Maus und Ratte als auch im Menschen mittels RT-PCR-Analysen dargestellt wurde. Durch verschiedene Versuche von LeDizet *et al.* (1998) an Kulturen humaner Luftröhren-Epithelzellen konnte ein Anstieg der menschlichen Centrin 2 (HsCen2p) Expression während der Ciliogenese festgestellt werden.

Die Expression von Centrin 3 konnte in dieser Arbeit in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Centrin 3 gilt ebenso wie Centrin 2 als ubiquitär exprimiertes Protein (Middendorp *et al.*, 1997; Wolfrum *et al.*, 2002), da für beide Proteine eine Lokalisation und Funktion am Centrosom diskutiert wird (Paoletti *et al.*, 1996; Laoukili *et al.*, 2000; Salisbury *et al.*, 2002). Die bisherigen publizierten Ergebnisse der Centrin 3 Expression mittels RT-PCR beschränkten sich auf menschliche Epithelzellen (LeDizet *et al.*, 1998; Laoukili *et al.*, 2000), Testis der Maus sowie NIH 3T3 Maus-Fibroblasten (Hart *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen die bereits diskutierte ubiquitäre Expression von Centrin 3 in Maus und Ratte (Paoletti *et al.*, 1996; Giebl *et al.*, 2004a).

Zeitabhängige Unterschiede der Expression der Centrin-Isoformen 1 bis 3 wurden bislang nur in primären menschlichen nasalen Epithelzellenkulturen untersucht (Laoukili *et al.*, 2000). Allerdings konnte die Expression der Isoform Centrin 1 erst während der Ausdifferenzierung von Cilien der Zellen nachgewiesen werden, während man die Expression der Isoformen 2 und 3 während der Proliferation der Zellen nachweisen konnte und sich die Expression erst bei der Ausdifferenzierung der Zellen erhöhte. Angaben zu solchen unterschiedlichen Expressionen können allerdings in dieser Arbeit nicht gemacht werden, da es sich bei den untersuchten Mäusen und Ratten ausschließlich um adulte Tiere handelte.

Die Expression der Centrin-Isoform 4 konnte mittels RT-PCR-Analysen in verschiedenen ciliären Geweben von Maus und Ratte gezeigt werden, wohingegen in nicht-

ciliären Geweben der Nachweis einer Expression ausblieb. Während die Expression von Centrin 4 mittels RT-PCR in Mausgeweben bereits beschrieben wurde (Gavet *et al.*, 2003), konnte in dieser Arbeit zum ersten Mal die mRNA von Centrin 4 in Rattengeweben analysiert und gezeigt werden. Der hier erbrachte Nachweis der Centrin 4-Expression im Testis von Maus und Ratte widerspricht der Publikation von Gavet *et al.* (2003), die keine entsprechende Expression im Testis von Mäusen nachweisen konnten. Die Ergebnisse der Expression in Gehirn bestätigen die früheren Beobachtungen, dass Centrin 4 nur in ciliären Zellen exprimiert wird (Gavet *et al.*, 2003). In Skelett- und Herzmuskel konnte keine Centrin 4-Expression gefunden werden. Die hier erstmals beschriebene Centrin 4-Expression in der Retina und dem Riechepithel ist ein weiteres Indiz für die exklusive Expression in Cilien tragenden Zellen. Bei einigen durchgeführten RT-PCR-Analysen wurde für Centrin 4 in Ratte und Maus in verschiedenen Geweben zusätzlich ein kürzeres mRNA-Fragment, die Splicevariante Mmsplice4A, amplifiziert. Erstmals konnte die Expression dieser Splicevariante im Testis und im Riechepithel von Maus und Ratte nachgewiesen werden. In den Retinageweben von Ratte und Maus konnte die Splicevariante A nur bei der Maus amplifiziert werden (Abb. 4.1). Eine Maus spezifische Splicevariante kann aber ausgeschlossen werden, da diese Splicevariante in anderen Geweben der Ratte (Testis und Riechepithel) nachgewiesen werden konnte. Die Splicevariante B (Mmsplice4B), die in Gavet *et al.* (2003) beschrieben wurde, konnte aus keiner der behandelten Proben amplifiziert werden. Denkbar wäre eine entwicklungsabhängige Expression dieser Splicevarianten in den verschiedenen Geweben, in denen die Splicevarianten von Centrin 4 unterschiedliche Funktionen übernehmen könnten. Über die zellulären Funktionen von Centrin 4 kann zu diesem Zeitpunkt nur spekuliert werden. Es gibt Hinweise, dass Centrin 4 in die Entwicklung und Differenzierung ciliärer Zellen im Gehirn in den Epithelien um die verschiedenen Ventrikel und im Choroid Plexus involviert ist. Centrin 4 ist dort an den Basalkörpern Cilien tragender ependymaler und choroidaler Zellen konzentriert (Gavet *et al.*, 2003). Die Regulation des Centrin 4-Gens (*Cetn4*) wird im Gehirn möglicherweise durch den Transkriptionsfaktor HFH-4 kontrolliert (Blatt *et al.*, 1999; Brody *et al.*, 2000), dessen Expressionsmuster dem von Centrin 4 ähnelt (Gavet *et al.*, 2003). In einer früheren Arbeit über HFH-4 konnte eine DNA-Sequenz im Genom identifiziert werden, an welche dieser Transkriptionsfaktor binden konnte (Lim *et al.*, 1997). Interessanterweise konnte durch Sequenzanalysen von *Cetn4* diese Bindungsstelle für HFH-4 in der Nähe der Transkriptionsinitiationsstelle gezeigt werden (Gavet *et al.*, 2003). Werden die Gewebe der Retina und des Gehirns miteinander

verglichen, so fällt auf, dass ontogenetisch die Retina einem nach außen verlagerten Teil des Zwischenhirns (Diencephalon) entspricht. Das Vertebratenaug entsteht aus Ausstülpungen des Diencephalons, die als optische Vesikel bezeichnet werden. Diese optischen Vesikel stülpen sich ein und bilden den so genannten Augenbecher. Jetzt liegen zwei Epithelschichten übereinander. Die proximale Schicht bildet die Pigmentzellen, während das distale Epithel zur Retina ausdifferenziert. Ontogenetisch stammt das Epithel um die Gehirn-Ventrikel und die Retina dem gleichen Gewebe ab. Centrin 4 wurde, wie oben erwähnt, in den die Gehirn-Ventrikel umgebenden Epithelzellen in den Basalkörpern von Cilien nachgewiesen. Diese Lokalisation konnte in dem ontogenetisch gleich abstammenden Photorezeptorzellen am Basalkörper der Cilien in Abbildung 4.10 bestätigt werden.

Alle Isoform-Amplifikate wurden subkloniert und Sequenzanalysen unterzogen, um die Spezifität der Primer darzustellen. Bei Centrin 2 bis 4 ist es nicht möglich, die Centrine ohne Längenvergrößerungen aus genomischer DNA zu amplifizieren, weil die drei Gene aus je vier Introns und fünf Exons bestehen (Abb. 1.6) und somit strukturelle Unterschiede zur mRNA besitzen und die Primer über diesen Exon-Intron Grenzen lagen. Auffällig ist, dass die Verteilung der Exons und Introns von *Cetn2* und *Cetn4* genau gleich ist. Dies führt zu der Vermutung, dass *Cetn2* und *Cetn4* durch Duplikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden sind (Gavet *et al.*, 2003). Im Gegensatz aber zu Centrin 2 hat Centrin 4 eine spezifische ciliäre Gewebsexpression und besitzt zwei Splicevarianten (Gavet *et al.*, 2003), die für Centrin 2 nicht nachgewiesen werden konnten.

Das unterschiedliche Expressionsmuster auf mRNA-Ebene der Centrin-Isoformen zeigt deutlich, dass Centrin 2 und 3 ubiquitär exprimiert werden und Centrin 1 und 4 auf Geweben mit ciliären Zellen beschränkt sind. Daher ist zu vermuten, dass den einzelnen Isoformen eine andere zelluläre Funktion zukommt, die auch von den jeweiligen vorhandenen Interaktionspartnern in jedem Gewebe bestimmt wird. Die unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der vier Isoformen wird im Folgenden anhand der Retina diskutiert.

5.2. Unterschiedliche subzelluläre Lokalisation deutet auf unterschiedliche Funktionen der Centrin-Isoformen hin

Zur Eingrenzung der speziellen Funktion der Centrin-Isoformen ist nicht nur die Kenntnis über die Expression der Proteine notwendig, sondern vor allem Informationen zur Lokalisation in den subzellulären Kompartimenten der Zellen. Zur Untersuchung der

zellulären Lokalisation der Centrin-Proteine in der Retina wurden indirekte Immunofluoreszenz-Analysen mit dem monoklonalen *Chlamydomonas* Antikörper pan-Centrin (clone 20H5) und den polyklonalen prä-adsorbierten isoform-spezifischen Antikörpern auf longitudinalen Kryoschnitten von Maus und Ratte durchgeführt. Als Bezugspunkt wurde dabei γ -Tubulin Antikörper verwendet, der die Centriolen und die Basalkörper in Zellen markiert.

In diesen Untersuchungen detektierte der Antikörper pan-Centrin (clone 20H5), der nicht zwischen den Centrin-Isoformen der Säuger unterscheiden kann, das Verbindungscilium mit dem dazugehörigen Basalkörper zwischen dem Außen- und Innensegment in der Retina von Mäusen und Ratten (Abb. 4.9) sowie die Centrosomen in der inneren Körner- und in der Ganglionzellschicht (Wolfrum und Salisbury, 1995; Wolfrum und Salisbury, 1998; Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b), die in den Zellen der proximalen neuronalen Retina als „Punktepaare“ zu erkennen sind. Diese konnten durch Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen das centrosomale Protein γ -Tubulin als Centriolen identifiziert werden. Das modifizierte nicht-motile Verbindungscilium entspricht strukturell der verlängerten Übergangszone von Cilien (Besharse und Horst, 1990). Somit stimmt die Lokalisation der Centrine in dieser Struktur mit früheren Beobachtungen in Grünalgen und Säugern von Centrin in der Übergangszone motiler Cilien und in sensorischen Cilien des olfaktorischen Epithels überein (Laoukili *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2002).

Die „nur“ affinitätsaufgereinigten polyklonalen Centrin-Antikörper zeigten die gleiche Markierung wie der Antikörper pan-Centrin (clone 20H5), der alle Isoformen detektiert. Erst die Verwendung der prä-adsorbierten spezifischen Antikörper pMmC1 bis pMmC4 gegen die vier Isoformen zeigte, im Gegensatz zu den „nur“ affinitätsaufgereinigten Antikörpern, spezifische Markierungen in unterschiedlichen Kompartimenten der Photorezeptorzelle. Indirekte Immunofluoreszenz zeigte Markierungen mit pMmC1 im Verbindungscilium, nicht aber im Basalkörper der Photorezeptorzelle oder an den Centrosomen der Retina. Centrin 1 Lokalisation in Mäuse- und Rattenretinae ist also rein auf das Verbindungscilium beschränkt. Im Gegensatz dazu zeigten pMmC2 und pMmC3 Lokalisationen im Verbindungscilium, im Basalkörper der Photorezeptorzellen und in den Centrosomen der Retinaschichten. Der prä-adsorbierte Antikörper pMmC4 zeigte dagegen eine Färbung im Basalkörper des Verbindungsciliums, nicht aber im Verbindungscilium selber oder in den Centrosomen. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass alle

Centrin-Isoformen in ein und derselben Zelle koexprimiert werden, aber in den subzellulären Bereichen nur partiell kolokalisiert sind (Abb. 5.2).

Um die Expression der Centrin-Isoformen in den Centrosomen zu validieren, wurden die prä-adsorbierten Antikörper gegen die Isoformen 1 bis 4 auf HeLa-Zellen verwendet (Abb. 4.12). HeLa-Zellen waren schon oft Untersuchungsobjekte von Centrin in verschiedenen Publikationen (Paoletti *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997; Middendorp *et al.*, 2000; White *et al.*, 2000; Hart *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2002). Dabei wurde festgestellt, dass Centrin 2 und 3 in dem distalen Lumen der Centriolen der Centrosomen und in den Verläufercentriolen lokalisiert sind (Paoletti *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1999). Die wichtigen Funktionen der zwei Centrine in der Centrosomenduplikation im Zellzyklus konnte in verschiedenen Zelltypen gezeigt werden (Middendorp *et al.*, 2000; Salisbury *et al.*, 2002). Darüber hinaus konnte durch „Gene-silencing“ der Centrin 2-Expression in HeLa-Zellen mittels RNA „interference“ (RNAi) die Centriolenduplikation inhibiert werden und so Defekte im Zellzyklus nachgewiesen werden (Salisbury *et al.*, 2002). In Publikationen durchgeführte Transfektionen mit GFP-Centrin 2, 3 und 4 zeigten eine Lokalisation des GFP-Fusionsproteins am distalen Lumen von Centriolen (Paoletti *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 1997; Piel *et al.*, 2000; Gavet *et al.*, 2003). Diese centrosomale Lokalisation konnte im Laufe der vorliegenden Arbeit bei Transfektionen von GFP-Centrinproteinen in HeLa-Zellen bestätigt werden (z.B. Abb. 5.1).

Untersuchungen in Gavet *et al.* (2003) zeigten, dass für die Lokalisation am Centrosom von Centrin 2 und 3 das C-terminale Ende verantwortlich ist, während für Centrin 4 sowohl der N-terminale als auch der C-terminale Bereich für die gleiche Lokalisation benötigt werden. Der Antikörper gegen das *Chlamydomonas*-Centrin pan-Centrin (clone 20H5) wurde schon in früheren Arbeiten als centrosomaler Marker verwendet (Salisbury *et al.*, 1988; Baron und Salisbury, 1991; Baron *et al.*, 1992). Da der Antikörper alle Isoformen detektiert, konnten keine Aussagen über verschiedene Lokalisationen von Centrin-Isoformen an den Centrosomen getroffen werden (Abb. 4.5). Nur RT-PCR-Experimente von NIH 3T3 Maus-Fibroblasten zeigten mRNA Expression von Centrin 2 und 3 in der nicht ciliären Zelllinie. Zum ersten Mal wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische Antikörper, die zwischen den Isoformen Centrin 1 bis 4 diskriminieren, verwendet, um eine Expression und Lokalisation der Proteine in HeLa-Zellen aufzuzeigen (Abb. 4.12). Dabei konnte eindeutig gezeigt werden, dass nur die Centrin-Isoformen 2 und 3 in HeLa-Zellen exprimiert werden und dort am Centrosom lokalisiert sind (Abb. 5.2).

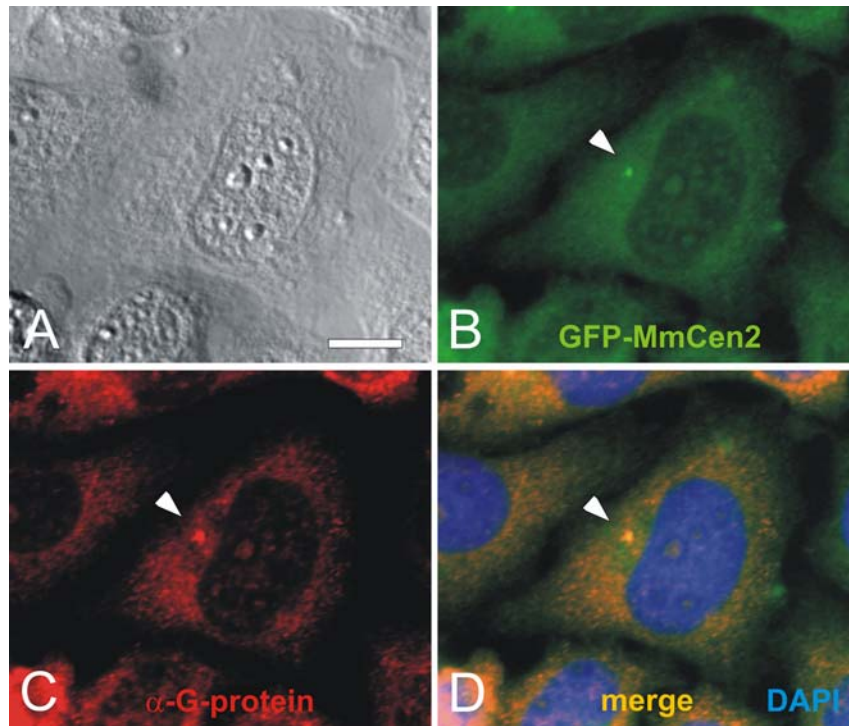


Abbildung 5.1 Transfektion von HeLa-Zellen mit GFP-MmCen2 und indirekte Immunfluoreszenz mit β -G-Protein-Antikörpern

Kolokalisierung von GFP-MmCen2p und β -G-Protein am Centrosom in transfizierten HeLa-Zellen. **(A)** Differenzielle Interferenzkontrast-Aufnahme der HeLa-Zellen. **(B)** Fluoreszenzmikroskopische Markierung von GFP-MmCen2p am Centrosom (Pfeilspitze) von transfizierten HeLa-Zellen. **(C)** Indirekte Immunfluoreszenz mit dem Antikörper T-20 gegen die β -Untereinheiten von G-Proteinen zeigt eine Markierung am Centrosom (Pfeilspitze). **(D)** Überlagerungsbild von (B) und (C). Es zeigt deutlich, dass auch heterotrimere G-Proteine am Centrosom lokalisiert sind.
Größenbalken: (A): 6,5 μ m

Diese Aussage wurde nochmals mit einem spezifischen Antikörper gegen humanes Centrin 2 (HsCetn2.4) überprüft, der sowohl in Western Blot Analysen als auch in allen Immunfluoreszenzen die gleichen Markierungen wie der in dieser Arbeit hergestellte Antikörper gegen MmCen2p zeigte (Abb. 8.3 und 8.5, Anhang). Diskutiert wurde auch schon immer eine unterschiedliche Lokalisation der Isoformen 2 und 3 am Centrosom. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Centrin 2 nur im distalen Lumen der Centriolen lokalisiert ist, während Centrin 3 zusätzlich ein Bestandteil des pericentriolären Materials (PCM) darstellt, welches die Centriolen umgibt (Baron *et al.*, 1992; Laoukili *et al.*, 2000; D'Assoro *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2002). Über diese Hinweise kann in dieser Arbeit nur spekuliert werden, da in den Immunfluoreszenzen keine Unterschiede zwischen den Antikörpern von Centrin 2 und 3 zu erkennen waren. Die unterschiedlichen diskutierten Lokalisationen von Centrin 2 und 3 an Centrosomen deuten auf verschiedene Funktionen hin. Während Centrin 3 in die Reproduktion und Duplikation

der Centrosomen involviert ist (Middendorp *et al.*, 2000), spielt Centrin 2 möglicherweise bei der Trennung der Centriolen vor der Duplikation der Centrosomen eine Rolle (Lutz *et al.*, 2001; Salisbury *et al.*, 2002). Alle diskutierten Ergebnisse der Lokalisationen von Centrin 1, 2 und 3 im Cilium von Photorezeptorzellen und Centrin 2, 3 und 4 am Basalkörper sowie die Konzentration von Centrin 2 und 3 an Centrosomen sind in einer Schemazeichnung (Abb. 5.2) zusammengefasst.

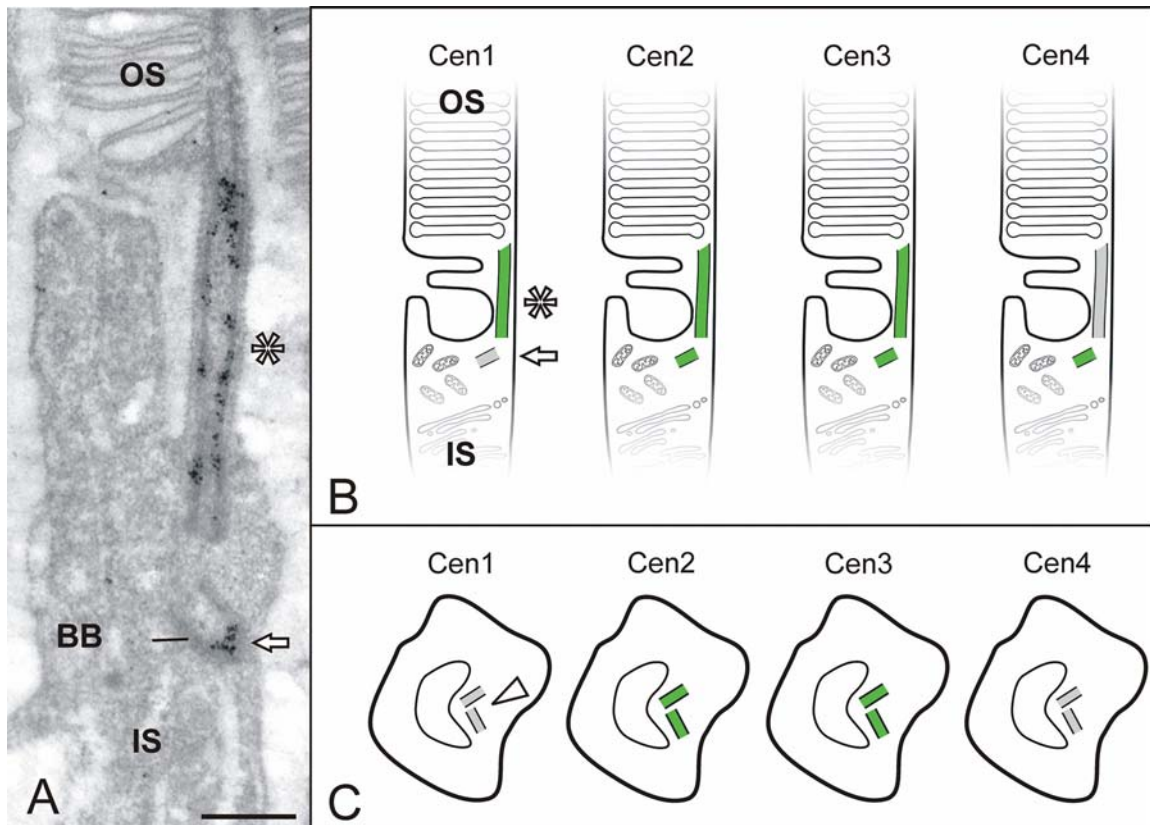


Abbildung 5.2 Schematische Illustration der unterschiedlichen Lokalisation der Centrin-Isoformen 1 bis 4 in spezialisierten Photorezeptorzellen und in nicht-spezialisierten eukaryotischen Zellen.

(A) Subzelluläre silberverstärkte immunoelektronenoptische Lokalisation von Centrin 3 in einem ultradünnen Längsschnitt durch die Photorezeptorzelle einer Maus mit dem prä-adsorbierten Antikörper pMmC3. Centrin 3 ist in der inneren Oberfläche der Axonema im Verbindungscilium (Stern) zwischen dem Innen- (IS) und dem Außensegment (OS) der Photorezeptorzelle lokalisiert. Außerdem zeigt sich noch eine Markierung an der Centriole des Basalkörpers (BB) des Verbindungsciliums (Pfeil). (B) Schematische Illustration der unterschiedlichen Lokalisation der vier verschiedenen Isoformen von Centrin (Cen1 bis 4) in einer spezialisierten Photorezeptorzelle. Centrin 1 bis 3 sind im Verbindungscilium gebunden (Stern). Centrin 2 und 3 sind zusätzlich und Centrin 4 ausschließlich im Basalkörper (Pfeil) lokalisiert. (C) Schematische Illustration der unterschiedlichen Verteilung der vier Centrine in nicht-spezialisierten eukaryotischen Zellen. Centrin 2 und 3 sind in den Centriolen der Centrosome lokalisiert, während Centrin 1 und 4 nicht mit den Centrosomen assoziiert vorliegen (Pfeilspitze).
Größenbalken: (A): 0,5 μm .

Zusammenfassend deuten die differenziellen Expressionsmuster und Lokalisationen der Centrin-Isoformen sowohl in spezialisierten Photorezeptorzellen als auch in unspezialisierten eukaryotischen Zelltypen auf verschiedene Funktionen der unterschiedlichen Centrin-Isoformen in den Zellen hin. Sie bestätigen zudem die exklusive Expression der Centrin-Isoformen 1 und 4 in Cilien tragenden Zellen (Wolfrum und Salisbury, 1998; Laoukili *et al.*, 2000; Wolfrum *et al.*, 2002; Gavet *et al.*, 2003; Giebl *et al.*, 2004a; Giebl *et al.*, 2004b).

5.3. Licht-abhängige posttranslationale Modifikationen von Centrinen

Die Funktion von Proteinen erfordert kontrollierte Regulationsmechanismen in der Zelle. Einer der wichtigsten Regulationsmechanismen stellt die Konformationsänderung von Proteinen dar. Auf diese Weise können Bindungseigenschaften von Proteinen verändert und so beispielsweise Protein-Interaktionen ermöglicht und kontrolliert werden. Konformationsänderungen beruhen oftmals auf der Bindung kleiner Moleküle oder Ionen. Ein Beispiel stellt Calmodulin dar, das mittels spezieller Protein-Motive, den so genannten EF-Hand Motiven, vier Ca^{2+} -Ionen binden (Torok *et al.*, 1992) und anschließend andere Proteine in ihrer Funktion regulieren kann (Geiser *et al.*, 1993; Spang *et al.*, 1995; Liao *et al.*, 1999). Calmodulin dient somit eukaryotischen Zellen als intrazellulärer Ca^{2+} -Sensor (Quadroni *et al.*, 1998). Neben der Bindung von Ca^{2+} stellt die reversible, kovalente Phosphorylierung und Dephosphorylierung an Serin, Threonin und Tyrosin durch Proteinkinasen und durch Proteinphosphatasen den wichtigsten Regulationsmechanismus dar. Es ist einer der am häufigsten vorkommenden und grundlegenden Mechanismen zur Kontrolle und Koordinierung von zellulären Ereignissen als Antwort auf Einflüsse einer dynamischen Umgebung (Edelman *et al.*, 1987; Cohen, 1989). In Photorezeptorzellen wird z.B. der aktivierte Lichtrezeptor Rhodopsin (Rho*) durch die Rhodopsinkinase phosphoryliert, damit das regulatorische Protein Arrestin an Rho* binden kann (Ridge *et al.*, 2003).

Die Funktion von Centrinen wird wohl in erster Linie durch die Bindung von Ca^{2+} an die EF-Hand Motive reguliert. Hier wird auch immer wieder eine Funktion als Ca^{2+} -Sensor wie bei Calmodulin für möglich gehalten (Durussel *et al.*, 2000; Matei *et al.*, 2003). Allerdings wurde für Centrin auch eine Reorganisation während der Zellteilung durch Hyperphosphorylierung diskutiert, um Proteine so in eine lösliche Form zu bringen (Lehtreck und Melkonian, 1991). Diese Vermutung liegt nahe, da Centrin eines der

Cytoskelettproteine mit dem höchsten Phosphatumsatz in den Grünalgen *Spermatozopsis similis* und *Tetraselmis striata* ist (Salisbury *et al.*, 1984; Lechtreck und Melkonian, 1991). Durch frühere Arbeiten mit *Tetraselmis striata*, menschlichen Tumor-Zellen und Kulturzellen konnten Hinweise gefunden werden, dass Centrine selbst auch durch Phosphorylierung reguliert werden können (Martindale und Salisbury, 1990; Lingle *et al.*, 1998; Lutz *et al.*, 2001). Eine Hauptfunktion der Centrin-Phosphorylierung wird bei der Kontraktion Centrin-haltiger Fibrillen in Grünalgen vermutet, wobei die Dephosphorylierung bei der Kontraktion mit hohen Ca^{2+} -Konzentrationen und die Phosphorylierung bei der Relaxation mit niedrigen Ca^{2+} -Konzentrationen in Zusammenhang gebracht wird (Salisbury und Floyd, 1978; Salisbury *et al.*, 1984; Martindale und Salisbury, 1990). In humanen HeLa-Zellen konnten Zellzyklus abhängige Phosphorylierungen von Centrin 2 durch PKA festgestellt werden, die mit der Centrosomenduplikation in Verbindung gebracht wurden. Weiterhin wurde eine mögliche Verringerung der Ca^{2+} -Bindungsaffinität für Centrin durch Phosphorylierung des Proteins diskutiert. In der Grünalge *Tetraselmis* konnte früher schon ein Zusammenhang zwischen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Phosphorylierung von Centrin gefunden werden. Demnach führte eine niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zur Phosphorylierung von Centrin (Martindale und Salisbury, 1990). Dies könnte bei der Feinregulierung der Centrin Funktionen eine wichtige Rolle spielen.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Cytoskelettelement Centrin in der Retina von Säugetieren licht-abhängig phosphoryliert werden kann. Die Aminosäuresequenzen von Maus-Centrinen weisen mehrere potenzielle Phosphorylierungsstellen für verschiedene Proteinkinasen auf. Da diese in den verschiedenen Centrin-Isoformen unterschiedlich vorkommen, könnte es hier einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierungen durch verschiedene Kinasen und der Funktion der vier Isoformen von Säuger Centrinen geben. Die Proteinkinasen A und CKII wurden bereits in früheren Arbeiten in Photorezeptorzellen von Vertebraten beschrieben (Besharse *et al.*, 1999; Sharma *et al.*, 2002). Für die PKC wurde eine Beeinflussung der Aktivität durch die Ca^{2+} -Konzentration gezeigt (Kishimoto *et al.*, 1985).

Nach langwieriger methodischer Entwicklungsarbeit (Trojan, 2003) wurden Versuchsbedingungen generiert, mit deren Hilfe die Phosphorylierungen von Centrinen in der Säugerretina erfasst werden konnten. Die Interaktion von Centrin mit Transducin deutet auf eine Ca^{2+} -abhängige regulatorische Funktion von Centrin bei der Translokation von Transducin hin. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zur Phosphorylierung von

Centrinen beschreiben einen weiteren möglichen licht-abhängigen Regulationsmechanismus der Centrine. Es wurde in Phosphorylierungsexperimenten mit radioaktivem Phosphat gezeigt, dass es zu einer drastischen Erhöhung der endogenen Centrin-Phosphorylierung bei dunkel-adaptierten Rattenretinae kam (Abb. 4.14). Dies bestätigten Experimente mit rekombinant exprimierten Centrin 1 bis 4, welche durch dunkel-adaptierte Rinderretinaextrakte stärker phosphoryliert werden konnte, als durch hell-adaptierte (Abb. 4.15).

In vitro Studien an rekombinanten Centrin-Isoformen mit den verschiedenen Protein-Kinasen nach Lutz *et al.* (2001) zeigten, dass die isolierten Proteinkinasen A, C und CKII Centrin-Isoformen differenziell phosphorylieren. Dabei zeigten vor allem die im Cilium lokalisierten Centrine 1 und 2 eine deutlich höhere Phosphorylierung als Centrin 3 und 4 durch alle verwendeten Kinasen (PKA, PKC, CKII), besonders durch die CKII (Abb. 4.16).

Einen Zusammenhang der Centrin-Regulation könnte man sich auch in der Photorezeptorzelle vorstellen, da auch hier unter Hell- und Dunkelbedingungen unterschiedliche Ca^{2+} -Konzentrationen in den Photorezeptorzellen herrschen (Yau und Nakatani, 1985; Fain *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine Phosphorylierung von Centrinen in der Retina im Dunkeln hin. Es ist ein Mechanismus denkbar, bei dem aufgrund der niedrigen Ca^{2+} -Konzentration im Cilium die EF-Hand Motive der Centrine kein Ca^{2+} gebunden haben und dadurch die Konformation des Proteins eine Phosphorylierungsstelle frei werden lässt, welche dann durch Kinasen phosphoryliert werden könnte.

In *ex vivo* Experimenten wurden zur explantierten Rattenretina verschiedene membranängige Proteinkinase-Inhibitoren in Vorversuchen eingesetzt. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne Inhibitoren wurden die Proben mit membranängigen Inhibitoren für die PKA und CKII deutlich weniger phosphoryliert (PKA in Trojan, 2003; CKII Abb. 4.17). Die Experimente deuten also auf die Proteinkinase A und die Caseinkinase II als Phosphatgruppenüberträger hin. Dabei fällt besonders die dramatische Reduktion der Phosphorylierung der CKII in hell-, aber vor allem in den dunkel-adaptierten Rattenretinae auf (70%). Der PKA-Inhibitor zeigt nur eine Reduktion um 40% in den dunkel-adaptierten Retinae. Die Zugabe eines PKC-Inhibitors zeigt dagegen keine signifikante Reduktion der Phosphorylierung. *In vitro* wurde die Funktion der PKA bei der Phosphorylierung von HsCen2p (humanes Centrin 2 Protein) in HeLa-Zellen bereits in einer früheren Arbeit untersucht (Lutz *et al.*, 2001). Hier wurde die Phosphorylierung von centrosomalem HsCen2p am Serinrest 170 in einem frühen Stadium in der Mitose beschrieben. Das

Vorkommen der PKA in Rinderretinae konnte in einer anderen Arbeit erbracht werden (Sharma *et al.*, 2002). In dieser Publikation wurde gezeigt, dass die PKA Ca^{2+} -abhängig das Enzym Calmodulin-abhängige zyklische Phosphodiesterase phosphoryliert. Möglicherweise spielen Phosphorylierungen durch die PKA an Centrosomen der Retina von Centrin 2, welches an den Centrosomen lokalisiert ist, eine Rolle. Es ist weiterhin denkbar, dass die verschiedenen Centrin-Isoformen durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden, da nicht alle Isoformen die gleichen Phosphorylierungsstellen aufweisen (Abb. 4.13). Wenn man z.B. die Phosphorylierungsstelle für die PKA [Aminosäuren (AS) KKTS] in den verschiedenen Spezies analysiert, kann man feststellen, dass nur MmCen2p (Ser170), MmCen4p (Ser167) und RnCen2p (Ser170) die identischen PKA Phosphorylierungsstellen ähnlich der humanen Centrine HsCen1p (Ser170) und HsCen2p (Ser170) besitzen. *In vitro* konnte die Phosphorylierung von MmCen2p an dieser Stelle (Ser170) durch PKA bereits gezeigt werden. Im Centrin 1 von Rodenten ist allerdings diese Phosphorylierungsstelle nicht vorhanden. Möglicherweise unterliegen die Centrin-Isoformen der verschiedenen Spezies unterschiedlichen Regulationsmechanismen, die auf die unterschiedlichen Lebensweisen der Tiere hinweisen könnten.

Die hier erzielten Ergebnisse geben Hinweise, dass vor allem die Proteinkinase CKII eine bedeutende Rolle bei der Phosphorylierung von Centrinen in der Retina einnimmt (Abb. 5.5). Die CKII stellt eine mit dem Cytoskelett assoziierte Serin/Threonin-Kinase dar (Li *et al.*, 1996; Hollander *et al.*, 1999). CKII wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen als Komponente des Centrosoms, assoziiert mit Mikrotubuli sowie dem Spindelapparat von mitotischen Zellen beschrieben (Faust und Montenarh, 2000; Faust *et al.*, 2002). Zudem wurde in biochemischen Ansätzen die CKII in der Cytoskelett-Fraktion des Cilienapparates der Photorezeptorzellen aus Rinderretinae identifiziert (Hollander *et al.*, 1999). Dabei ist bekannt, dass die CKII β -Tubulin im Verbindungscilium phosphoryliert (Crute und Van Buskirk, 1992; Renthall *et al.*, 1993). Immunocytochemische Untersuchungen zeigten nun erstmals, dass die CKII in der Tat auch im Cilienapparat, sowohl im Basalkörper als auch im Verbindungscilium der Photorezeptorzelle, lokalisiert ist (Abb. 4.18). Durch die räumliche Nähe von Centrin und CKII im Verbindungscilium wird die Möglichkeit einer *in vivo* Phosphorylierung durch diese Kinase unterstrichen (Abb. 5.5). Denkbar ist aber auch eine Phosphorylierung durch mehrere Kinasen. Solche multiplen Phosphorylierungen sind in der Proteinbiochemie bereits bekannt (Hunter, 1987).

Proteinkinasen katalysieren diese Phosphorylierungen, während Phosphatasen (PP) für die Dephosphorylierungen verantwortlich sind. Beide Reaktionen sind zwar im Prinzip

irreversibel, die gegeneinander wirkenden Aktivitäten der Kinasen und Phosphatasen schaffen für die Zellen jedoch einen „Schalter“, mit dem sich die Funktion verschiedener Proteine an und ausschalten lässt. Diese zyklischen Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen sind allgemeine zelluläre Mechanismen für die Regulation der Aktivität von Proteinen. In der Säugetierretina werden mehrere Phosphatasen exprimiert (Selke *et al.*, 1998). Beispielsweise spielt die Proteinphosphatase 2A, die in die Signaltransduktion involviert ist, eine Rolle bei der Dephosphorylierung von aktiviertem Rhodopsin (Palczewski *et al.*, 1989). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau S. Klumpp, Universität Münster, wurden Hinweise gesammelt, dass die Proteinphosphatase γ 1A im Kompartiment des Verbindungsciliums lokalisiert ist (Grummann, 2000). Im Cilium könnte sie für die Dephosphorylierung von dort lokalisierten Proteinen, einschließlich der ciliären Centrine, verantwortlich sein.

Über die Funktion der Phosphorylierung von Centrin in der Säugerretina kann hier leider nur spekuliert werden (Abb. 5.5). Fakt ist, dass Centrine die ersten Cytoskelettkomponenten sind, deren Phosphorylierungsgrad licht-abhängig moduliert wird. Diese Ergebnisse weisen auf die Existenz eines Signalweges zwischen der visuellen Signaltransduktionskaskade und der Regulation der Centrin-Aktivität hin.

5.4. Identifikation von Centrin-Interaktionsproteinen in Säugetierretinae

Die unterschiedliche Lokalisation der Centrin-Isoformen in der Retina haben ergeben, dass Centrin 1 bis 3 im Verbindungscilium und Centrin 2 bis 4 im Basalkörper des Ciliums lokalisiert sind. Neben der Lokalisation ist die Identifikation von interagierenden Proteinen von höchstem Interesse, um die zelluläre Funktion und Regulation von Centrinen in Geweben darzustellen (Schiebel und Bornens, 1995; Wolfrum, 2003). Bislang ist noch wenig über Centrin-Bindepartner in Vertebraten bekannt. In einer früheren Publikation interagierte im Cytoplasma von *Xenopus* Oocyten das *Xenopus* Centrin XI Cenp (verwandt mit Centrin 1 und 2) in einem inaktiven Stadium mit den Hitze-Schock Proteinen HSP70 und HSP90 (Uzawa *et al.*, 1995). Der Centrin/HSP-Komplex hält Centrin solange zurück, bis eine Ca^{2+} -Aktivierung innerhalb der Oocyte den Centrin/HSP-Komplex auflöst und Centrin für den späteren Centrosomen Aufbau zur Verfügung stellt. In Hefe-Zwei-Hybrid „Screens“ einer bislang nicht publizierten Dissertation konnte eine Interaktion von humanem Centrin 2 mit zwei weiteren Proteinen [Phosphatase PTP κ , Laminin-bindendes Protein (LBP)] identifiziert werden (Paschke, 1997). Diese Interaktion war wenig

aussagekräftig und konnte bisher nicht konkretisiert werden. Lediglich in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* konnte mit Kar1p ein Protein identifiziert werden, dessen Interaktion mit Cdc31p, dem Centrin von *S. cerevisiae*, am Spindelpolkkörper für die Teilung der Hefe notwendig ist (Byers, 1981; Rose und Fink, 1987; Biggins und Rose, 1994; Vallen *et al.*, 1994; Spang *et al.*, 1995; Paoletti *et al.*, 2003). Cdc31p ist phylogenetisch nah mit dem Centrin 3 der Säugetiere verwandt und gilt als das homologe Protein zu Centrin 3 (Abb. 1.4). Obwohl Kar1p *in vitro* an Säugetier-Centrine bindet, existiert bislang kein Kar1p-Säugerhomolog (Geier *et al.*, 1996). Mit Kic1p („*kinase that interacts with Cdc31p*“) (Sullivan *et al.*, 1998) und Mps3p („*monopolar spindle*“) (Jaspersen *et al.*, 2002) wurden zwei weitere Interaktionspartner von Cdc31p identifiziert. Während für Kic1p über eine Funktion in der Zellintegrität diskutiert wird, konnte Mps3p als direkte Komponente des Spindelpolkkörpers (SPB), dem homologen Gebilde der Centrosomen in der Hefe, an der „*half bridge*“ mit Kar1p identifiziert werden. In einer kürzlich erschienenen Arbeit wurde mit Sfi1p ein weiteres Hefe-Protein identifiziert, das Ca^{2+} -unabhängig an Centrine bindet (Kilmartin, 2003) und dessen Säugetier-Homolog (hSfi1p) auch in Säugetierzellen die Bildung eines Centrin-enthaltenden Filamentsystems unterstützen könnte (Salisbury, 2004). Trotz der zuletzt beschriebenen Ca^{2+} -unabhängigen Bindung von Centrin an Sfi1p spielt Ca^{2+} in EF-Hand Motiv Proteinen eine entscheidende Rolle. Eine charakteristische Eigenschaft dieser Proteine ist ihre hohe Diversität in ihren Ca^{2+} -Bindungseigenschaften. Sie unterscheiden sich in ihren Affinitäten, kinetischen Eigenschaften und ihren Spezifitäten. Zum Beispiel weisen Proteine der EF-Hand Motiv Überfamilie wie Calmodulin (Milos *et al.*, 1986), Vertebraten Troponin C (Potter und Gergely, 1975), Calcineurin B (Feng und Stemmer, 1999) und CLSP („*calmodulin-like skin protein*“) (Durussel *et al.*, 2002) je vier funktionierende EF-Hand Motive auf, besitzen aber unterschiedliche Ca^{2+} -Bindungseigenschaften. Die meisten EF-Hand Motive sind Ca^{2+} -spezifisch und sind wie Aktivator- oder Sensor-Motive konzipiert. Durch die hohe Konservierung der Säuger-Centrine besitzen diese auch vier EF-Hand Motive. Während das *Chlamydomonas* Centrin noch vier funktionelle EF-Hand Motive aufweist, besitzen die Vertebraten Centrine 1 und 2 zwei und Centrin 3 und 4 nur noch ein funktionelles EF-Hand Motiv (Abb. 4.13). Allerdings weisen diese EF-Hand Motive unterschiedliche Affinitäten zu Ca^{2+} und auch zu anderen zweiwertigen Ionen auf (z.B. Mg^{2+}). Deshalb wurde diskutiert, ob Centrine nicht als Ca^{2+} -Sensoren in Geweben für bestimmte Proteine oder Interaktionenmechanismen fungieren könnten (Durussel *et al.*, 2000; Matei *et al.*, 2003; Tourbez *et al.*, 2004), wie z.B. Calmodulin für die Guanylat-Cyclase (Klumpp *et al.*, 1983;

Schultz und Klumpp, 1984) oder für die Adenylat-Cyclase (Gustin und Nelson, 1987) in *Paramecium*. Durch die unterschiedlichen Affinitäten der EF-Hand Motive der vier Centrin-Isoformen könnten die Isoformen ganz spezielle unterschiedliche Aufgaben in verschiedenen Geweben besitzen (Popescu *et al.*, 2003). Auf jeden Fall spielt eine Ca^{2+} -Aktivierung der Centrine bei Wechselwirkungen mit anderen Proteinen eine entscheidende Rolle. Deshalb wurde bei der Suche nach Interaktionspartnern von Centrinen in der Retina auf die Ca^{2+} -Konzentration in den Versuchsansätzen ein besonderes Augenmerk geworfen.

Mittels Centrin Blot „*Overlay Assays*“ konnten im Zuge dieser Arbeit in der Säugetierretina sechs Polypeptide mit unterschiedlichem Molekulargewicht identifiziert werden, die mit Ca^{2+} -aktiviertem MmCen1p interagierten (Abb. 4.19). Diese Interaktionen mit dem rekombinanten Centrin 1 waren allerdings auf die Ca^{2+} -aktivierte Centrinform beschränkt. Ähnliche Ergebnisse zeigten Versuche, in denen die Bindungsaffinität unterschiedlicher Säuger-Centrine zu dem Hefe-Bindeprotein Kar1p mit der Ca^{2+} -Konzentration stieg (Schiebel und Bornens, 1995; Geier *et al.*, 1996; Wiech *et al.*, 1996). Ca^{2+} dürfte somit für die Interaktion von Centrinen mit anderen Proteinen in der Retina eine wichtige Rolle spielen. Bei der Charakterisierung der Interaktionspartner im „*Overlay Assay*“ wurde sich auf ein 37 kDa (P 37) großes Protein konzentriert. Es konnte als die β -Untereinheiten des visuellen G-Proteins Transducin identifiziert werden und wurde wegen der wichtigen Stellung in der Transduktionskaskade in Photorezeptorzellen weiter untersucht (Abb. 4.20) (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a).

5.5. Der Centrin/Transducin-Komplex in der Säugerretina

Transducin (G_t -*holo*) ist das heterotrimere G-Protein (Guaninnukleotid-bindende regulatorische Proteine) der visuellen Signaltransduktionskaskade in Photorezeptorzellen von Vertebraten (Abb. 1.10), welches an den Diskmembranen der Stäbchenzelle lokalisiert ist (Kolb und Marshak, 2003). Nach der Absorption von Licht erhöht Rhodopsin (Rho^*) die katalytische Aktivität gegenüber G_t um mehr als den Faktor 10^8 (Melia, Jr. *et al.*, 1997) und aktiviert dadurch hunderte von G-Proteinen, um das Lichtsignal zu verstärken (Pugh und Lamb, 2000; Heck und Hofmann, 2001; Burns und Baylor, 2001; Arshavsky *et al.*, 2002). Diese Rezeptor-G-Protein Interaktion benötigt das intakte G_t -*holo* Protein zusammengesetzt aus der α -Untereinheit, welche die Guaninnukleotid-Bindestelle mit GDP trägt, und den untrennbaren $\beta\gamma$ -Untereinheiten. Bei einem Lichtsignal katalysiert die α -Untereinheit den Austausch von GDP zu GTP, wodurch nun aus dem heterotrimeren

Transducinkomplex $G_t\alpha\cdot GTP$ abgespalten wird. Anschließend aktiviert freies $G_t\alpha\cdot GTP$ die cGMP-Phosphodiesterase (PDE). Die nun durch die PDE katalysierte Umsetzung von cGMP zu 5'-GMP führt zur Absenkung der cGMP-Konzentration und zum Schließen von cGMP-gesteuerten Kationenkanälen in der Plasmamembran der Stäbchenzellen (Abb. 1.11) (Arshavsky *et al.*, 2002; Ridge *et al.*, 2003). Als Antwort auf die Absorption eines einzelnen Photons durch Rhodopsin schließen sich mehrere hundert Kationenkanäle und es kommt zu einer Hyperpolarisation der Stäbchenzelle (Hofmann und Ernst, 2001).

Die Lokalisation von Transducin in Vertebraten Photorezeptorzellen wird durch Licht reguliert: Im Dunkeln ist Transducin im Außensegment der Photorezeptorzelle hoch konzentriert, während im Hellen eine Translokation statt findet und eine hohe Konzentration von G_t im Innensegment und im Zellkörper zu finden ist (Abb. 4.24 und Abb. 4.25) (Brann und Cohen, 1987; Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Organisciak *et al.*, 1991; Pulvermüller *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Arshavsky, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Sokolov *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2004). Solch eine lichtabhängige Translokation von Proteinen ist auch von Arrestin bekannt, welches auch ein Protein in der Signaltransduktionskaskade darstellt. Der Translokationsprozess von Arrestin ist genau entgegengesetzt zu Transducin (Abb. 8.2, Anhang) (Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Mangini und Pepperberg, 1988; Besharse und Horst, 1990; Xu *et al.*, 1997; Mendez *et al.*, 2003; Peterson *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003). Lichtinduzierte Translokationen von Proteinen zwischen den Photorezeptorsegmenten müssen durch oder entlang dem Verbindungscilium vonstatten gehen, da dieses Cilium die einzige intrazelluläre Verbindung zwischen den beiden Kompartimenten darstellt. Bei der Translokation von verschiedenen Proteinen können verschiedene Mechanismen über dort vorhandene Cytoskelettelemente, wie Aktinfilamente oder Mikrotubuli, eine Rolle spielen (Marszalek *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2003; Elias *et al.*, 2004).

Wie schon in Abbildung 5.2 diskutiert, sind Centrin 1, 2 und 3 Bestandteile des Cytoskeletts des Photorezeptorciliums (Wolfrum und Salisbury, 1995; Wolfrum und Salisbury, 1998). Doppelte Immunofluoreszenzanalysen mit Transducin und Centrin-Antikörpern zeigten eine Kolokalisation der zwei Proteine im oder am Verbindungscilium. Erst elektronenmikroskopische Immunlokalisationen der Proteine und Quantifizierung der Markierungen zeigten, dass Centrin und Transducin in dem gleichen subzellulären Kompartiment des Verbindungsciliums kolokalisiert sind (Abb. 4.26). Dabei sind Transducin und Centrin an der inneren Oberfläche des Mikrotubuli-Paarringes lokalisiert. Die Verteilung von Transducin im Verbindungsciliums zeigt eindeutig, dass die

Translokation von Transducin durch das innere Lumen des Verbindungscilium vollzogen wird. Die Kolokalisation von Centrin an dieser Stelle zeigt weiterhin, dass beide Proteine physikalisch während der Translokation von Transducin durch das Cilium interagieren könnten.

Weitere Interaktionsexperimente wie Koimmunopräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern gegen Centrin zeigten eine Ca^{2+} -abhängige Komplexbildung zwischen Centrin und Transducin. In diesen Experimenten konnte die Centrin-Isoform, die die Wechselwirkung mit Transducin eingeht, nicht identifiziert werden, weil die verwendeten Antikörper nicht spezifisch für bestimmte Centrin-Isoformen waren. Das heterotrimere G-Protein kopräzipitierte als *holo*-Protein Ca^{2+} -abhängig mit einer Centrin-Isoform. Erst GST-Centrin „*Pull-down Assays*“ mit Rinderretinaextrakten und aufgereinigten Untereinheiten von Transducin ($G_i\alpha$ und $G_i\beta\gamma$) und deren spezifischen Antikörpern brachte Klarheit über die Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Centrin und Transducin. Bei Zugabe von extrazellulärem Ca^{2+} interagierte das G_i -*holo* Protein aus den Rinderretinaextrakten mit allen vier GST-Centrin-Isoformen (Abb. 4.23). Weitere GST-Centrin „*Pull-down Assays*“ mit aufgereinigten $G_i\alpha$ und $G_i\beta\gamma$ Untereinheiten sollten validieren, welche Untereinheiten mit welchen Centrin-Isoformen eine Ca^{2+} -abhängige Wechselwirkung eingehen. Dabei konnte eine Bindung der nicht dissoziierbaren Untereinheiten $G_i\beta\gamma$ mit allen Centrin-Isoformen festgestellt werden. Die α -Untereinheit von Transducin zeigte keine Bindung zu einer der vier Isoformen von Centrin. Damit konnte gezeigt werden, dass das G_i -*holo* Protein von Transducin über die untrennbaren $\beta\gamma$ -Untereinheiten Ca^{2+} -abhängig mit allen Centrin-Isoformen interagiert. Weiterführende Experimente unserer Kooperationspartner der AG Hofmann in Berlin mit den in dieser Arbeit hergestellten Centrin-Klonen bestätigten diese Versuche mit verschiedenen Interaktionsassays (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004a):

- ♥ Es konnten Interaktionen zwischen dem G_i -*holo* und den Ca^{2+} -aktivierten MmCen1p-mittels Zentrifugations-Experimenten detektiert werden (Pulvermüller *et al.*, 2002).
- ♥ In „*Size-Exclusion*“-Chromatographie-Experimenten wurden alle Centrine in Ca^{2+} -aktiviertem und nicht aktiviertem Zustand mit G_i -*holo*, $G_i\alpha$ und $G_i\beta\gamma$ getestet. Dabei zeigte sich sowohl eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von $G_i\beta\gamma$ mit den vier Maus Centrin-Isoformen als auch mit dem G_i -*holo*. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass $G_i\alpha$ keine Wechselwirkung mit den Centrin-Isoformen eingeht, egal ob sie Ca^{2+} -aktiviert waren oder nicht.

- ♥ „*Kinetic-light scattering*“-Experimente (Heck *et al.*, 2000) bestätigten noch einmal die Ergebnisse der „*Size-Exclusion*“-Chromatographie-Experimente. Dabei konnte die Ca^{2+} -Abhängigkeit der Interaktionen durch Titrations noch einmal bestätigt werden. Außerdem konnten Aussagen über Bindungsaffinitäten der einzelnen Centrin-Isoformen zu $\text{G}_i\beta\gamma$ gemacht werden. Dabei zeigte sich, dass Centrin 3 eine 5fach niedrigere Bindungsaffinität als die anderen Centrin-Isoformen zu $\text{G}_i\beta\gamma$ besitzt.

Übereinstimmend zeigten alle Experimente, dass alle vier Centrin-Isoformen Ca^{2+} -abhängig mit Transducin interagieren. Dabei interagierten sowohl die isolierten $\text{G}_i\beta\gamma$ -Heterodimere als auch der heterotrimere G_i -*holo* Proteinkomplex mit den vier Centrin-Isoformen, nicht aber die Untereinheit $\text{G}_i\alpha$ alleine. Diese Interaktion war stets strikt Ca^{2+} -abhängig.

Die „*Kinetic-light scattering*“-Studien nach Heck *et al.* (2000) konnten zeigen, dass die Protein-Protein-Interaktionen zwischen den Centrinen und Transducin hoch spezifisch sind. Die Centrine interagierten nur mit Transducin und nicht mit anderen Molekülen der Signaltransduktionskaskade. Zum Beispiel konnte für Arrestin, welches ebenfalls eine lichtinduzierte Translokation in entgegengesetzter Richtung zu Transducin zeigt, in Interaktionsstudien eine Bindung mit den in dieser Arbeit hergestellten Centrin-Klonen ausgeschlossen werden. Weiterhin interagierten weder Rhodopsin, Rhodopsinkinase oder die visuelle PDE mit Centrinen (Gießl *et al.*, 2004b). Außerdem zeigten nahe Verwandte von Centrin (andere EF-Hand Proteine z.B. Recoverin und Calmodulin, Abb. 1.3), die ebenfalls in Photorezeptorzellen hochgradig exprimiert werden, keine signifikanten Affinitäten zu Transducin (Gießl *et al.*, 2004a). Biophysikalische Analysen von Centrinen deuten darauf hin, dass die Bindung von Ca^{2+} mit den EF-Hand Motiven von Centrinen eine Konformationsänderung in den Molekülen bewirkt. Wie in anderen Proteinen mit EF-Hand Motiven (z.B. Calmodulin) (Barbato *et al.*, 1992; Meador *et al.*, 1993) könnte auf diese Weise die spezielle Funktion von Centrinen in der Zelle reguliert werden (Coling und Salisbury, 1992; Weber *et al.*, 1994; Baron *et al.*, 1994; Schiebel und Bornens, 1995; Wiech *et al.*, 1996; Gavet *et al.*, 2003; Popescu *et al.*, 2003). In Calmodulin entsteht durch die Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen zwei nicht polare Furchen für die Interaktion mit nicht-polaren Regionen anderer Proteine. Eine solche Ca^{2+} -Regulierung von Interaktionsstellen ist bei Centrinen durch die starke Ähnlichkeit zu Calmodulin sehr gut denkbar. Bemühungen, die komplette Struktur von Centrin mit und ohne Ca^{2+} aufzulösen, schlugen bis heute leider fehl (Matei *et al.*, 2003). Erste Untersuchungen zeigten, dass dies auf den im Vergleich zu Calmodulin größeren N-terminalen Bereich von Centrinen zurückzuführen ist.

Konformationsänderungen der Centrine durch Ca^{2+} -Aktivierung sind wahrscheinlich für viele Funktionen der Centrine zuständig. In diversen einzelligen Grünalgen ist Ca^{2+} -aktiviertes Centrin für die Formation und die Kontraktion von Centrin-Nanofilamenten verantwortlich (Salisbury *et al.*, 1984; 1986; 1987; McFadden *et al.*, 1987; Salisbury *et al.*, 1988; Sanders und Salisbury, 1989; 1994; Wiech *et al.*, 1996). Obwohl eine neue Publikation eine Ca^{2+} -unabhängige Bindung zu einem Protein in Hefen zeigt (Kilmartin, 2003), war bei allen anderen Interaktionen eine vorherige Aktivierung von Centrinen durch Ca^{2+} notwendig (Schiebel und Bornens, 1995; Wolfrum *et al.*, 2002). Die humanen Centrin-Isoformen 1 und 2 zeigten wie Cdc31p (homolog zu Centrin 3 in Vertebraten) ebenfalls eine Ca^{2+} -abhängige Bindung zu Kar1p, welches für die Teilung von Hefe-Zellen notwendig ist (Spang *et al.*, 1995; Wiech *et al.*, 1996; Middendorp *et al.*, 2000). In *Paramecium* wird in neuen Publikationen sogar eine Regulation von Ca^{2+} -Kanälen in Cilien von Centrin diskutiert (Gonda *et al.*, 2004).

Alle Ca^{2+} -aktivierten Centrin-Isoformen interagieren mit $\text{G}_i\beta\gamma$. Allerdings konnten bemerkenswerte Unterschiede in der Bindungsaffinität der Centrin-Isoformen zu Transducin festgestellt werden. In „*Kinetic-light scattering*“ Experimenten von Dr. Alexander Pulvermüller (AG Hofmann, Berlin, Charité) konnte gezeigt werden, dass Centrin 3 eine 5fach niedrigere Bindungsaffinität zu $\text{G}_i\beta\gamma$ als die anderen Centrine besitzt. Wird allerdings die Bindungsaffinität von Calmodulin und Centrin 3 zu $\text{G}_i\beta\gamma$ verglichen, zeigt Centrin 3 immer noch eine signifikant höhere Bindungsaffinität zu $\text{G}_i\beta\gamma$ als Calmodulin. Weiterhin kann aus den Hill-Koeffizienten der „*Kinetic-light scattering*“-Experimente abgeleitet werden, dass Centrin 1, 2 und 4 in diesen Interaktionsversuchen als Oligomere und Centrin 3 als Monomer mit $\text{G}_i\beta\gamma$ interagiert (Gießl *et al.*, 2004a). Die Möglichkeit von Centrin, Oligomere oder Polymere zu bilden, wurde bereits in früheren Arbeiten diskutiert (Wiech *et al.*, 1996). So ist in Grünalgen Centrin Hauptbestandteil von Filamenten ($\text{Ø} \sim 2$ bis 4 nm) in den Cilienwurzeln (Salisbury *et al.*, 1984; Salisbury, 1989; Baron *et al.*, 1992). *In vitro* Studien mit aufgereinigten Centrinen weisen darauf hin, dass sowohl Algen-Centrin als auch humane Centrine Polymere bilden können, wenn man die Ca^{2+} -Konzentration in den Versuchen langsam erhöht (Wiech *et al.*, 1996). Dies ist ein Hinweis, dass Centrin 1 möglicherweise im Verbindungscilium von Säugern ein filamentöses Netzwerk ausbildet, welches Transducin binden könnte. Welche der Centrin-Isoformen mit dem G-Protein Transducin *in vivo* in der Photorezeptorzelle interagieren, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Da Centrin 4 sich nicht im Verbindungscilium befindet und Centrin 3 eine

geringere Affinität zu $G_t\beta\gamma$ besitzt, führen die Hinweise zu dem ubiquitär exprimierten Centrin 2 und dem Cilien spezifischen Centrin 1. Beide Proteine sind im Verbindungscilium von Photorezeptorzellen im gleichen subzellulären Kompartiment mit Transducin kolokalisiert und stellen somit die besten Kandidaten für die Interaktion mit Transducin dar.

5.6. Welche Rolle spielt der Centrin/G-Protein-Komplex in Photorezeptorzellen?

Die räumliche Kolokalisation von Centrin 1, 2 und 3 und Transducin im Lumen des Verbindungsciliums, das die einzige intrazelluläre Verbindung zwischen dem Innen- und dem Außensegment der Photorezeptorzellen darstellt, und die hohe Bindungsaffinität von Centrin 1 und 2 zu Transducin weisen stark auf die Formation eines Centrin/Transducin-Komplexes im Inneren des Verbindungsciliums hin. Demnach interagiert Transducin bei der Passage durch das Cilium mit den Centrinen. Hierbei sollte die Bedeutung der Regulation eines Centrin/Transducin-Komplexes der licht-abhängigen Translokation von Transducin durch das Verbindungscilium von Photorezeptorzellen diskutiert werden (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Gießl *et al.*, 2004a; Gießl *et al.*, 2004b).

Ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Photorezeptorzelle sollte die Centrine durch Ca^{2+} -Bindung aktivieren. Diese Aktivierung könnte die Bindung von einzelnen Molekülen oder Oligomeren von Centrin mit Transducin induzieren, welches durch das Verbindungscilium transportiert wird. Für Centrin 1 konnte gezeigt werden, dass nur zwei Ca^{2+} -Ionen nötig sind, um einen Komplex mit Transducin zu bilden (Wolfrum *et al.*, 2002). Durch diese Ca^{2+} -abhängige Interaktion dürfte die Verschiebung von Transducin durch das Verbindungscilium vermindert oder gestoppt werden (Abb. 5.3). Dabei ist noch nicht ganz klar, ob Transducin als heterotrimeres Protein oder in den Untereinheiten $G_t\alpha$ und $G_t\beta\gamma$ einzeln transportiert wird. Versuche mit Tangentialschnitten durch die Retina zeigen, dass die Translokation von $G_t\alpha$ vom Außen- ins Innensegment von Stäbchen Photorezeptorzellen dreimal schneller vonstatten geht als die Translokation von $G_t\beta\gamma$ (Sokolov *et al.*, 2002), was für eine separate Translokation der Untereinheiten sprechen würde. Weiterhin soll Phosducin, ein 28 kDa großes Phosphoprotein, das in einigen Säugerzelltypen exprimiert wird und dort die Aktivierung von G-Proteinen blockiert (Lee *et al.*, 1987; Yoshida *et al.*, 1994; Wilkins *et al.*, 1996; Willardson *et al.*, 1996; Gaudet *et al.*, 1996), eine Rolle spielen. Koimmunopräzipitationen von seriellen Tangentialschnitten einer

hell-adaptierten Mausretina zeigten, dass Phosducin entlang des Transportweges vom Außen- ins Innensegment mit $G_t\beta\gamma$ kopräzipitierte und deshalb eine wichtige Rolle in dem Translokationsprozess von $G_t\beta\gamma$ spielen könnte (Sokolov *et al.*, 2004). Allerdings zeigte wiederum eine $G_t\alpha$ „knockout“ Maus, dass $G_t\beta\gamma$ durch das Fehlen von $G_t\alpha$ keine lichtinduzierte Translokation mehr ausführt. Dies würde für eine heterotrimeren Translokation des G-Proteins Transducin vom Außen- ins Innensegment sprechen. Da Centrine auch mit dem G_t -*holo* Protein interagieren, spricht viel für eine Translokation des gesamten heterotrimeren Proteinkomplexes. Dabei muss der Komplex aus den Untereinheiten im Außensegment wieder gebildet werden, bevor er ins Innensegment zurück transportiert werden kann oder es werden nur alle vollständigen heterotrimeren G-Proteine, die noch nicht aktiviert wurden, zurücktransportiert, um die Signaltransduktionskaskade zu verlangsamen.

Die Anreicherung von G_t -*holo* im Verbindungscilium in der hell-adaptierten Mausretina deutet auf eine lichtinduzierte Komplexbildung von Centrin und Transducin hin. Nach diesen Erkenntnissen dürfte die Wechselwirkung zwischen Centrinen und dem visuellen G -*holo* Protein im Verbindungscilium die licht-abhängige Translokation von Transducin in der Photorezeptorzelle durch Lichteinwirkung und durch Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration regulieren. Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration in Photorezeptorzellen innerhalb der Konzentration, die für die Interaktion benötigt wird, ist in Stäbchenzellen gut untersucht und beschrieben worden (Molday und Kaupp, 2000). In Rahmen der normalen Funktion von Stäbchen Photorezeptorzellen, kann man nach der Lichtaktivierung der visuellen Transduktionskaskade einen drastischen Ca^{2+} -Abfall im Außensegment beobachten. Allerdings konnte ein Ca^{2+} -Anstieg in Stäbchen Photorezeptorzellen in hellem Licht bei licht-abgesättigten Konditionen beobachtet werden (Matthews und Fain, 2001), welche die Bezugsquelle von Ca^{2+} für die Induktion der Centrin/Transducin-Bindung im Verbindungscilium darstellen könnte. Um eine Translokation von Transducin zwischen den Segmenten zu gewährleisten, muss im Verbindungscilium eine niedrige Ca^{2+} -Konzentration herrschen. Die freie Ca^{2+} -Konzentration im Verbindungscilium wird sowohl bei hellen als auch bei dunklen Bedingungen beeinflusst. Dabei sind aber bis jetzt keine Angaben über die Ca^{2+} -Konzentrationschwankungen im Verbindungscilium bekannt. Die Assemblierung von Centrin und Transducin könnte sich zu einer Ca^{2+} -induzierten Barriere für Transducin aufbauen, die den Austausch von Transducin zwischen dem Innen- und Außensegment unterbindet (Barriere-Hypothese, Abb. 5.3) (Wolfrum *et al.*, 2002).

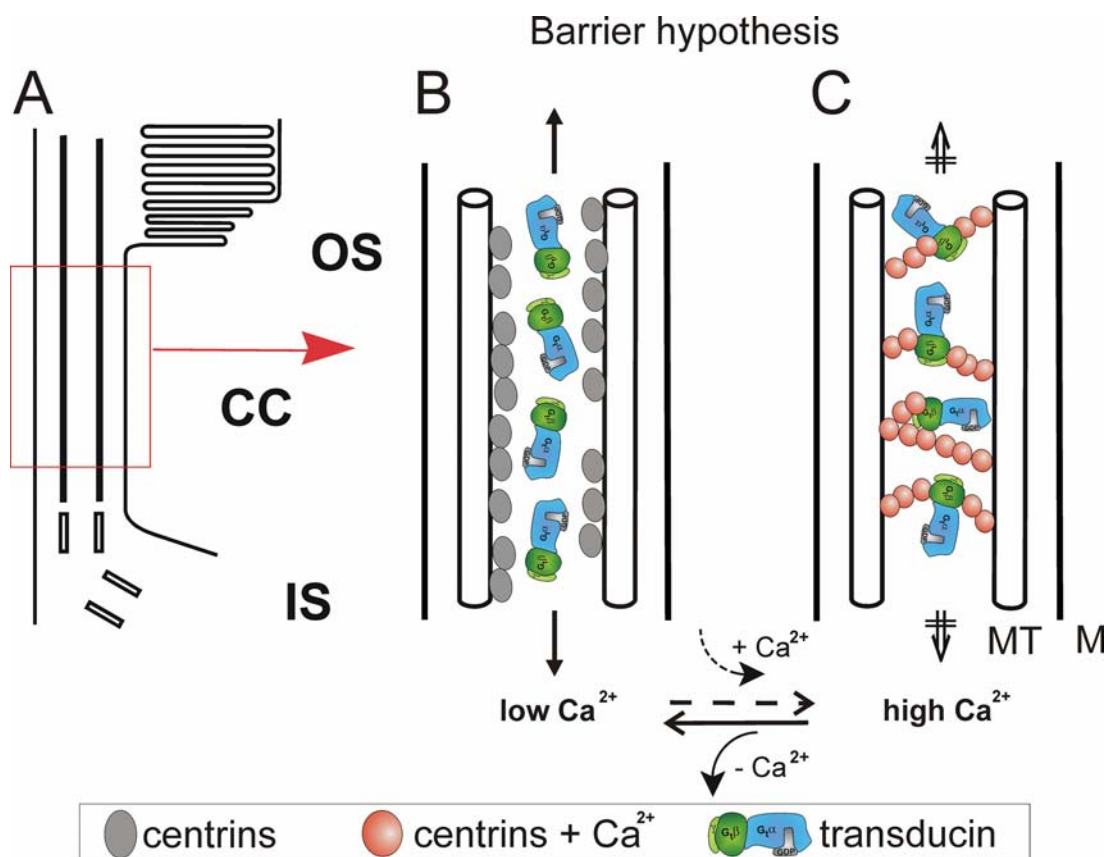


Abbildung 5.3 Ca²⁺-induzierte Barriere-Hypothese („*barrier hypothesis*“)

Modell einer Ca²⁺-abhängigen Centrin/Transducin Assemblierung im Verbindungscilium von Säuger Photorezeptorzellen. **(A)** Schematische Präsentation eines Teils einer Säuger Photorezeptorzelle zeigt die Verbindung zwischen dem Außensegment (OS) und dem Innensegment (IS) durch das Verbindungscilium (CC). **(B und C)** zeigen den rot umrandeten Teil in **(A)** des Verbindungsciliums im Detail. Es werden schematisch die Mikrotubuli (MT) und die Membran (M) dargestellt. **(B)** Bei niedrigen freien Ca²⁺-Konzentrationen wird Centrin im Verbindungscilium nicht aktiviert und Transducin kann ungehindert durch das innere Lumen des Ciliums transportiert werden. **(C)** Wenn die Calciumkonzentration im Außensegment steigt und Centrin im Verbindungscilium aktiviert wird, kommt es zu der Assemblierung des Centrin/Transducin-Komplexes. Transducin wird im Verbindungscilium gebunden und eine Barriere zwischen dem Innen- und Außensegment aufgebaut [verändert nach Wolfrum *et al.* (2002)].

Durch den Abfall der Ca²⁺-Konzentration sollte den Komplex wieder dissoziieren und Transducin den Weg frei geben um den Austausch zwischen Innen- und Außensegment durch das Cilium wie beschrieben wieder aufnehmen zu können (Philp *et al.*, 1987; Whelan und McGinnis, 1988; Organisciak *et al.*, 1991; Pulvermüller *et al.*, 2002; Sokolov *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Mendez *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Sokolov *et al.*, 2004).

Eine weitere Möglichkeit einer Ca²⁺-gesteuerten sequenziellen Bildung des Centrin/Transducin-Komplexes könnte allerdings auch den Transport des Transducins durch das Verbindungscilium steuern (Ca²⁺-Gradient-Hypothese, Abb. 5.4). Transducin bindet an

Centrin abhängig von der freien Ca^{2+} -Konzentration, die im Verbindungscilium in einem Gradienten vorherrschen könnte.

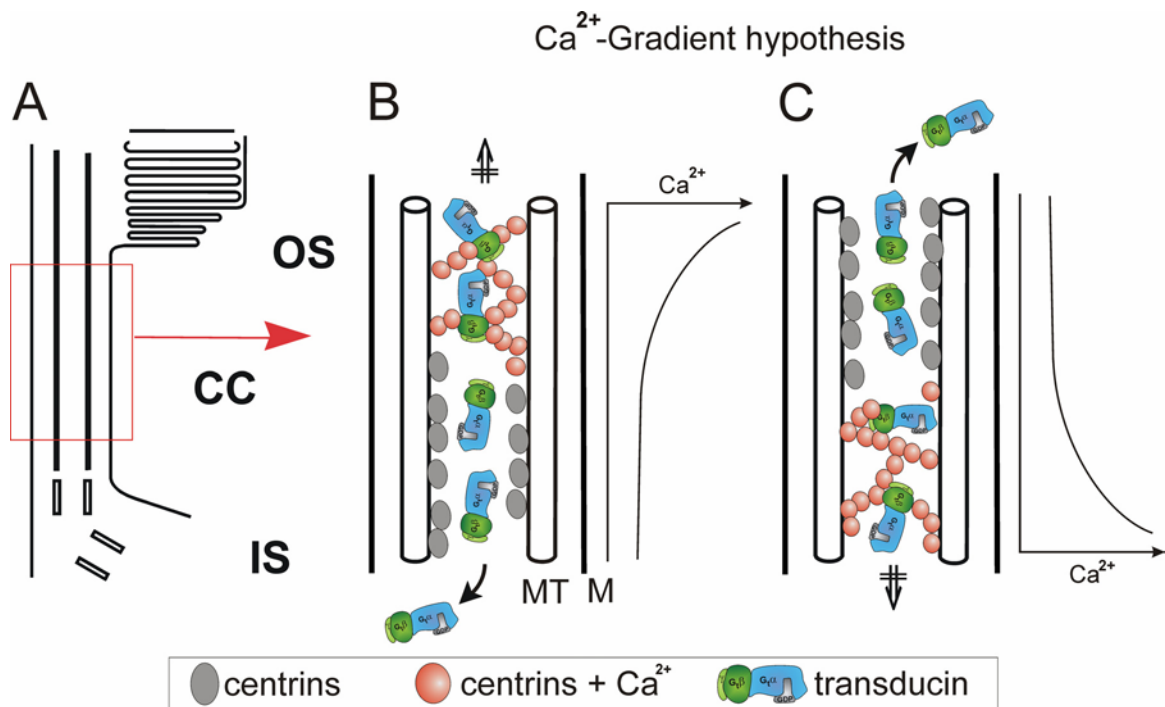


Abbildung 5.4 Ca^{2+} -Gradient-Hypothese („ Ca^{2+} -Gradient hypothesis“)

Modell einer Ca^{2+} -abhängigen Centrin/Transducin Assemblierung im Verbindungscilium von Vertebraten Photorezeptorzellen. (A) Schematische Präsentation eines Teils einer Vertebraten Photorezeptorzelle zeigt die Verbindung zwischen dem Außensegment (OS) und dem Innensegment (IS) durch das Verbindungscilium (CC). (B) und (C) stellt den rot umrandeten Teil in (A) des Verbindungsciliums im Detail dar. Es werden schematisch die Mikrotubuli (MT) und die Membran (M) dargestellt. Hier wird die Gradient-Hypothese behandelt. Transducin bindet an Centrin abhängig von der freien Ca^{2+} -Konzentration, die im Verbindungscilium vorherrscht. Ein maßgeblicher Ca^{2+} -Gradient entlang des Ciliumlumens könnte für eine partielle Assemblierung des Centrin/Transducin-Komplexes und die Abgabe von Transducin auf der anderen Seite verantwortlich sein [verändert nach Wolfrum *et al.* (2002)].

Translokationen von verschiedenen Proteinen, die an der Signaltransduktionskaskade beteiligt sind, wurden in letzter Zeit sehr stark diskutiert (Sokolov *et al.*, 2002; Böhner *et al.*, 2002; Arshavsky, 2003). Die Translokation von Transducin von dem Außen- in das Innensegment wird als eine Art „Verhinderung“ der Absättigung der Lichtantwort diskutiert, indem man die Rate des zur Verfügung stehenden Transducins im Außensegment erniedrigt. Basierend auf dieser Hypothese müsste das Ausmaß der Transducinwanderung in das Innensegment mit einer Reduktion der Empfindlichkeit der Lichtantwort korrelieren, was in lebenden Ratten mit elektrophysikalischen Techniken schon gezeigt wurde (Sokolov *et al.*, 2002). Das Phänomen der Translokation von Transducin wird symbolisch

als eine „molekulare Sonnenbrille“ diskutiert, wobei die Lichtempfindlichkeit der Photorezeptorzellen reduziert wird, ohne eine Änderung in der kinetischen Antwort zu vollziehen (Arshavsky, 2003). G_q , das G-Protein in Photorezeptoren von Invertebraten, zeigt ebenfalls eine Translokation wie das G-Protein Transducin in Vertebraten. Licht-abhängige reversible Translokationen von G_q zwischen den Rhabdomeren und dem Rest der Zelle wurden im Flusskrebs und in *Drosophila* beobachtet (Besharse und Horst, 1990; Terakita *et al.*, 1996; Terakita *et al.*, 1998; Kosloff *et al.*, 2003). Weiterhin wird für *Drosophila* diskutiert, dass diese Translokation von G_q ein analoger Mechanismus zu der Translokation von Transducin in Vertebraten darstellt (Kosloff *et al.*, 2003). Allerdings wurde in einer neuen Publikation das Motorprotein Myosin III NINAC für den lichtinduzierten Transport von $G_q\alpha$ verantwortlich gemacht (Cronin *et al.*, 2004). Ob Centrin in dem Translokationsprozess von G_q in Invertebraten eine Rolle spielt, muss hier offen bleiben. Das Centrin in Invertebraten exprimiert wird, konnte bereits in Insekten mit Antikörpern gegen Centrin gezeigt werden (Wolfrum, 1991; 1992; 1997).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Centrin-Isoformen Cen2, Cen3 und Cen4 zwar mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren, jedoch in der Photorezeptorzelle nicht nur bzw. gar nicht im Verbindungscilium, dem bislang untersuchten Kompartiment der Transducin-Centrin-Interaktion, zu finden sind. Allerdings ergaben ersten Analysen der Centriolen in Basalkörpern und Centrosomen nicht Cilien-tragender Zellen, dass diese Centrine dort mit anderen heterotrimeren G-Proteinen kolokalisiert vorliegen (Abb. 4.25 und Abb. 5.1). Man könnte nun der Frage nachgehen, ob β -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine mit Centrinen auch an Centriolen interagieren und, falls ja, welche funktionelle Relevanz hinter dieser Interaktion steht. Interessanterweise mehrten sich in den letzten Jahren die Hinweise, dass die Funktion heterotrimerer G-Proteine nicht nur auf klassische 7-Transmembran-Rezeptor-assoziierte Signaltransduktionswege beschränkt ist, sondern auch Membran-unabhängige zelluläre Prozesse u. a. auch von $\beta\gamma$ -Heterodimeren vermittelt werden (Knust, 2001; Schaefer und Knoblich, 2001; Schaefer *et al.*, 2001; Cismowski *et al.*, 2001; Gotta und Ahringer, 2001a; Gotta und Ahringer, 2001b; Goldstein, 2003). Dabei wurde vor allem die Assoziation von G-Proteinen mit dem Cytoskelett, beispielsweise mit Centriolen von Spindelpolen und von Centrosomen, beschrieben. In Embryos von *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* wurden Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine identifiziert, die bei der asymmetrischen Zellteilung an der Organisation der Spindeln beteiligt sind (Knust, 2001; Goldstein, 2003). Da mitotische

Spindeln an den Spindelpolen organisiert werden und Centrine an Centriolen, den MTOCs, lokalisiert sind, stellen Centrine hervorragende Kandidaten für eine Interaktion mit heterotrimeren G-Proteinen und für eine Verankerung dieser an Spindelpolen bzw. an Centrosomen und Basalkörpern dar (Abb. 5.7).

5.7. Schlussbetrachtungen und Ausblicke in der Centrin-Forschung

Durch eine Anwendung von Lokalisations-, Interaktions- und Phosphorylierungsmethoden konnte ein Einblick in die mögliche Funktionsweise eines relativ kleinen Proteins, dem Centrin, gegeben werden. Da für die Bindung von Centrinen an Transducin eine hohe Ca^{2+} -Konzentration nötig ist, spricht vieles für einen entgegengesetzten Regulationsmechanismus durch die Phosphorylierung von Centrinen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierungen der rekombinanten Centrine 1, 2 und 4 eine höhere Licht-abhängigkeit zeigen als Centrin 3. Da Centrin 4 wie gezeigt nicht im Verbindungscilium lokalisiert ist und Centrin 3 eine niedrige Bindungsaffinität zu Transducin besitzt und auch weniger phosphoryliert wird, kann davon ausgegangen werden, dass Centrin 1 und 2 wichtige Rollen bei der Interaktion von Centrin und Transducin spielen. Centrin 3 und 4 sind daher wohl in andere Prozesse der Retina involviert. So ist es denkbar, dass die Isoformen 3 und 4 mit weiteren Proteinen (auch G-Proteinen) interagieren, die z.B. am Basalkörper des Verbindungsciliums sitzen. Weiterhin ist es denkbar, dass Centrin 3 in Säugern wie z.B. Cdc31p in der Hefe an mRNA Transportprozessen beteiligt ist (Fischer *et al.*, 2004).

Verschiedene Phosphorylierungsstellen der Centrin-Isoformen untereinander und in unterschiedlichen Spezies sind möglicherweise auf mannigfache Regulationsmechanismen und Funktionen zurückzuführen, die auf die unterschiedlichen Lebensweisen der Tiere hinweisen könnten. Beispielsweise sind Nagetiere auf eine schnellstmögliche Adaption ihrer Photorezeptorzellen angewiesen, wenn sie aus dem Tageslicht in ihre dunklen Höhlen kommen. Zusätzlich könnte es ein Mechanismus sein, der Nagetieren in der Abenddämmerung eine bessere Anpassung an die Lichtverhältnisse erlaubt (Hardie, 2002).

Erste Hinweise deuten auf einen Zusammenhang von Adaptionsmechanismen und der Interaktion von Centrin mit Transducin während des Translokationsvorganges hin. Dieser mögliche licht-abhängige Regulationsprozess der Phosphorylierung und der Ca^{2+} -abhängigen Interaktion von Centrinen mit Transducin wird in Abbildung 5.5 in einer Hypothese zusammengefasst.

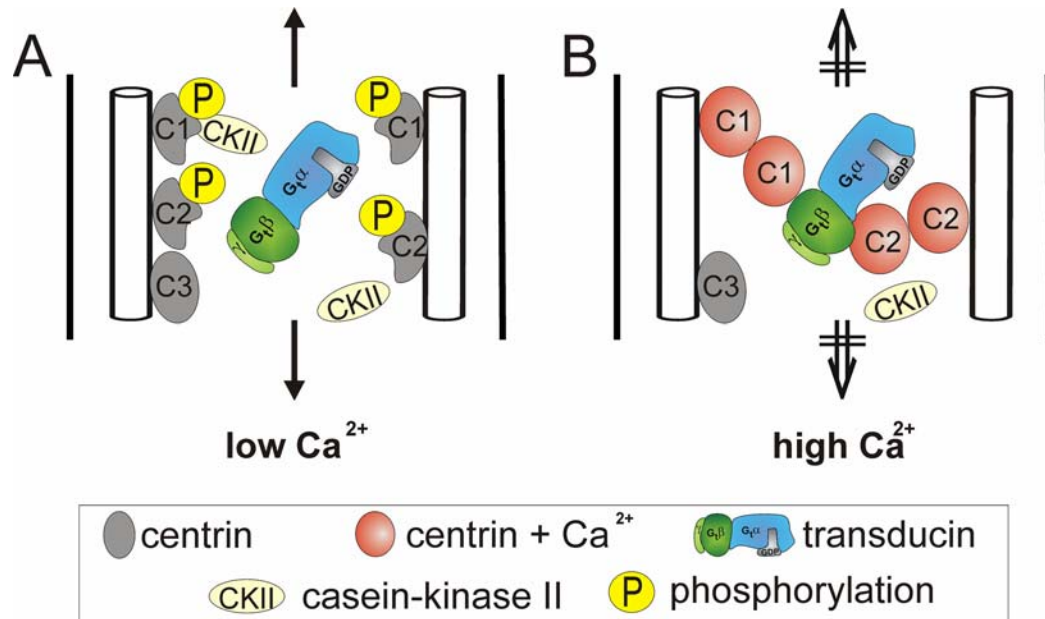


Abbildung 5.5 Hypothese der Regulierung des Centrin/Transducin-Komplexes durch Ca^{2+} -Aufnahme und Phosphorylierung von Centrinen

Modell einer Ca^{2+} -abhängigen Centrin/Transducin Assemblierung im Verbindungscilium von Vertebraten Photorezeptorzellen. (A) stellt die Situation einer niedrigen Ca^{2+} -Konzentration dar. Hier werden Centrin 1 (C1) und Centrin 2 (C2) durch die Caseinkinase II (CKII) phosphoryliert. Centrin 3 (C3) wird nicht phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung von C1 und C2 findet eine Konformationsänderung statt und C1 und C2 können nicht mit dem heterotrimeren G-Protein Transducin interagieren. Bei hoher Ca^{2+} -Konzentration (B) kommt es zu einer Dephosphorylierung von C1 und C2 im Cilium. Es kann Calcium aufgenommen werden und C1 und C2 interagieren mit Transducin. Damit wird der Translokationsprozess von Transducin gestoppt.

Bei niedriger Ca^{2+} -Konzentration wären die interagierenden Centrine phosphoryliert und würden sich einer Konformationsänderung unterziehen. Durch sterische Hemmung könnten sie somit nicht mit Transducin interagieren [Abb. 5.5 (A)]. Durch die Phosphorylierung könnten die Bindungseigenschaften der einzelnen EF-Hand Motive von Ca^{2+} herabgesetzt werden. Bei einer hohen Ca^{2+} -Konzentration im Verbindungscilium wären die Centrine dephosphoryliert, könnten Ca^{2+} aufnehmen, mit Transducin interagieren und so die Translokation von Transducin stoppen [Abb. 5.5 (B)]. Erste Interaktionsexperimente mit *in vitro* phosphorylierten MmCen1p durch CKII zeigten eine starke Reduktion der Bindung an $\text{G}_i\beta\gamma$ (persönliche Mitteilung Dr. Pulvermüller). Diese Ergebnisse müssen allerdings in weiteren Versuchen evaluiert werden. Bislang durchgeführte Phosphorylierungsexperimente an HeLa-Zellen deuten auf eine Funktion der Phosphorylierung von Centrin 2 bei der Zellteilung hin (Lutz *et al.*, 2001). Da aber in der ausdifferenzierten Retina keine Zellteilung mehr stattfindet, spielt eine mögliche Phosphorylierung der Centrine an den Centrosomen in der Retina eine andere Rolle. Weitere Hinweise auf die Funktion der Phosphorylierung von

Centrin könnten Untersuchungen mit dem nächsten Verwandten der Centrine innerhalb der Parvalbumin Proteinfamilie, dem Calmodulin (Abb. 1.4), ergeben (Hu und Chazin, 2003). Calmodulin ist wie Centrin auch, ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das in allen eukaryotischen Organismen vorkommt und als intrazellulärer Ca^{2+} -Sensor fungiert (Carafoli *et al.*, 1997; Carafoli *et al.*, 2001; Benaim und Villalobo, 2002). In mehreren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Calmodulin unter anderem durch die CKII phosphoryliert wird (Meggio *et al.*, 1987; Nakajo *et al.*, 1988; Joyal *et al.*, 1996). Diese Phosphorylierungen regulieren die Fähigkeit von Calmodulin andere Proteine zu aktivieren (Quadroni *et al.*, 1998). Ähnliche Regulationsmechanismen sind für Centrin (~50% identisch zu Calmodulin) ebenfalls denkbar.

In der vorliegenden Arbeit konnten viele Fragen um die Centrin-Isoformen in der Retina beantwortet werden. Allerdings wurden dadurch viele weitere Fragen aufgeworfen. Im folgenden Abschnitt soll ein Ausblick in die Centrin-Forschung gegeben werden, der Anstöße geben soll, wie die vielen neuen Fragen beantwortet werden könnten:

Es ist immer noch nicht klar, wie Centrine in den Zellen spezifisch positioniert werden. In der Photorezeptorzelle werden alle Centrin-Isoformen exprimiert, sind aber in teilweise unterschiedlichen Kompartimenten lokalisiert (Giebl *et al.*, 2004a). Es sollte geklärt werden, welche Domänen bzw. Sequenzbereiche der Centrin-Isoformen als „Signale“ für ihre differenzielle Positionierung in der Zelle verantwortlich sind. Im Zuge dieser Arbeit wurden bereits murine GFP-markierte Centrin-Isoformen in voller Länge für die Transfektion von Säugetierzelllinien generiert und in ersten Transfektionsversuchen eingesetzt (Abb. 5.1). Diese Vorexperimente weisen darauf hin, dass alle bisher überexprimierten GFP-markierten Centrin-Isoformen in voller Länge im „artificialen Milieu“ von Kulturzellen zu den Centriolen der Centrosomen transportiert werden. Diese Befunde bestätigen bereits publizierte Daten (Lutz *et al.*, 2001; Gavet *et al.*, 2003). Während dieser Arbeit wurden verschiedene Deletionskonstrukte der Centrin-Isoformen hergestellt (Abb. 5.6). Diese könnten in weiteren Experimenten am N- und am C-Terminus mit GFP markiert werden, um herauszufinden, welche Sequenz für den Transport zum Centrosom verantwortlich ist. Um die Lokalisation in der Photorezeptorzelle zu studieren, könnten diese GFP-markierten Deletionskonstrukte z.B. mittels eines Lentivirus Systems in eine Retinakultur transferiert werden, um so die differenziellen Positionierungen der Centrin-Isoformen im Verbindungscilium bzw. am Basalkörper zu untersuchen.

Eine charakteristische Eigenschaft von Proteinen der EF-Hand Superfamilie ist die weite Diversität, Ionen zu binden. Hier unterscheiden sich Proteine in ihrer Kapazität, Affinität und Spezifität (Potter und Gergely, 1975; Milos *et al.*, 1986; Petrova *et al.*, 1995; Feng und Stemmer, 1999; Durussel *et al.*, 2002). Während *Chlamydomonas* Centrin noch vier Ionen in zwei Domänen (vier EF-Hand Motiven) binden kann (Veeraraghavan *et al.*, 2002), besitzen zwar eukaryotische Centrine ebenfalls vier hochkonservierte EF-Hand Motive (Kretsinger, 1976a; Kretsinger, 1976b; Moncrief *et al.*, 1990; Nakayama *et al.*, 1992; Allouche *et al.*, 1999), die aber im Laufe der Evolution teilweise die Fähigkeit verloren haben, Ca^{2+} zu binden (Durussel *et al.*, 2000). Die Bindungsfähigkeiten der EF-Hand Motive sind aber meist nur bei den humanen Centrinen untersucht worden (Durussel *et al.*, 2000; Matei *et al.*, 2003). Deshalb könnte mit radioaktiv markiertem Ca^{2+} (z.B. $^{45}\text{Ca}^{2+}$), die Ca^{2+} -Bindungen an verschiedenen Maus-Centrin Deletionskonstrukten validiert werden, um zu zeigen, welche EF-Hand Motive der Maus-Centrin-Isoformen überhaupt noch Ca^{2+} binden können. Ähnliche Experimente wurden mit MmCen4p schon durchgeführt (Gavet *et al.*, 2003).

Da Centrine ähnliche Aminosäuresequenzen wie Calmodulin besitzen, werden häufig Rückschlüsse auf die Kristallstruktur von Centrin mit Hilfe von Calmodulin geschlossen. In Calmodulin bilden je zwei EF-Hand Motive eine Domäne aus, die über ein flexibles Verbindungsstück verbunden sind. Centrine unterscheiden sich von Calmodulin vor allem durch etwa 20 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus (Levy *et al.*, 1996). Die Proteindatenbank umfasst über 40 Einträge von Calmodulinstrukturen. Hierzu gehört die Proteinstruktur sowohl im nativen Zustand als auch im Komplex mit Ca^{2+} . Durch die Bindung von vier Ca^{2+} -Ionen, zwei an jedem Ende von Calmodulin, werden die ungewöhnlich vielen Met-Reste in den EF-Hand Motiven und andere hydrophobe Aminosäurereste exponiert und somit zwei nicht-polare Furchen für die Interaktion mit nicht-polaren Regionen anderer Proteine ausgebildet. Im Gegensatz hierzu ist noch keine komplette Kristallstruktur von Centrinen bekannt. Bisher konnte nur die Struktur der C-terminalen Hälfte des humanen Centrin 2 im Komplex mit Ca^{2+} aufgeklärt werden (Matei *et al.*, 2003). Interessanterweise bindet die Helix bei diesem verkürzten Protein, das erst mit der zweiten Helix im zweiten EF-Hand Motiv beginnt, Ca^{2+} in der exponierten hydrophoben Furche. Bei einem Centrin Fragment aus *Chlamydomonas reinhardtii* konnte ebenfalls die Struktur des C-Terminus aufgelöst werden (Hu und Chazin, 2003). Bei dem Vergleich der Struktur mit Calmodulin gab es gute Übereinstimmungen. Bemühungen, das komplette Centrin zu kristallisieren, schlugen fehl (Matei *et al.*, 2003). Dies ist

wahrscheinlich auf den im Vergleich zu Calmodulin größeren N-terminalen Bereich zurückzuführen (persönliche Mitteilung Dr. Oliver Ernst, Charité, Berlin). In früheren Arbeiten wurde die Möglichkeit diskutiert, dass dieser Abschnitt für unterschiedliche Funktionen der Centrin-Isoformen verantwortlich ist (Bhattacharya *et al.*, 1993; Salisbury, 1995). So wurde vermutet, dass der N-Terminus mit unterschiedlichen Proteinen interagiert und als eine Art Anker für andere Proteine an Mikrotubuli Organisations Zentren (MTOC) fungiert (Spang *et al.*, 1995; Ivanovska und Rose, 2001). In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Hofmann (Charité, Berlin) könnte die Struktur mit Hilfe der in dieser Arbeit vorgestellten *holo*-Proteine und Deletionskonstrukte (Abb. 5.6) aufgeklärt werden und so Rückschlüsse auf die Interaktionspartner und Interaktionsdomänen von Maus-Centrinen gezogen werden.

In dieser Arbeit wurden Wechselwirkungen zwischen den vier Centrin-Isoformen und dem heterotrimeren G-Protein Transducin identifiziert und charakterisiert (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004a; Giebl *et al.*, 2004b). Dabei wiesen alle Interaktionsexperimente auf eine Ca^{2+} -abhängige Interaktion von Centrin mit der Untereinheiten $\text{G}_i\beta\gamma$ von Transducin hin. Allerdings musste bislang die Frage nach der genauen Interaktionsdomäne zwischen den Molekülen offen bleiben. Für die Identifikation dieser Domäne wurde für weitere *in vitro* Experimente eine Centrin-Isoformen Bibliothek aus rekombinanten GST-Fusions-Polypeptiden relevanter Domänen von Centrinen der Maus hergestellt (Abb. 5.6). Mit diesen Deletionskonstrukten können nun z.B. *in vitro* Bindungsstudien wie „Pull-down“-Experimente durchgeführt werden, um Interaktionsbereiche mit Transducin einzugrenzen.

Weiterhin konnte noch nicht *in vivo* gezeigt werden, ob Centrine die licht-abhängige adaptive Translokation des visuellen G-Proteins Transducin regulieren. Da es noch keine Centrin-defizienten Tiermodelle für die verschiedenen Centrin-Isoformen gibt, könnte man mittels „Gene-Silencing“ (RNAi) die Expression der verschiedenen Centrin-Isoformen in der Retina reduzieren oder möglicherweise auch ganz ausschalten. Letztendlich wird eine mögliche Interferenz zwischen der Reduktion der Expression der Centrin-Isoformen und der licht-abhängigen Translokation von Transducin beabsichtigt. RNAi Experimente für Centrin 2 wurden schon in menschlichen Kulturzellen beschrieben (Salisbury *et al.*, 2002), wo für HsCen2p eine Funktion in der Centriolenduplikation nachgewiesen werden konnte. Auf der Basis von verschiedenen Arbeiten (Salisbury *et al.*, 2002; Dammermann und Merdes, 2002), die an Zellkulturen durchgeführt wurden, soll versucht werden, die

unterschiedlichen Centrin-Isoform Expressionen in einer Maus-Retina-Kultur nach unten zu regulieren, um Effekte in der Transducin Translokation feststellen zu können.

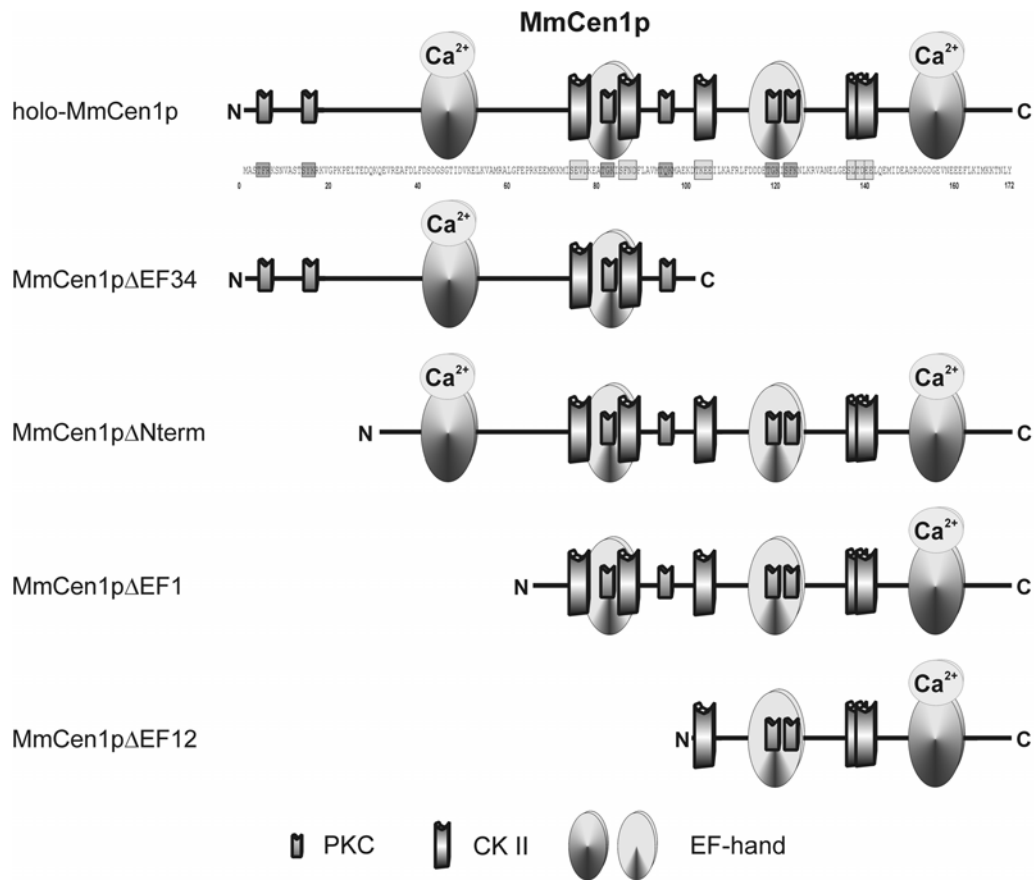


Abbildung 5.6 Schematische Darstellung der MmCen1p-Deletionskonstrukte mit Phosphorylierungsstellen

Es wurden die Phosphorylierungsstellen für die Proteinkinase C (PKC, kleines Rechteck) und CKII (großes Rechteck) dargestellt. Zusätzlich wurden die EF-Hand Motive eingezeichnet. Von den vormalig vier EF-Hand Motiven sind in der Regel bei Säugern nur noch zwei aktiv (bei Centrin 3 nur noch eine), um Ca^{2+} -Ionen zu binden. Diese sind dunkel und die inaktiven hell dargestellt. Die Nomenklatur der Deletionskonstrukte bezieht sich auf den fehlenden Bereich, z.B. fehlt dem Konstrukt MmCen1p Δ EF1 der N-terminale Bereich inklusive des ersten EF-Hand Motives.

Nach wie vor ist noch nicht geklärt, ob Transducin entlang klassischer Cytoskelettelemente oder via gerichteter Diffusion zwischen dem Außen- und Innensegment und *vice versa* transportiert wird (Sokolov *et al.*, 2004). In verschiedenen Experimenten könnten an explantierten Retinae mittels Cytostatika, die das Aktinfilament- und Mikrotubuli-Cytoskelett beeinträchtigen (z.B. die Alkaloide Cytochalasin und Colchicin oder Nocodazol), untersucht werden, welche der Cytoskelettkomponenten für die Transducin Bewegungen notwendig sind. Des Weiteren könnte überprüft werden, ob die treibende Kraft der Transducin Translokation in der Photorezeptorzelle auf dem so

genannten Dunkelstrom beruht und damit elektrogener Natur ist. Dabei könnte man, unter Aufrechterhaltung der metabolischen Aktivität (Kahlert und Hofmann, 1988), dunkel-adaptierte explantierte Mäuseretinae mit α -Toxin und Streptolysin-O permeabilisieren (Walev *et al.*, 2001) und damit den Dunkelstrom der Stäbchenzellen unterbrechen (Pepperberg *et al.*, 1988). Anschließend könnte die Translokation von Transducin in den so behandelten Retinae immunocytochemisch analysiert werden.

In dieser Arbeit konnten Ca^{2+} -abhängige Wechselwirkungen zwischen MmCen1p und mehreren Proteinen aus einem Retinaextrakt dargestellt werden (Abb. 4.19). Für spätere Arbeiten könnten weitere Interaktionsproteine in der Retina mittels „*Overlay Assays*“ identifiziert werden. Dabei könnten die interagierenden Proteine mit MALDI-TOF MS („*matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectroscopy*“) identifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Centrin-Isoformen Cen2, Cen3 und Cen4 zwar mit heterotrimeren G-Proteinen interagieren, jedoch in der Photorezeptorzelle nicht nur bzw. gar nicht im Verbindungscilium, dem bislang untersuchten Kompartiment der Transducin/Centrin Interaktion, zu finden sind. Vorbereitende GST-„*Pull-down Assays*“ mit heterolog exprimierten „ $\text{G}\beta_1\gamma_2$ -Isoformen“ (Weitmann *et al.*, 2001) (Kooperation mit Frau Dr. Kleuss, Charité Berlin), die im Gehirn exprimiert werden, und Centrinen weisen darauf hin, dass Centrine auch mit nicht-nativen G-Proteinen interagieren und zudem an nicht-visuelle $\text{G}\beta\gamma$ -Heterodimer-Kombinationen binden (Abb. 5.7). Mit diesem Versuch konnte die Hypothese von einer Interaktion von Centrin und G-Proteinen an Basalkörpern und Centrosomen unterstützt werden. Außerdem konnte in dieser Arbeit in Immunofluoreszenzanalysen von Retinae mit CKII-Antikörpern Markierungen an den Centrosomen festgestellt werden. Diese Markierungen wurden in weiteren Publikationen bestätigt (Faust und Montanarh, 2000; Faust *et al.*, 2002). Somit ist die CKII auch hier ein Kandidat für die Phosphorylierungen von Centrin 2 und 3 an den Centrosomen, um dort eventuell eine Interaktion oder Verankerung von anderen Proteinen zu regulieren.

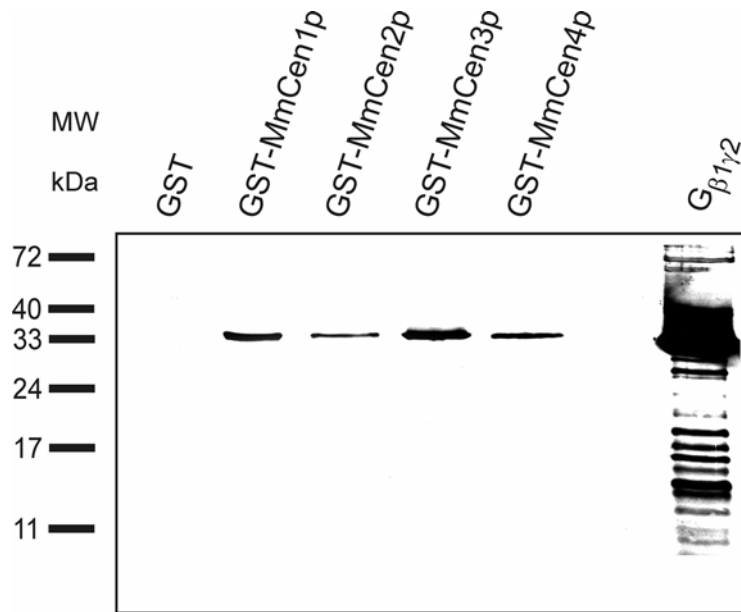


Abbildung 5.7 GST-Centrin „Pull-down Assay“ mit rekombinant hergestellten G-Protein Untereinheiten

GST und GST-Fusionsproteine von Centrin 1 bis 4 wurden mit rekombinant hergestellten G-Protein Untereinheiten $G\beta_1\gamma_2$ (Interaktionspuffer 10 mM $CaCl_2$) inkubiert. Das „Pull-down Assay“ wurde mit Ab gegen β -Untereinheiten auf Western Blots analysiert. In der letzten Spur ($G\beta_1\gamma_2$) wurde das rekombinante Protein aufgetragen und detektiert, welches in den Interaktionsexperimenten eingesetzt wurde. In der ersten Spur (GST) konnte keine Interaktion mit GST und den „Beads“ von den Untereinheiten alleine festgestellt werden. Alle GST-Centrin Fusionsproteine interagieren mit $G\beta_1\gamma_2$ (Spur 2 bis 5).

Weiterhin ist Centrin noch in anderen Sinneszellen lokalisiert. Die RT-PCR-Expressionsstudien in dieser Arbeit zeigten eine Expression aller vier Centrin-Isoformen z.B. im Riechepithel der Ratte. Weiterhin konnten auch schon in Western Blot Analysen und Immunofluoreszenzen eine Expression im Riechepithel gezeigt werden (Wolfrum, 1998). Immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen am olfaktorischen Epithel der Ratte und der Maus zeigten weiter, dass Centrin im olfaktorischen Vesikel der olfaktorischen Zellen sowohl in den Basalkörpern als auch an der Basis der olfaktorischen Cilien in der so genannten Übergangszone lokalisiert ist. Da die olfaktorische Signaltransduktion mit der in der Retina vergleichbar ist und auch hier G-Proteine (G_{olf}) die Signaltransduktionskaskaden steuern, könnten auch hier Interaktionen zwischen Centrinen und G-Proteinen eine wichtige Rolle spielen. Mit den in dieser Arbeiten hergestellten Antikörpern und den etablierten Experimenten, könnten auch im olfaktorischen System die Centrin-Funktion weiter validiert werden.

In den letzten Jahren wurde viel Augenmerk auf Centrin als Centrosomen-Marker geworfen (White *et al.*, 2000) und sogar eine transgene Maus hergestellt, die GFP-markiertes Centrin 2 trägt, welches in allen Zellen exprimiert wird (Higginbotham *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Centrine nicht nur Markerproteine sind, sondern eine Rolle in wichtigen Prozessen der Zellteilung spielen. Weiterhin erbrachte diese Arbeit Hinweise darauf, dass Centrine durch physiologische Modifikationen einen Seitenweg der visuellen Signaltransduktionskaskade für Langzeitadaption in der Retina regeln. (Pulvermüller *et al.*, 2002; Wolfrum *et al.*, 2002; Giebl *et al.*, 2004a; Giebl *et al.*, 2004b).

Zusammenfassung

6. Zusammenfassung

Centrine sind Mitglieder einer hoch konservierten Überfamilie von Ca^{2+} -bindenden Proteinen mit EF-Hand Motiven. Bisher sind vier Centrin-Isoformen bei Säugern beschrieben worden, die in diversen Zellen in der Regel mit Centriolen von Centrosomen oder Centrosomen-verwandten Strukturen assoziiert sind. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden die vier Centrin-Isoformen bezüglich der Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Dabei lag der Hauptfokus auf Untersuchungen der Centrine in den Photorezeptorzellen der Retina. Analysen auf subzellulärer Ebene brachten Klarheit über die differenzielle Lokalisation der verschiedenen Isoformen in der Retina. Mit Hilfe von verschiedenen Methoden konnten Wechselwirkungspartner in der Retina identifiziert werden, die eine Rolle in der visuellen Signaltransduktionskaskade spielen. Dabei könnten Centrine einem Regelmechanismus angehören, der wichtige Translokationsprozesse dieser Proteine regelt.

In den Photorezeptorzellen der Säugetierretina werden die vier Isoformen exprimiert, die in den Strukturen des Cilienapparates differenziell lokalisiert sind. Dabei beschränkt sich ihre Lokalisation entweder auf den Basalkörper (Centrin 4), auf das Verbindungscilium (Centrin 1) oder sie sind in beiden Strukturen zu finden (Centrin 2 und 3). In den nicht-Photorezeptorzellen der Retina sind die Isoformen Centrin 2 und 3 zudem an den Centriolen der Centrosomen lokalisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass alle Centrin-Isoformen in ein und derselben Zelle, der Photorezeptorzelle, koexprimiert werden und dabei subzellulär kolokalisiert sind. Im Weiteren konnte die ubiquitäre Expression von Centrin 2 und 3 in allen untersuchten Geweben an Centrosomen bestätigt werden. Centrin 1 und 4 hingegen werden nur in Geweben mit Cilien-tragenden Zellen exprimiert.

Die Funktion der Centrine wird nicht nur durch Bindung von Ca^{2+} , sondern auch durch Phosphorylierungen reguliert. Alle Sequenzen der Centrine weisen diverse mögliche Phosphorylierungsstellen für unterschiedliche Proteinkinasen auf. Die Ergebnisse aller

durchgeführten *in vitro* und *ex vivo* Phosphorylierungs „Assays“ zeigen eine licht-abhängige Phosphorylierung der Centrin-Isoformen in der Retina. Dabei war in der dunkel-adaptierten Retina die Phosphorylierung vor allem von Centrin 1 und 2 erhöht. Weiterführende Experimente mit Kinase-Inhibitoren wiesen darauf hin, dass vor allem die Proteinkinase CKII eine bedeutende Rolle bei der Centrin-Phosphorylierung in der Retina einnimmt. Centrine sind die ersten Cytoskelettkomponenten, deren Phosphorylierungsgrad licht-abhängig moduliert wird. Diese Ergebnisse weisen auf einen Signalweg, der zwischen der visuellen Signaltransduktionskaskade und der Regulation der Centrin-Aktivität vermittelt, hin.

Bei der Suche nach Centrin-Bindungspartnern gelang mit Hilfe von Centrin 1 Blot „Overlay Assays“ der Durchbruch. Der neuartige Ansatz zeigte, dass ausschließlich Ca^{2+} -aktiviertes Centrin 1 mit Proteinen aus der Retina interagiert. Nach der Identifikation eines 37 kDa-Proteins als die β -Untereinheit des visuellen G-Proteins Transducin wurden die Untersuchungen auf diesen Interaktionspartner fokussiert. Die Ergebnisse der hier durchgeführten biochemischen und biophysikalischen Protein-Protein Interaktionsexperimente zeigen insgesamt folgendes:

- ♥ Alle vier Centrine interagieren mit Transducin, wobei Centrin 3 die geringste Affinität zu Transducin hat.
- ♥ Die Assemblierung der Centrin•G-Protein-Komplexe ist strikt Ca^{2+} -abhängig.
- ♥ Die Centrine binden sowohl an das isolierte $\text{G}_t\beta\gamma$ -Heterodimer als auch an den heterotrimeren *Gt-holo*-Proteinkomplex, nicht aber an $\text{G}_t\alpha$.

Die quantitativen immunoelektronenmikroskopischen Analysen zeigen im Weiteren, dass sich die Komplexe aus Transducin und Centrin 1 bis 3 wahrscheinlich in einer Subdomäne des Verbindungsciliums der Photorezeptorzellen ausbilden. Dabei dürfte die Ausbildung der Komplexe an der Regulation der lichtinduzierten Translokation von Transducin zwischen Innen- und Außensegment der Photorezeptorzellen beteiligt sein. Dieser Translokationsmechanismus wird als ein wichtiger Bestandteil der Langzeitadaptation der Signaltransduktionskaskade der Säugerretina diskutiert. Der neuartige Regelmechanismus der molekularen Translokationen, in dem Centrine involviert sind, ist außergewöhnlich und dürfte über die speziellen Photorezeptorzellen hinaus von weit reichender Bedeutung sein.

Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

Adams IR, Kilmartin JV (2000) Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol.* 10: 329-335

Allen RD, Aihara MS, Fok AK (1998) The striated bands of *Paramecium* are immunologically distinct from the centrin-specific infraciliary lattice and cytostomal cord. *J.Eukaryot.Microbiol.* 45: 202-209

Allouche D, Parello J, Sanejouand YH (1999) Ca²⁺/Mg²⁺ exchange in parvalbumin and other EF-hand proteins. A theoretical study. *J.Mol.Biol.* 285: 857-873

Amos WB (1975) Contraction and calcium binding in the vorticellid ciliates. *Soc.Gen.Physiol Ser.* 30: 411-436

Arikawa K, Williams DS (1989) Organization of actin filaments and immunocolocalization of alpha-actinin in the connecting cilium of rat photoreceptors. *J Comp Neurol.* 288: 640-646

Arshavsky VY (2002) Rhodopsin phosphorylation: from terminating single photon responses to photoreceptor dark adaptation. *Trends Neurosci.* 25: 124-126

Arshavsky VY (2003) Protein translocation in photoreceptor light adaptation: a common theme in vertebrate and invertebrate vision. *Sci.STKE.* 2003: E43

Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annu.Rev.Physiol* 64: 153-187

Asai H, Ochiai T, Fukui K, Watanabe M, Kano F (1978) Improved preparation and cooperative calcium contraction of glycerinated *Vorticella*. *J.Biochem.(Tokyo)* 83: 795-798

Asbury CL, Fehr AN, Block SM (2003) Kinesin moves by an asymmetric hand-over-hand mechanism. *Science* 302: 2130-2134

Bähner M, Frechter S, Da Silva N, Minke B, Paulsen R, Huber A (2002) Light-regulated subcellular translocation of *Drosophila* TRPL channels induces long-term adaptation and modifies the light-induced current. *Neuron* 34: 83-93

Barbato G, Ikura M, Kay LE, Pastor RW, Bax A (1992) Backbone dynamics of calmodulin studied by ¹⁵N relaxation using inverse detected two-dimensional NMR spectroscopy: the central helix is flexible. *Biochemistry* 31: 5269-5278

- Baron AT, Errabolu R, Dinusson J, Salisbury JL (1995) Centrin-based contractile fibers: Chromatographic purification of centrin. In: Dentler WL, Witman GB (ed) *Methods in Cell Biology* Vol.47: Cilia and Flagella Academic Press, San Diego 47: 341-351
- Baron AT, Greenwood TM, Bazinet CW, Salisbury JL (1992) Centrin is a component of the pericentriolar lattice. *Biol.Cell* 76: 383-388
- Baron AT, Greenwood TM, Salisbury JL (1991) Localization of the Centrin-Related 165,000-Mr Protein of PtK2 Cells During the Cell Cycle. *Cell Motil.Cytoskeleton* 18: 1-14
- Baron AT, Salisbury JL (1991) The Centrin-Related Pericentriolar Lattice of Metazoan Centrosomes. *Comparative Spermatology.20.Years.After.* 75: 285-289
- Baron AT, Suman VJ, Nemeth E, Salisbury JL (1994) The pericentriolar lattice of PtK2 cells exhibits temperature and calcium-modulated behavior. *J.Cell Sci.* 107: 2993-3003
- Baum P, Furlong C, Byers BE (1986) Yeast gene required for spindle pole body duplication: Homology of its product with Ca²⁺-binding proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 83: 5512-5516
- Baum P, Yip C, Goetsch L, Byers B (1988) A yeast gene essential for regulation of spindle pole duplication. *Mol.Cell Biol.* 8: 5386-5397
- Benaim G, Villalobo A (2002) Phosphorylation of calmodulin. Functional implications. *Eur.J.Biochem.* 269: 3619-3631
- Bershadsky AD, Vasiliev JM (1988) *Cytoskeleton (entsprechende Abschnitte)*. Plenum Press, New York London
- Besharse, Horst CJ (1990) The photoreceptor connecting cilium - a model for the transition zone. In: Bloodgood RA (ed) *Ciliary and flagellar membranes*. Plenum, New York, pp 389-417
- Besharse JC, Janson MM, Liang MY (1999) Cytosolic dynein in ciliary axonemes and outer segments of photoreceptors. *Molecular Biology Of The Cell* 10: 368a
- Bhattacharya D, Steinkötter J, Melkonian M (1993) Molecular cloning and evolutionary analysis of the calcium-modulated contractile protein, centrin, in green algae and land plants. *Plant Molecular Biology* 23(6): 1243-1254
- Biggins S, Rose M (1994) Direct interaction between yeast spindle pole body components: Kar1p is required for Cdc31p localization to the spindle pole. *J.Cell Biol.* 125: 843-852
- Blatt EN, Yan XH, Wuerffel MK, Hamilos DL, Brody SL (1999) Forkhead transcription factor HFH-4 expression is temporally related to ciliogenesis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 21: 168-176
- Boeda B, El Amraoui A, Bahloul A, Goodyear R, Daviet L, Blanchard S, Perfettini I, Fath KR, Shorte S, Reiners J, Houdusse A, Legrain P, Wolfrum U, Richardson G, Petit C (2002) Myosin VIIa, harmonin and cadherin 23, three Usher I gene products that cooperate to shape the sensory hair cell bundle. *EMBO J.* 21: 6689-6699

- Bornens M (2002) Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14: 25-34
- Bouckson-Castaing V, Moudjou M, Ferguson DJ, Mucklow S, Belkaid Y, Milon G, Crocker PR (1996) Molecular characterisation of ninein, a new coiled-coil protein of the centrosome. *J.Cell Sci.* 109 (Pt 1): 179-190
- Boycott B, Wässle H (1999) Parallel processing in the mammalian retina: the Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 40: 1313-1327
- Brandstätter JH, Hack I (2001) Localization of glutamate receptors at a complex synapse. The mammalian photoreceptor synapse. *Cell Tissue Res.* 303: 1-14
- Brandstätter JH, Koulen P, Wässle H (1998) Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Res.* 38: 1385-1397
- Brann MR, Cohen LV (1987) Diurnal expression of transducin mRNA and translocation of transducin in rods of rat retina. *Science* 235: 585-587
- Brody SL, Yan XH, Wuerffel MK, Song SK, Shapiro SD (2000) Ciliogenesis and left-right axis defects in forkhead factor HFH-4-null mice. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 23: 45-51
- Broekhuysen RM, Tolhuizen EF, Janssen AP, Winkens HJ (1985) Light induced shift and binding of S-antigen in retinal rods. *Curr.Eye Res.* 4: 613-618
- Burns ME, Baylor DA (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu.Rev.Neurosci.* 24:779-805.: 779-805
- Buttery SM, Ekman GC, Seavy M, Stewart M, Roberts TM (2003) Dissection of the *Ascaris* sperm motility machinery identifies key proteins involved in major sperm protein-based amoeboid locomotion. *Mol.Biol.Cell* 14: 5082-5088
- Byers B (1981a) Cytology of the yeast life cycle. In: Strathern JN, Jones EW, Broach JR (ed) *The Molecular Biology Of The Yeast Saccharomyces: Life Cycle And Inheritance.* Cold Spring Harbor Lab Press, New York: 59-87
- Byers B (1981b) Multiple roles of the spindle pole body in the life cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. In: Wettstein D, Stenderup A, Kielland-Brand M, Friis J (ed) *Molekular genetics in yeast.* Alfred Benzon Symp., Munksgaard, Copenhagen 16: 119-133
- Callaini G, Riparbelli MG, Dallai R (1999) Centrosome inheritance in insects: Fertilization and parthenogenesis. *Biol.Cell* 91: 355-366
- Carafoli E, Nicotera P, Santella L (1997) Calcium signalling in the cell nucleus. *Cell Calcium* 22: 313-319
- Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M (2001) Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev.Biochem.Mol.Biol.* 36: 107-260
- Chaitin MH, Bok D (1986) Immunoferritin localization of actin in retinal photoreceptors. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 27: 1764-1767

- Chaitin MH, Burnside B (1989) Actin filament polarity at the site of rod outer segment disk morphogenesis. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 30: 2461-2469
- Chaitin MH, Coelho N (1992) Immunogold localization of myosin in the photoreceptor cilium. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 33: 3103-3108
- 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
- Cismowski MJ, Takesono A, Bernard ML, Duzic E, Lanier SM (2001) Receptor-independent activators of heterotrimeric G-proteins. *Life Sci.* 68: 2301-2308
- Cohen P (1989) The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu.Rev.Biochem.* 58: 453-508
- 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: 993-1008
- Coling DE, Salisbury JL (1992) Characterization of the calcium-binding contractile protein centrin from *Tetraselmis striata* (Pleurostrophyceae). *J Protozool.* 39: 385-391
- Correa G, Morgado-Diaz JA, Benchimol M (2004) Centrin in *Giardia lamblia* - ultrastructural localization. *FEMS Microbiol.Lett.* 233: 91-96
- Cronin MA, Diao F, Tsunoda S (2004) Light-dependent subcellular translocation of Gq $\{\alpha\}$ in *Drosophila* photoreceptors is facilitated by the photoreceptor-specific myosin III NINAC. *J.Cell Sci.* 117: 4797-4806
- Crute BE, Van Buskirk RG (1992) A casein kinase-like kinase phosphorylates beta-tubulin and may be a microtubule-associated protein. *J.Neurochem.* 59: 2017-2023
- Czihak G, Langer H, Ziegler H (1996) *Biologie*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- D'Assoro AB, Stivala F, Barrett S, Ferrigno G, Salisbury JL (2001) GFP-centrin as a marker for centriole dynamics in the human breast cancer cell line MCF-7. *Ital.J.Anat.Embryol.* 106: 103-110
- Dammermann A, Merdes A (2002) Assembly of centrosomal proteins and microtubule organization depends on PCM-1. *J.Cell Biol.* 159: 255-266
- Danscher G (1981) Localization of gold in biological tissue. A photochemical method for light and electronmicroscopy. *Histochemistry* 71: 81-88
- Delattre M, Gonczy P (2004) The arithmetic of centrosome biogenesis. *J.Cell Sci.* 117: 1619-1630
- Delvecchio AJ, Harper JDI, Vaughn KC, Baron AT, Salisbury JL, Overall RL (1997) Centrin homologues in higher plants are prominently associated with the developing cell plate. *Protoplasma* 196: 224-234

- Downing KH, Nogales E (1998) Tubulin and microtubule structure. *Curr.Opin.Cell Biol.* 10: 16-22
- Doxsey S (2001) Re-evaluating centrosome function. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2: 688-698
- Durussel I, Blouquit Y, Middendorp S, Craescu CT, Cox JA (2000) Cation- and peptide-binding properties of human centrin 2. *FEBS Lett.* 472: 208-212
- Durussel I, Mehul B, Bernard D, Schmidt R, Cox JA (2002) Cation- and peptide-binding properties of human calmodulin-like skin protein. *Biochemistry* 41: 5439-5448
- Dutcher SK (2003) Elucidation of basal body and centriole functions in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Traffic.* 4: 443-451
- Edelman AM, Blumenthal DK, Krebs EG (1987) Protein serine/threonine kinases. *Annu.Rev.Biochem.* 56: 567-613
- Elias RV, Sezate SS, Cao W, Mcginnis JF (2004) Temporal kinetics of the light/dark translocation and compartmentation of arrestin and alpha-transducin in mouse photoreceptor cells. *Mol.Vis.* 10:672-81.: 672-681
- Errabolu R, Sanders MA, Salisbury JL (1994) Cloning of a cDNA encoding human centrin, an EF-hand protein of centrosomes and mitotic spindle poles. *J.Cell Sci.* 107: 9-16
- Evans JP, Schultz RM, Kopf GS (1995) Identification and localization of integrin subunits in oocytes and eggs of the mouse. *Mol.Reprod.Dev.* 40: 211-220
- Fain GL, Matthews HR (1990) Calcium and the mechanism of light adaptation in vertebrate photoreceptors. *Trends.Neurosci.* 13: 378-384
- Fain GL, Matthews HR, Cornwall MC, Koutalos Y (2001) Adaptation in vertebrate photoreceptors. *Physiol Rev.* 81: 117-151
- Fain GL, Schroder WH (1985) Calcium content and calcium exchange in dark-adapted toad rods. *J.Physiol* 368: 641-665
- Fang J, Zhang B, Chen N, Asai H (2004) Chemical modification of glycerinated stalks shows tyrosine residues essential for spasmoneme contraction of *Vorticella* sp. *Zoolog.Sci.* 21: 527-532
- Fariss RN, Molday RS, Fisher SK, Matsumoto B (1997) Evidence from normal and degenerating photoreceptors that two outer segment integral membrane proteins have separate transport pathways. *J Comp Neurol.* 387: 148-156
- Faust M, Gunther J, Morgenstern E, Montenarh M, Gotz C (2002) Specific localization of the catalytic subunits of protein kinase CK2 at the centrosomes. *Cell Mol.Life Sci.* 59: 2155-2164
- Faust M, Montenarh M (2000) Subcellular localization of protein kinase CK2. A key to its function? *Cell Tissue Res.* 301: 329-340

- Feng B, Stemmer PM (1999) Interactions of calcineurin A, calcineurin B, and Ca^{2+} . *Biochemistry* 38: 12481-12489
- Fischer T, Rodriguez-Navarro S, Pereira G, Racz A, Schiebel E, Hurt E (2004) Yeast centrin Cdc31 is linked to the nuclear mRNA export machinery. *Nat.Cell Biol.* 6: 840-848
- Fox LA, Sale WS (1987) Direction of force generated by the inner row of dynein arms on flagellar microtubules. *J Cell Biol.* 105: 1781-1787
- Frixione E (2000) Recurring views on the structure and function of the cytoskeleton: a 300-year epic. *Cell Motil.Cytoskeleton* 46: 73-94
- Fuchs E, Karakesisoglou I (2001) Bridging cytoskeletal intersections. *Genes Dev.* 15: 1-14
- Gaudet R, Bohm A, Sigler PB (1996) Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin. *Cell* 87: 577-588
- Gavet O, Alvarez C, Gaspar P, Bornens M (2003) Centrin4p, a novel Mammalian centrin specifically expressed in ciliated cells. *Mol.Biol.Cell* 14: 1818-1834
- Geier BM, Wiech H, Schiebel E (1996) Binding of centrin and yeast calmodulin to synthetic peptides corresponding to binding sites in the spindle pole body components Kar1p and Spc110p. *J.Biol.Chem.* 271: 28366-28374
- Geiser JR, Sundberg HA, Chang BH, Muller EG, Davis TN (1993) The essential mitotic target of calmodulin is the 110-kilodalton component of the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 13: 7913-7924
- Giebl A, Pulvermüller A, Trojan P, Park JH, Choe HW, Ernst OP, Hofmann KP, Wolfrum U (2004a) Differential expression and interaction with the visual G-protein transducin of centrin isoforms in mammalian photoreceptor cells. *J.Biol.Chem.*(in press: www.jbc.org).
- Giebl A, Trojan P, Pulvermüller A, Wolfrum U (2004b) Centrins, potential regulators of transducin translokation in photoreceptor cells. In: Williams DS (ed) *Cell biology and related disease of the outer retina* World Scientific Publishing Company Pte. Ltd., Singapore: 122-195
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu.Rev.Biochem.* 56:615-49
- Goldman RD, Goldman AE, Green KJ, Jones JC, Jones SM, Yang HY (1986) Intermediate filament networks: organization and possible functions of a diverse group of cytoskeletal elements. *J.Cell Sci.Suppl* 5: 69-97
- Goldstein B (2003) Asymmetric division: AGS proteins position the spindle. *Curr.Biol.* 13: R879-R880
- Gonda K, Yoshida A, Oami K, Takahashi M (2004) Centrin is essential for the activity of the ciliary reversal-coupled voltage-gated Ca^{2+} channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 323: 891-897

- Goodson HV, Valetti C, Kreis TE (1997) Motors and membrane traffic. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 18-28
- Gotta M, Ahringer J (2001a) Axis determination in *C. elegans*: initiating and transducing polarity. *Curr.Opin.Genet.Dev.* 11: 367-373
- Gotta M, Ahringer J (2001b) Distinct roles for Galpha and Gbetagamma in regulating spindle position and orientation in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nat.Cell Biol.* 3: 297-300
- Grummann A (2000) Die Protein-Phosphatase Typ1 γ 1 in der Retina - Identifizierung und subzelluläre Lokalisierung. Dissertation Philipps-Universität Marburg
- Guerra C, Wada Y, Leick V, Bell A, Satir P (2003) Cloning, localization, and axonemal function of *Tetrahymena* centrin. *Mol.Biol.Cell* 14: 251-261
- Gustin MC, Nelson DL (1987) Regulation of ciliary adenylate cyclase by Ca²⁺ in *Paramecium*. *Biochem.J.* 246: 337-345
- Hardie R (2002) Adaptation through translocation. *Neuron* 34: 3-5
- Harlow E, Lane D (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, New York
- Hart PE, Glantz JN, Orth JD, Poynter GM, Salisbury JL (1999) Testis-specific murine centrin, *Cetn1*: genomic characterization and evidence for retroposition of a gene encoding a centrosome protein. *Genomics* 60: 111-120
- Hart PE, Poynter GM, Whitehead CM, Orth JD, Glantz JN, Busby RC, Barrett SL, Salisbury JL (2001) Characterization of the X-linked murine centrin *Cetn2* gene. *Gene* 264: 205-213
- Hartley JL, Temple GF, Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 10: 1788-1795
- Hayashi M, Yagi T, Yoshimura K, Kamiya R (1998) Real-time observation of Ca²⁺-induced basal body reorientation in *Chlamydomonas*. *Cell Motil.Cytoskeleton* 41: 49-56
- Heck M, Hofmann KP (2001) Maximal rate and nucleotide dependence of rhodopsin-catalyzed transducin activation: initial rate analysis based on a double displacement mechanism. *J.Biol.Chem.* 276: 10000-10009
- Heck M, Pulvermuller A, Hofmann KP (2000) Light scattering methods to monitor interactions between rhodopsin-containing membranes and soluble proteins. *Methods Enzymol.* 315: 329-347
- Helps NR, Luo X, Barker HM, Cohen PT (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem.J.* 349: 509-518

- Herrmann H, Strelkov SV, Feja B, Rogers KR, Brettel M, Lustig A, Haner M, Parry DA, Steinert PM, Burkhard P, Aebi U (2000) The intermediate filament protein consensus motif of helix 2B: its atomic structure and contribution to assembly. *J.Mol.Biol.* 298: 817-832
- Hesse M, Magin TM, Weber K (2001) Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J.Cell Sci.* 114: 2569-2575
- Higginbotham H, Bielas S, Tanaka T, Gleeson JG (2004) Transgenic mouse line with green-fluorescent protein-labeled Centrin 2 allows visualization of the centrosome in living cells. *Transgenic Res.* 13: 155-164
- Hoffmann-Berling H (1958) The mechanism of a new contraction cycle differing from muscle contraction. *Biochim.Biophys.Acta* 27: 247-255
- Hofmann KP, Ernst OP (2001) [To see from light--biophysics of visual signal transduction]. *Z.Med.Phys.* 11: 217-225
- 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(2): 114-127
- Hong DH, Pawlyk BS, Shang J, Sandberg MA, Berson EL, Li T (2000) A retinitis pigmentosa GTPase regulator (RPGR)-deficient mouse model for X-linked retinitis pigmentosa (RP3). *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97: 3649-3654
- Horio T, Uzawa S, Jung MK, Oakley BR, Tanaka K, Yanagida M (1991) The fission yeast gamma-tubulin is essential for mitosis and is localized at microtubule organizing centers. *J.Cell Sci.* 99 (Pt 4): 693-700
- Horst CJ, Forestner DM, Besharse JC (1987) Cytoskeletal-membrane interactions: a stable interaction between cell surface glycoconjugates and doublet microtubules of the photoreceptor connecting cilium. *J.Cell Biol.* 105: 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 Motil.Cytoskeleton* 17: 329-344
- Hu H, Chazin WJ (2003) Unique features in the C-terminal domain provide caltractin with target specificity. *J.Mol.Biol.* 330: 473-484
- Huang B, Mengerson A, Lee VD (1988) Molecular cloning of cDNA for caltractin, a basal body-associated Ca²⁺-binding protein: homology in its protein sequence with calmodulin and the yeast CDC31 gene product. *J.Cell Biol.* 107: 133-140
- Hunter T (1987) A thousand and one protein kinases. *Cell* 50: 823-829
- Itabashi T, Mikami K, Asai H (2003) Characterization of the spasmin 1 gene in *Zoothamnium arbuscula* strain Kawagoe (protozoa, ciliophora) and its relation to other spasmins and centrins. *Res.Microbiol.* 154: 361-367

- Ivanovska I, Rose MD (2001) Fine structure analysis of the yeast centrin, Cdc31p, identifies residues specific for cell morphology and spindle pole body duplication. *Genetics* 157: 503-518
- Jan LY, Jan YN (1997) Receptor-regulated ion channels. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 155-160
- Jaspersen SL, Giddings TH, Jr., Winey M (2002) Mps3p is a novel component of the yeast spindle pole body that interacts with the yeast centrin homologue Cdc31p. *J.Cell Biol.* 159: 945-956
- Joyal JL, Crimmins DL, Thoma RS, Sacks DB (1996) Identification of insulin-stimulated phosphorylation sites on calmodulin. *Biochemistry* 35: 6267-6275
- Kahlert M, Hofmann KP (1988) *In situ* investigation of the amplification mechanism in retinal rods. In: Schmid ED, Schneider FW, Siebert F (ed) *Spectroscopy of Biological Molecules - New advances*. Wiley: 483-486
- Kamal A, Goldstein LS (2002) Principles of cargo attachment to cytoplasmic motor proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 14: 63-68
- Karsenti E, Vernos I (2001) The mitotic spindle: a self-made machine. *Science* 294: 543-547
- Kellogg DR, Moritz M, Alberts BM (1994) The centrosome and cellular organization. *Annu.Rev.Biochem.* 63: 639-674
- Kennedy MJ, Dunn FA, Hurley JB (2004) Visual pigment phosphorylation but not transducin translocation can contribute to light adaptation in zebrafish cones. *Neuron* 41: 915-928
- Khalfan W, Ivanovska I, Rose MD (2000) Functional interaction between the *PKC1* pathway and *CDC31* network of SPB duplication genes. *Genetics* 155: 1543-1559
- Kilmartin JV (2003) Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J.Cell Biol.* 162: 1211-1221
- King SM, Wilkerson CG, Witman GB (1991) The Mr 78,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein interacts with alpha-tubulin in situ. *J Biol.Chem.* 266: 8401-8407
- King SM, Witman GB (1990) Localization of an intermediate chain of outer arm dynein by immunoelectron microscopy. *J Biol.Chem.* 265: 19807-19811
- Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y, Nishizuka Y (1985) Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 260: 12492-12499
- Klumpp S, Kleefeld G, Schultz JE (1983) Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclase of the excitable ciliary membrane from *Paramecium*. Dissociation of calmodulin by La³⁺: calmodulin specificity and properties of the reconstituted guanylate cyclase. *J.Biol.Chem.* 258: 12455-12459

- Knust E (2001) G protein signaling and asymmetric cell division. *Cell* 107: 125-128
- Koblenz B, Schoppmeier J, Grunow A, Lechtreck KF (2003) Centrin deficiency in *Chlamydomonas* causes defects in basal body replication, segregation and maturation. *J.Cell Sci.* 116: 2635-2646
- Kolb H (2003) How the Retina Works. *American Scientist* 91: 28-35
- Kolb H, Marshak D (2003) The midget pathways of the primate retina. *Doc.Ophthalmol.* 106: 67-81
- Kolb HMH (1991) *Vergleichende Histologie: Cytologie und Mikroanatomie der Tiere (entsprechende Abschnitte)*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg
- Kosloff M, Elia N, Joel-Almagor T, Timberg R, Zars TD, Hyde DR, Minke B, Selinger Z (2003) Regulation of light-dependent Gqalpha translocation and morphological changes in fly photoreceptors. *EMBO J.* 22: 459-468
- Kouklis PD, Hutton E, Fuchs E (1994) Making a connection: direct binding between keratin intermediate filaments and desmosomal proteins. *J.Cell Biol.* 127: 1049-1060
- Kozminski KG, Beech PL, Rosenbaum JL (1995) The *Chlamydomonas* kinesin-like protein FLA10 is involved in motility associated with the flagellar membrane. *J.Cell Biol.* 131: 1517-1527
- Kozminski KG, Forscher P, Rosenbaum JL (1998) Three flagellar motilities in *Chlamydomonas* unrelated to flagellar beating. Video supplement. *Cell Motil.Cytoskeleton* 39: 347-348
- 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
- Kretsinger RH (1976a) Calcium-binding proteins. *Annu.Rev.Biochem.* 45: 239-266
- Kretsinger RH (1976b) Evolution and function of calcium-binding proteins. *Int.Rev.Cytol.* 46: 323-93
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-682
- Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu.Rev.Biochem.* 58: 913-949
- 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.* 113(8): 1355-1364
- Lechtreck KF, Melkonian M (1991) Striated microtubule-associated fibers: identification of assemblin, a novel 34-kD protein that forms paracrystals of 2-nm filaments in vitro. *J.Cell Biol.* 115: 705-716

- LeDizet M, Beck JC, Finkbeiner WE (1998) Differential regulation of centrin genes during ciliogenesis in human tracheal epithelial cells. *Am.J.Physiol* 275: L1145-L1156
- Lee RH, Lieberman BS, Lolley RN (1987) A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and subunit structure. *Biochemistry* 26: 3983-3990
- Lee VD, Huang B (1993) Molecular cloning and centrosomal localization of human caltractin. *Pro.Natl.Acad.Sci.USA* 90: 11039-11043
- Leonhardt H (1990) Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie III. Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen (entsprechende Abschnitte). Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Levy YY, Lai EY, Remillard SP, Heintzelman MB, Fulton C (1996) Centrin is a conserved protein that forms diverse associations with centrioles and MTOCs in *Naegleria* and other organisms. *Cell Motil.Cytoskeleton* 33: 298-323
- Li D, Dobrowolska G, Krebs EG (1996) The physical association of casein kinase 2 with nucleolin. *J.Biol.Chem.* 271: 15662-15668
- Liao B, Paschal BM, Luby-Phelps K (1999) Mechanism of Ca²⁺-dependent nuclear accumulation of calmodulin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96: 6217-6222
- Lim L, Zhou H, Costa RH (1997) The winged helix transcription factor HFH-4 is expressed during choroid plexus epithelial development in the mouse embryo. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94: 3094-3099
- Lingle WL, Lutz WH, Ingle JN, Maihle NJ, Salisbury JL (1998) Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95: 2950-2955
- Liu X, Udovichenko IP, Brown S.D., Steel KP, Williams DS (1999a) Myosin VIIA is required for normal opsin transport through the photoreceptor cilium. *Invest.Ophthalmol.Visual Sci.* 40
- Liu X, Udovichenko IP, Brown SD, Steel KP, Williams DS (1999b) Myosin VIIa participates in opsin transport through the photoreceptor cilium. *J.Neurosci.* 19: 6267-6274
- Liu X, Vansant G, Udovichenko IP, Wolfrum U, Williams DS (1997) Myosin VIIa, the product of the Usher 1B syndrome gene, is concentrated in the connecting cilia of photoreceptor cells. *Cell Motil.Cytoskeleton* 37: 240-252
- Luo YR (2000) Why is the human visual system sensitive only to light of wavelengths from approximately 760 to 380 nm? An answer from thermochemistry and chemical kinetics. *Biophys.Chem.* 83: 179-184
- Lutz W, Lingle WL, McCormick D, Greenwood TM, Salisbury JL (2001) Phosphorylation of centrin during the cell cycle and its role in centriole separation preceding centrosome duplication. *J Biol Chem* 276(23): 20774-20780
- Mack GJ, Ou YC, Rattner JB (2000) Integrating centrosome structure with protein composition and function in animal cells. *Microsc.Res.Technique.* 49: 409-419

- Madeddu L, Klotz C, Lecaer JP, Beisson J (1996) Characterization of centrin genes in *Paramecium*. *Eur.J Biochem.* 238: 121-128
- Mangini NJ, Pepperberg DR (1988) Immunolocalization of 48K in rod photoreceptors. Light and ATP increase OS labeling. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 29: 1221-1234
- Mann IC (1964) *The Development of the human eye.* British Medical Association, London
- Marshall WF, Rosenbaum JL (2000) How centrioles work: lessons from green yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* 12: 119-125
- 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: 175-187
- Martindale VE, Salisbury JL (1990) Phosphorylation of algal centrin is rapidly responsive to changes in the external milieu. *J.Cell Sci.* 96: 395-402
- Matei E, Miron S, Blouquit Y, Duchambon P, Durussel I, Cox JA, Craescu CT (2003) C-terminal half of human centrin 2 behaves like a regulatory EF-hand domain. *Biochemistry* 42: 1439-1450
- Matsusaka T (1974) Membrane particles of the connecting cilium. *J.Ultrastruct.Res.* 48: 305-312
- Matthews HR, Fain GL (2001) A light-dependent increase in free Ca^{2+} concentration in the salamander rod outer segment. *J.Physiol* 532: 305-321
- McFadden GI, Schulze D, Surek B, Salisbury JL, Melkonian M (1987) Basal body reorientation mediated by a Ca^{2+} -modulated contractile protein. *J Cell Biol.* 105: 903-912
- McGinnis JF, Matsumoto B, Whelan JP, Cao W (2002) Cytoskeleton participation in subcellular trafficking of signal transduction proteins in rod photoreceptor cells. *J.Neurosci.Res.* 67: 290-297
- McIntosh JR, Hering GE (1991) Spindle fiber action and chromosome movement. *Annu.Rev.Cell Biol.* 7: 403-426
- Meador WE, Means AR, Quijcho FA (1993) Modulation of calmodulin plasticity in molecular recognition on the basis of x-ray structures. *Science* 262: 1718-1721
- Meggio F, Brunati AM, Pinna LA (1987) Polycation-dependent, Ca^{2+} -antagonized phosphorylation of calmodulin by casein kinase-2 and a spleen tyrosine protein kinase. *FEBS Lett.* 215: 241-246
- Melia TJ, Jr., Cowan CW, Angleson JK, Wensel TG (1997) A comparison of the efficiency of G protein activation by ligand-free and light-activated forms of rhodopsin. *Biophys.J.* 73: 3182-3191
- Melkonian M, Beech PL, Katsaros C, Schulze D (1992) Centrin-mediated cell motility in algae. In: Melkonian M (ed) *Algal Cell Motility.* Chapman and Hall Inc., New York: 179-221

- Mendez A, Lem J, Simon M, Chen J (2003) Light-dependent translocation of arrestin in the absence of rhodopsin phosphorylation and transducin signaling. *J.Neurosci.* 23: 3124-3129
- Meng TC, Aley SB, Svard SG, Smith MW, Huang B, Kim J, Gillin FD (1996) Immunolocalization and sequence of caltractin/centrin from the early branching eukaryote *Giardia lamblia*. *Mol.Biochem.Parasitol.* 79: 103-108
- Middendorp S, Kuntziger T, Abraham Y, Holmes S, Bordes N, Paintrand M, Paoletti A, Bornens M (2000) A role for centrin 3 in centrosome reproduction. *J Cell Biol* 148(3): 405-415
- Middendorp S, Paoletti A, Schiebel E, Bornens M (1997) Identification of a new mammalian centrin gene, more closely related to *Saccharomyces cerevisiae* CDC31 gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 94: 9141-9146
- Milos M, Schaer JJ, Comte M, Cox JA (1986) Calcium-proton and calcium-magnesium antagonisms in calmodulin: microcalorimetric and potentiometric analyses. *Biochemistry* 25: 6279-6287
- Molday RS, Kaupp UB (2000) Ion channels of vertebrate photoreceptors. In: Stavenga DG, DeGrip WJ, Pugh EN Jr (ed) *Molecular mechanism in visual transduction* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 143-182
- Moncrief ND, Kretsinger RH, Goodman M (1990) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. I. Relationships based on amino acid sequences. *J.Mol.Evol.* 30: 522-562
- Müller F, Kaupp UB (1998) Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften* 85: 49-61
- Nakajo S, Masuda Y, Nakaya K, Nakamura Y (1988) Determination of the phosphorylation sites of calmodulin catalyzed by casein kinase 2. *J.Biochem.(Tokyo)* 104: 946-951
- Nakayama S, Moncrief ND, Kretsinger RH (1992) Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *J.Mol.Evol.* 34: 416-448
- Nigg EA (1992) Assembly and cell cycle dynamics of the nuclear lamina. *Semin.Cell Biol.* 3: 245-253
- Nogales E (1999) A structural view of microtubule dynamics. *Cell Mol.Life Sci.* 56: 133-142
- Obata S, Usukura J (1992) Morphogenesis of the photoreceptor outer segment during postnatal development in the mouse (BALB/c) retina. *Cell Tissue Res.* 269: 39-48
- Offermanns S (2003) G-proteins as transducers in transmembrane signalling. *Prog.Biophys.Mol.Biol.* 83: 101-130
- Ogawa K, Shimizu T (1993) cDNA sequence for mouse caltractin. *Biochim.Biophys.Acta* 1216: 126-128

- Organisciak DT, Xie A, Wang HM, Jiang YL, Darrow RM, Donoso LA (1991) Adaptive changes in visual cell transduction protein levels: effect of light. *Exp. Eye Res.* 53: 773-779
- Ou Y, Zhang M, Rattner JB (2004) The centrosome: The centriole-PCM coalition. *Cell Motil. Cytoskeleton* 57: 1-7
- Oyster CW (1999) *The Human Eye: Structure and Function*, 1. Edition (entsprechende Abschnitte). Sinauer Associates
- Palczewski K, Arendt A, McDowell JH, Hargrave PA (1989) Substrate recognition determinants for rhodopsin kinase: studies with synthetic peptides, polyanions, and polycations. *Biochemistry* 28: 8764-8770
- Paoletti A, Bordes N, Haddad R, Schwartz CL, Chang F, Bornens M (2003) Fission yeast cdc31p is a component of the half-bridge and controls SPB duplication. *Mol. Biol. Cell* 14: 2793-2808
- Paoletti A, Moudjou M, Paintrand M, Salisbury JL, Bornens M (1996) Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. *J Cell Sci.* 109: 3089-3102
- Paschke T (1997) Untersuchungen zur Familie der Ca²⁺-bindenden Centrine: biochemische Charakterisierung und Identifikation von interagierenden Proteinen. Dissertation Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
- Pazour GJ, Baker SA, Deane JA, Cole DG, Dickert BL, Rosenbaum JL, Witman GB, Besharse JC (2002) The intraflagellar transport protein, IFT88, is essential for vertebrate photoreceptor assembly and maintenance. *J. Cell Biol.* 157: 103-113
- Pazour GJ, Dickert BL, Witman GB (1999) The DHC1b (DHC2) isoform of cytoplasmic dynein is required for flagellar assembly. *J. Cell Biol.* 144: 473-481
- Pazour GJ, Rosenbaum JL (2002) Intraflagellar transport and cilia-dependent diseases. *Trends Cell Biol.* 12: 551-555
- Peichl L (1991) Alpha ganglion cells in mammalian retinae: common properties, species differences, and some comments on other ganglion cells. *Vis. Neurosci.* 7: 155-169
- Pepperberg DR, Kahlert M, Krause A, Hofmann KP (1988) Photic modulation of a highly sensitive, near-infrared light-scattering signal recorded from intact retinal photoreceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5531-5535
- Peterson JJ, Tam BM, Moritz OL, Shelamer CL, Dugger DR, McDowell JH, Hargrave PA, Papermaster DS, Smith WC (2003) Arrestin migrates in photoreceptors in response to light: a study of arrestin localization using an arrestin-GFP fusion protein in transgenic frogs. *Exp. Eye Res.* 76: 553-563
- Petrova TV, Comte M, Takagi T, Cox JA (1995) Thermodynamic and molecular properties of the interaction between amphioxus calcium vector protein and its 26 kDa target. *Biochemistry* 34: 312-318

- Philp NJ, Chang W, Long K (1987) Light-stimulated protein movement in rod photoreceptor cells of the rat retina. *FEBS Lett.* 225: 127-132
- Piel M, Meyer P, Khodjakov A, Rieder CL, Bornens M (2000) The respective contributions of the mother and daughter centrioles to centrosome activity and behavior in vertebrate cells. *J.Cell Biol.* 149: 317-330
- Popescu A, Miron S, Blouquit Y, Duchambon P, Christova P, Craescu CT (2003) Xeroderma pigmentosum group C protein possesses a high affinity binding site to human centrin 2 and calmodulin. *J.Biol.Chem.* 278: 40252-40261
- Porter ME, Bower R, Knott JA, Byrd P, Dentler W (1999) Cytoplasmic dynein heavy chain 1b is required for flagellar assembly in *Chlamydomonas*. *Mol.Biol.Cell* 10: 693-712
- Porter ME, Johnson KA (1989) Dynein structure and function. *Annu.Rev.Cell Biol.* 5: 119-151
- Potter JD, Gergely J (1975) The calcium and magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar adenosine triphosphatase. *J.Biol.Chem.* 250: 4628-4633
- Pugh ENJr, Lamb T (2000) Phototransducin in vertebrate rods and cones: Molecular mechanism of amplification, recovery and light adaptation. In: Stavenga DG, DeGrip WJ, Pugh EN Jr (ed) *Molecular mechanism in visual transduction* Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam: 183-255
- Pulvermüller A, Gießl A, Heck M, Wottrich R, Schmitt A, Ernst OP, Choe H-W, Hofmann KP, Wolfrum U (2002) Calcium dependent assembly of centrin/G-protein complex in photoreceptor cells. *Mol.Cell Biol.* 22: 2194-2203
- Quadroni M, L'Hostis EL, Corti C, Myagkikh I, Durussel I, Cox J, James P, Carafoli E (1998) Phosphorylation of calmodulin alters its potency as an activator of target enzymes. *Biochemistry* 37: 6523-6532
- Ramón y Cajal S (1892a) La rétina des vertèbres. *La Cellule* 9: 119-257
- Ramón y Cajal S (1892b) *The Structure of the Retina*. Thorpe, S.A. and Glickstein, M.(Transl.), Thomas, Springfield, Il., 1972
- Renthal R, Schneider BG, Miller MM, Luduena RF (1993) Beta IV is the major beta-tubulin isotype in bovine cilia. *Cell Motil.Cytoskeleton* 25: 19-29
- Reynolds ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J.Cell Biol.* 17: 208-212
- Rice LM, Agard DA (2002) Centriole duplication: centrin in on answers? *Curr.Biol.* 12: R618-R619
- Ridge KD, Abdulaev NG, Sousa M, Palczewski K (2003) Phototransduction: crystal clear. *Trends Biochem.Sci.* 28: 479-487

- Roberts TM, King KL (1991) Centripetal flow and directed reassembly of the major sperm protein (MSP) cytoskeleton in the amoeboid sperm of the nematode, *Ascaris suum*. *Cell Motil.Cytoskeleton* 20: 228-241
- Roberts TM, Stewart M (2000) Acting like actin. The dynamics of the nematode major sperm protein (msp) cytoskeleton indicate a push-pull mechanism for amoeboid cell motility. *J.Cell Biol.* 149: 7-12
- Rogers J (1983) Retroposons defined. *Nature* 301: 460
- Rogers JS, Swofford DL (1998) A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Syst.Biol.* 47: 77-89
- Rohlich P (1975) The sensory cilium of retinal rods is analogous to the transitional zone of motile cilia. *Cell Tissue Res.* 161: 421-430
- Rose MD, Fink GR (1987) KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* 48: 1047-1060
- Rosenbaum J (2000) Cytoskeleton: functions for tubulin modifications at last. *Curr.Biol.* 10: R801-R803
- Rosenbaum JL, Cole DG, Diener DR (1999) Intraflagellar transport: the eyes have it. *J.Cell Biol.* 144: 385-388
- Routledge LM, Amos WB, Gupta BL, Hall TA, Weis-Fogh T (1975) Microprobe measurements of calcium binding in the contractile spasmoneme of a vorticellid. *J.Cell Sci.* 19: 195-201
- Ruiz-Binder NE, Geimer S, Melkonian M (2002) In vivo localization of centrin in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Cell Motil.Cytoskeleton* 52: 43-55
- Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol.Biol.Evol.* 4: 406-425
- Salisbury JL (1989) Centrin and the algal flagellar apparatus. *J.Phycol* 25: 201-206
- Salisbury JL (1995) Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr.Opinion Cell Biol.* 7: 39-45
- Salisbury JL (2004) Centrosomes: Sfi1p and centrin unravel a structural riddle. *Curr.Biol.* 14: R27-R29
- Salisbury JL, Baron A, Surek B, Melkonian M (1984) Striated flagellar roots: isolation and characterization of a calcium-modulated contractile organelle. *J.Cell Biol.* 99: 962-970
- Salisbury JL, Baron AT, Coling DE, Martindale VE, Sanders MA (1986) Calcium-modulated contractile proteins associated with the eucaryotic centrosome. *Cell Motil.Cytoskeleton* 6: 193-197

- Salisbury JL, Baron AT, Sanders MA (1988) The centrin-based cytoskeleton of *Chlamydomonas reinhardtii*: Distribution in interphase and mitotic cells. *J.Cell Biol.* 107: 635-641
- Salisbury JL, Floyd GL (1978) Calcium-induced contraction of the rhizoplast of a quadriflagellate green algae. *Science* 202: 975-976
- Salisbury JL, Sanders MA, Harpst L (1987) Flagellar root contraction and nuclear movement during flagellar regeneration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol.* 105: 1799-1805
- Salisbury JL, Suino KM, Busby R, Springett M (2002) Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr.Biol.* 12: 1287-1292
- Sambrook RJ, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning, a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Lab Press, New York
- Sanders MA, Salisbury JL (1989) Centrin-mediated microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J.Cell Biol.* 108: 1751-1760
- Sanders MA, Salisbury JL (1994) Centrin plays an essential role in microtubule severing during flagellar excision in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J.Cell Biol.* 124: 795-805
- Schaefer M, Knoblich JA (2001) Protein localization during asymmetric cell division. *Exp.Cell Res.* 271: 66-74
- Schaefer M, Petronczki M, Dorner D, Forte M, Knoblich JA (2001) Heterotrimeric G proteins direct two modes of asymmetric cell division in the *Drosophila* nervous system. *Cell* 107: 183-194
- Schatten G (1994) The centrosome and its mode of inheritance: The reduction of the centrosome during gametogenesis and its restoration during fertilization. *Dev.Biol.* 165: 299-335
- Schiebel E, Bornens M (1995) In search of a function for centrins. *Trends Cell Biol.* 5: 197-201
- Schmitt A (2000) Identifikation und Charakterisierung molekularer Komponenten des Verbindungsciliums der Photorezeptoren von Vertebraten. Dissertation Johannes Gutenberg Universität, Mainz
- Schmitt A, Wolfrum U (2001) Identification of novel molecular components of the photoreceptor connecting cilium by immunoscreens. *Exp.Eye Res.* 73: 837-849
- Schultz JE, Klumpp S (1984) Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from *Paramecium* and *Tetrahymena*. *Adv.Cyclic.Nucleotide.Protein Phosphorylation.Res.* 17: 275-283
- Schulze D, Robenek H, McFadden GI, Melkonian M (1987) Immunolocalization of a Ca²⁺-modulated contractile protein in the flagellar apparatus of green algae: the nucleus-basal body connector. *Eur.J.Cell Biol.* 45: 51-61

- Selke D, Anton H, Klumpp S (1998) Serine/threonine protein phosphatases type 1, 2A and 2C in vertebrate retinae. *Acta Anat.(Basel)* 162: 151-156
- Sharma RK, Seitz DP, Singh B, Tan Y (2002) Localization and regulation of bovine eye calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Int.J.Mol.Med.* 10: 17-23
- Sokolov M, Lyubarsky AL, Strissel KJ, Savchenko AB, Govardovskii VI, Pugh EN Jr, Arshavsky VY (2002) Massive light-driven translocation of transducin between the two major compartments of rod cells: a novel mechanism of light adaptation. *Neuron* 33: 95-106
- Sokolov M, Strissel KJ, Leskov IB, Michaud NA, Govardovskii VI, Arshavsky VY (2004) Phosducin facilitates light-driven transducin translocation in rod photoreceptors. Evidence from the phosducin knockout mouse. *J.Biol.Chem.* 279: 19149-19156
- Spang A, Courtney I, Fackler U, Matzner M, Schiebel E (1993) The calcium-binding protein cell division cycle 31 of *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the half bridge of the spindle pole body. *J Cell Biol.* 123: 405-416
- Spang A, Courtney I, Grein K, Matzner M, Schiebel E (1995) The Cdc31p-binding protein Kar1p is a component of the half bridge of the yeast spindle pole body. *J.Cell Biol.* 128: 863-877
- Spang A, Geissler S, Grein K, Schiebel E (1996) gamma-Tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *J.Cell Biol.* 134: 429-441
- Spencer M, Detwiler PB, Bunt-Milam AH (1988) Distribution of membrane proteins in mechanically dissociated retinal rods. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 29: 1012-1020
- Stearns T, Evans L, Kirschner M (1991) Gamma-tubulin is a highly conserved component of the centrosome. *Cell* 65: 825-836
- Stevens A, Lowe J (2004) *Histologie des Menschen*, 2. Edition (entsprechende Abschnitte). Chapman & Hall, London.
- Stoppin-Mellet V, Canaday J, Lambert AM (1999) Characterization of microsome-associated tobacco BY-2 centrins. *Eur.J.Cell Biol.* 78: 842-848
- Strelkov SV, Herrmann H, Aebi U (2003) Molecular architecture of intermediate filaments. *Bioessays* 25: 243-251
- Sullivan DS, Biggins S, Rose MD (1998) The yeast centrin, cdc31p, and the interacting protein kinase, Kic1p, are required for cell integrity. *J.Cell Biol.* 143: 751-765
- Sung CH, Tai AW (2000) Rhodopsin trafficking and its role in retinal dystrophies. *Int.Rev.Cytol.* 195: 215-267
- Tai AW, Chuang JZ, Bode C, Wolfrum U, Sung CH (1999) Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1. *Cell* 97: 877-887

- Taillon BE, Adler SA, Suhan JP, Jarvik JW (1992) Mutational analysis of centrin: an EF-hand protein associated with three distinct contractile fibers in the basal body apparatus of *Chlamydomonas*. *J Cell Biol.* 119: 1613-1624
- Tassin AM, Celati C, Moudjou M, Bornens M (1998) Characterization of the human homologue of the yeast *spe98p* and its association with gamma-tubulin. *J.Cell Biol.* 141: 689-701
- Terakita A, Takahama H, Hariyama T, Suzuki T, Tsukahara Y (1998) Light-regulated localization of the beta-subunit of Gq-type G-protein in the crayfish photoreceptors. *J.Comp Physiol [A]* 183: 411-417
- Terakita A, Takahama H, Tamotsu S, Suzuki T, Hariyama T, Tsukahara Y (1996) Light-modulated subcellular localization of the alpha- subunit of CTP-binding protein Gq in crayfish photoreceptors. *Visual Neurosci.* 13: 539-547
- Torok K, Lane AN, Martin SR, Janot JM, Bayley PM (1992) Effects of calcium binding on the internal dynamic properties of bovine brain calmodulin, studied by NMR and optical spectroscopy. *Biochemistry* 31: 3452-3462
- Tourbez M, Firanescu C, Yang A, Unipan L, Duchambon P, Blouquit Y, Craescu CT (2004) Calcium-dependent self-assembly of human centrin 2. *J.Biol.Chem.*(in press: www.jbc.org)
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 76: 4350-4354
- Trojan P (2003) Charakterisierung funktioneller Domänen von Centrin-Isoformen. Diplomarbeit Johannes Gutenberg-Universität Mainz
- Usher C (1914) On the inheritance of *Retinitis pigmentosa* with notes of case. *R.Lond.Ophthalmol.Hosp.Rep.J.Ophthalm.Med.Surg.* 19: 130-236
- Usukura J, Obata S (1996) 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. *Dev.Biol.* 171: 51-59
- Vallen EA, Ho W, Winey M, Rose MD (1994) Genetic interactions between CDC31 and KAR1, two genes required for duplication of the microtubule organizing center in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 137: 407-422
- Vanin EF (1985) Processed pseudogenes: characteristics and evolution. *Annu.Rev.Genet.* 19: 253-272
- Varmark H (2004) Functional role of centrosomes in spindle assembly and organization. *J.Cell Biochem.* 91: 904-914

- Veeraraghavan S, Fagan PA, Hu H, Lee V, Harper JF, Huang B, Chazin WJ (2002) Structural independence of the two EF-hand domains of caltractin. *J.Biol.Chem.* 277: 28564-28571
- Wade RH, Hyman AA (1997) Microtubule structure and dynamics. *Curr.Opin.Cell Biol.* 9: 12-17
- Walev I, Bhakdi SC, Hofmann F, Djonder N, Valeva A, Aktories K, Bhakdi S (2001) Delivery of proteins into living cells by reversible membrane permeabilization with streptolysin-O. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98: 3185-3190
- Wässle H, Boycott BB (1991) Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev.* 71: 447-480
- Watanabe N, Miyake Y, Wakabayashi T, Usukura J (1999) Periciliary structure of developing rat photoreceptor cells. A deep etch replica and freeze substitution study. *J.Electron Microsc.(Tokyo)* 48: 929-935
- Weber C, Lee VD, Chazin WJ, Huang B (1994) High level expression in *Escherichia coli* and characterization of the EF-hand calcium-binding protein caltractin. *J.Biol.Chem.* 269: 15795-15802
- Wehner G, Gehring W (1995) Zoologie (entsprechende Abschnitte). Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- Weil D, Blanchard S, Kaplan J, Guilford P, Gibson F, Walsh J, Mburu P, Varela A, Levilliers J, Weston MD (1995) Defective myosin VIIA gene responsible for Usher syndrome type 1B. *Nature* 374: 60-61
- Weitmann S, Schultz G, Kleuss C (2001) Adenylyl cyclase type II domains involved in Gbetagamma stimulation. *Biochemistry* 40: 10853-10858
- Whelan JP, McGinnis JF (1988) Light-dependent subcellular movement of photoreceptor proteins. *J.Neurosci.Res.* 20: 263-270
- White RA, Pan Z, Salisbury JL (2000) GFP-centrin as a marker for centriole dynamics in living cells. *Microsc.Res.Tech.* 49: 451-457
- Wiech H, Geier BM, Paschke T, Spang A, Grein K, Steinkötter J, Melkonian M, Schiebel E (1996) Characterization of green alga, yeast, and human centrins. *J.Biol.Chem.* 271: 22453-22461
- Wilkins JF, Bitensky MW, Willardson BM (1996) Regulation of the kinetics of phosducin phosphorylation in retinal rods. *J.Biol.Chem.* 271: 19232-19237
- Willardson BM, Wilkins JF, Yoshida T, Bitensky MW (1996) Regulation of phosducin phosphorylation in retinal rods by Ca²⁺/calmodulin-dependent adenylyl cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93: 1475-1479
- Williams DS, Roberts EA (1992) Modification of the daily photoreceptor membrane shedding response in vitro by antioxidants. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 33: 3005-3008

- Witman GB (1990) Introduction to cilia and flagella. In: Bloodgood RA (ed) Ciliary and flagellar membranes. Plenum Publishing Dcoorporation: 1-30
- Witman GB (1992) Axonemal dyneins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 4: 74-79
- Wolfrum U (1991) Centrin- and α -actinin-like immunoreactivity in the ciliary rootlets of insect sensilla. *Cell Tissue Res.* 266: 231-238
- Wolfrum U (1992) Cytoskeletal elements in ciliary receptor systems. *Verh.Dtsch.Zool.Ges.* 85: 218
- Wolfrum U (1995) Centrin in the photoreceptor cells of mammalian retinae. *Cell Motil.Cytoskeleton* 32: 55-64
- Wolfrum U (1997) Cytoskeletal elements in insect sensilla. *Int.J.Insect Morphol.Embryol.* 26: 191-203
- Wolfrum U (1998) Unkonventionelle ciliäre Cytoskelettelemente in Sinneszellen von Vertebraten. Habilitationsschrift
- Wolfrum U (2003) The cellular function of the usher gene product myosin VIIa is specified by its ligands. *Adv.Exp.Med.Biol.* 533: 133-142
- Wolfrum U, Bode C, Tai AW, Sung CH, Schmitt A (2000) Rhodopsin transport in mammalian photoreceptor cells. *Europ.J.Neuroscience* 12, 487
- Wolfrum U, Giebl A, Pulvermüller A (2002) Centrins, a novel group of Ca^{2+} -binding proteins in vertebrate photoreceptor cells. *Adv.Exp.Med.Biol.* 514:155-78.: 155-178
- 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, Salisbury JL (1995) Centrin: A new Ca^{2+} -binding protein and a noval component of the connecting cilium of photoreceptors in mammals and man. *Invest.Ophthalmol.Visual Sci.* 36 Abstract Book): 2379
- Wolfrum U, Salisbury JL (1998) Expression of centrin isoforms in the mammalian retina. *Exp.Cell Res.* 242: 10-17
- Wolfrum U, 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 (ed) *Retinal degeneration diseases and experimental therapy.* Plenum Press, New York 1: 3-14
- Wolfrum U, Schmitt A (2000) Rhodopsin transport in the membrane of the connecting cilium of mammalian photoreceptor cells. *Cell Motil.Cytoskeleton* 46: 95-107
- Wottrich R (1998) Klonierung und computergestützte Strukturanalyse von Centrinisoformen der Ratte (*Rattus norvegicus*). Diplomarbeit Universität Karlsruhe

- Wright RL, Adler SA, Spanier JG, Jarvik JW (1989) Nucleus-basal body connector in *Chlamydomonas*: evidence for a role in basal body segregation and against essential roles in mitosis or in determining cell polarity. *Cell Motil.Cytoskeleton* 14: 516-526
- Xu J, Dodd RL, Makino CL, Simon MI, Baylor DA, Chen J (1997) Prolonged photoresponses in transgenic mouse rods lacking arrestin. *Nature* 389: 505-509
- Yau KW, Nakatani K (1985) Light-induced reduction of cytoplasmic free calcium in retinal rod outer segment. *Nature* 313: 579-582
- Yoon GS, Suriawinata A, Thung SN, Yu E (2001) Parenchymal and nonparenchymal cellular responses in human hepatic regeneration. *J.Korean Med.Sci.* 16: 439-447
- Yoshida T, Willardson BM, Wilkins JF, Jensen GJ, Thornton BD, Bitensky MW (1994) The phosphorylation state of phosducin determines its ability to block transducin subunit interactions and inhibit transducin binding to activated rhodopsin. *J.Biol.Chem.* 269: 24050-24057
- Zhang H, Huang W, Zhang H, Zhu X, Craft CM, Baehr W, Chen CK (2003) Light-dependent redistribution of visual arrestins and transducin subunits in mice with defective phototransduction. *Mol.Vis.* 9: 231-237
- Zheng Y, Jung MK, Oakley BR (1991) Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell* 65: 817-823
- Zhu KJ, Bressan R, Hasegawa P (1992) An *Atriplex nummularia* cDNA with sequence relatedness to the algal caltractin gene. *Plant Physiol.* 99: 1734-1735

Anhang

8. Anhang

8.1. Zusätzliche Abbildungen und Alignments

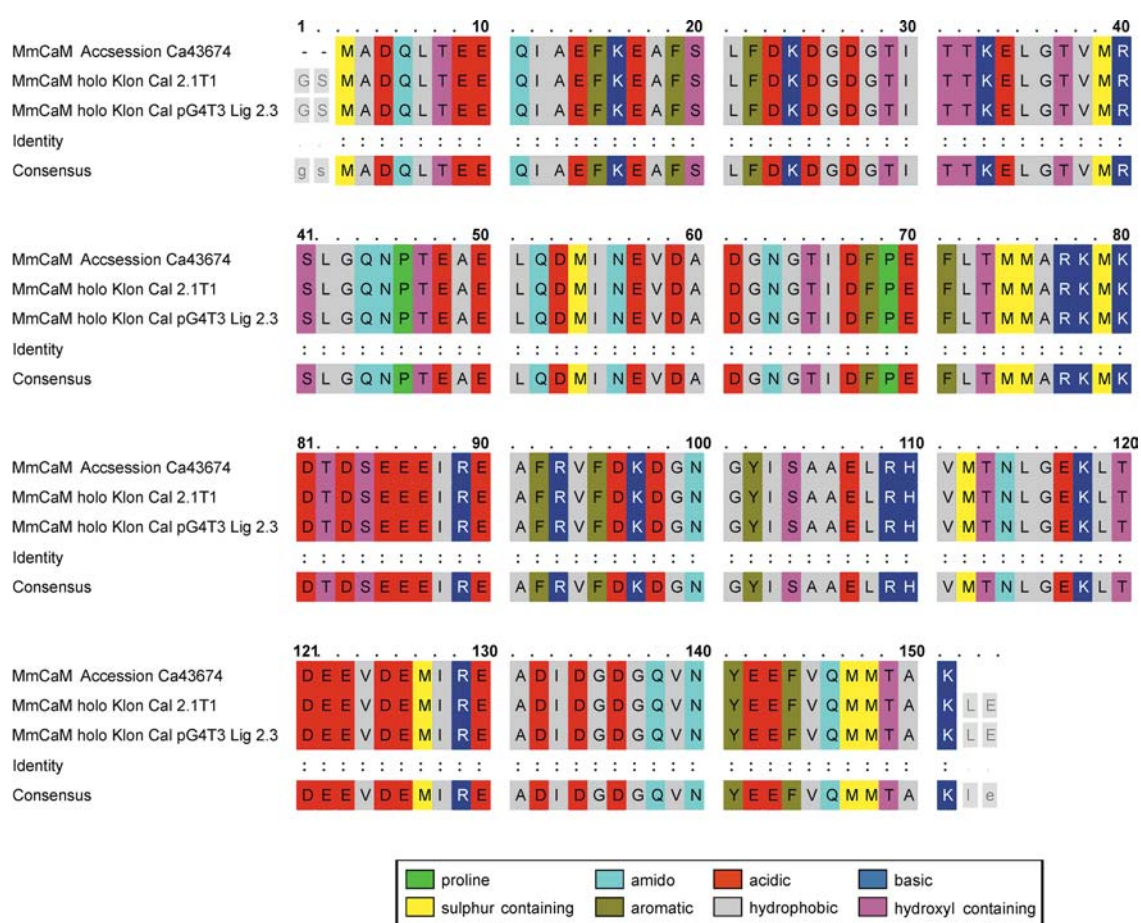


Abbildung 8.1 Aminosäuresequenzanalyse der Maus-Calmodulin-Klone

Omega-Alignment der Maus-*holo* Calmodulin-Klone MmCaM Cal 2.1T1 im Topo-TA-Vektor und MmCaM Cal pG4T3 Lig 2.3 im Expressionsvektor pGex 4T3 mit der NCBI-Datenbank-Sequenz MmCaM AN Ca43674. Die Alignments zeigen keine Unterschiede zwischen der Aminosäuresequenz der NCBI-Datenbank und der klonierten Calmoduline. Durch die verwendeten Primer wurden während der PCR Restriktionsstellen eingefügt (grau hinterlegt). Die entsprechenden Basentriplets der AS am N-terminalen Ende (G, S) dienen dem Restriktionsenzym BamHI und am C-terminalen Ende (L, E) dem Restriktionsenzym XhoI als Schnittstellen.

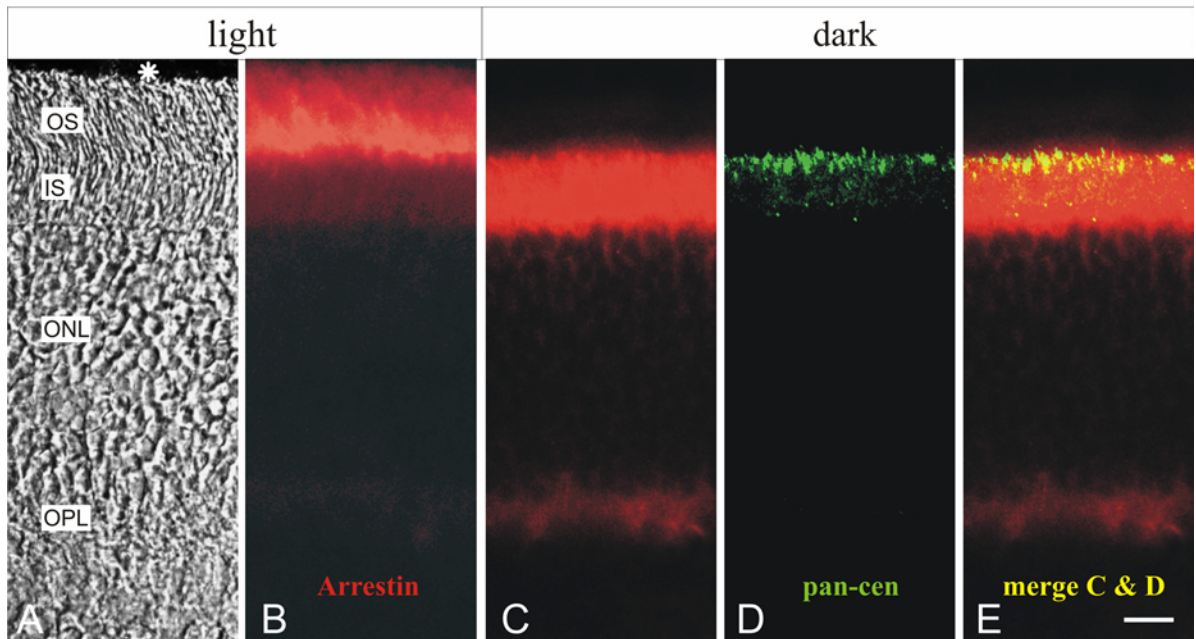


Abbildung 8.2 Lichtstimulierte Translokation von Arrestin in Mausretinae

(A) Differenzieller Interferenzkontrast eines Kryostatquerschnitts durch das Auge einer Maus. (B, C, E) Subzelluläre Immunolokalisation von Arrestin (rot) und (D, E) Centrin [grün, pan-centrin (clone 20H5), der alle Isoformen detektiert] in hell („light“)- und dunkel („dark“)-adaptierten Mausretinae. (B) Nach 12stündiger Lichtadaption ist Arrestin im äußeren Segment (OS) lokalisiert. Eine schwache Markierung zeigt das innere Segment (IS). (C) In dunkel-adaptierten Photorezeptorzellen ist Arrestin hauptsächlich im IS und nur gering in der äußeren Körnerschicht (ONL), welche die Zellkerne beinhaltet, bis zu den Synapsen der äußeren plexiformen Schicht (OPL) lokalisiert. (D) Die grüne indirekte Immunofluoreszenz zeigt Centrin im Verbindungscilium und am Basalkörper der Photorezeptorzelle und ist mit Arrestin kolokalisiert (E) Überlagerung („merge“) Bild (C) und (D).

Größenbalken: (C): 10 μm .

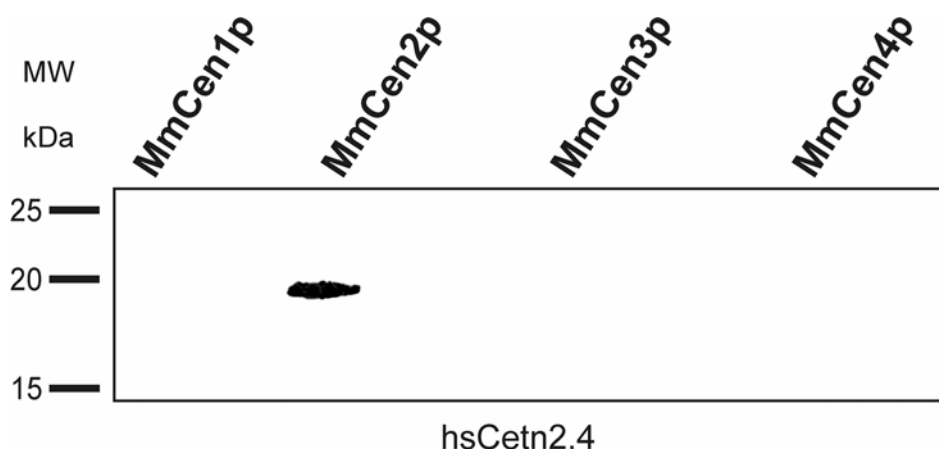


Abbildung 8.3 Nachweis der Spezifität des mAb HsCetn2.4

Western Blot Analyse aller Centrin-Isoformen (0,5 μg Protein/Spur) mit dem monoklonalen, gegen das humane Centrin 2 gerichteten, Antikörper HsCetn2.4. Der Antikörper reagiert spezifisch gegen das Maus-Centrin 2-Protein (MmCen2p).

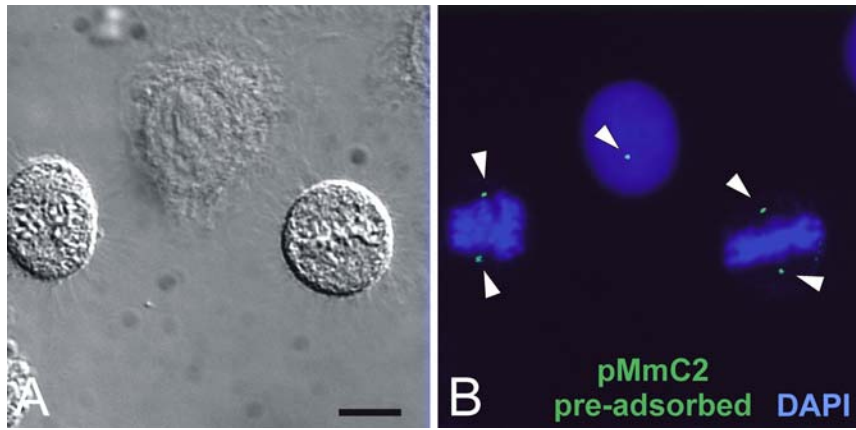


Abbildung 8.4 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse von HeLa-Zellen mit dem prä-adsorbierten spezifischen Antikörper pMmC2

(A) zeigt ein differenzielles Interferenzkontrast-Bild der HeLa-Zellen, während (B) eine Fluoreszenzaufnahme darstellt, die mit einer blauen Zellkernfärbung der DNA (DAPI) abgebildet ist. Die grüne Markierung in (B) mit dem prä-adsorbierten pMmC2 zeigt die Centrosomen (Pfeilspitzen) der Zellen. Die linke und rechte Zelle ist gerade dabei, sich zu teilen.

Größenbalken: (A): 6,6 μm .

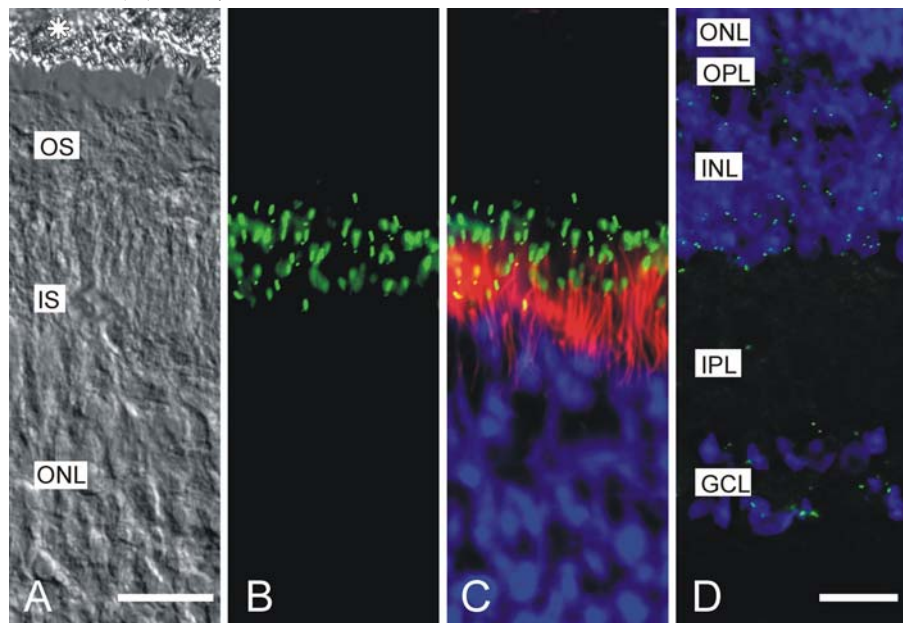


Abbildung 8.5 Indirekte Immunfluoreszenzanalyse mit dem mAb HsCetn2.4 eines Kryostatschnittes durch eine Rattenretina

(A) Differenzieller Interferenzkontrast eines Kryostatschnittes durch das Auge einer Ratte. (B) Subzelluläre Immunolokalisation von Centrin 2 (grün) mit dem mAb HsCetn2.4. Der spezifische Antikörper für Centrin 2 zeigt eine Markierung im Verbindungscilium und am Basalkörper der Photorezeptorzellen. (C) Überlagerung von (B) und zwei nicht gezeigten Bildern, die das Protein Rootletin (rot), ein Protein der Cilienwurzeln, und den DNA-Farbstoff DAPI, der die Zellkerne der äußeren Körnerschicht (ONL) färbt, zeigen. (D) zeigt einen Ausschnitt, indem Centrin 2 (grün) mit dem mAb HsCetn2.4 an Centrosomen der inneren Körner-(INL) und der Ganglienzellschicht (GCL) markiert ist. Weiterhin sind die Zellkerne wiederum mit DAPI gefärbt.

Größenbalken: (A): 8,2 μm und (D): 13 μm .

Tabelle 8.1 „Accession Numbers“ (AN) der verwendeten Sequenzen im Phylogramm Abb. 1.3

RnCaMp	=	<i>Rattus norvegicus</i> Calmodulin AN:	CAA32120
MmCaMp	=	<i>Mus musculus</i> Calmodulin AN:	NP_033920
HsCaMp	=	<i>Homo sapiens</i> Calmodulin AN:	BAA08302
NgCenp	=	<i>Naegleria gruberi</i> Centrin AN:	AAA75032
XlCenp	=	<i>Xenopus laevis</i> Centrin AN:	AAA79194
XlCenp3	=	<i>Xenopus laevis</i> Centrin 3 AN:	AAG30507
PtCenp	=	<i>Paramecium tetraurelia</i> Centrin AN:	AAB188752
DsCenp	=	<i>Dunaliella salina</i> Centrin AN:	AAB67855
HsCen1p	=	<i>Homo sapiens</i> Centrin 1 AN:	AAC27343
HsCen2p	=	<i>Homo sapiens</i> Centrin 2 AN:	AAH13873
HsCen3p	=	<i>Homo sapiens</i> Centrin 3 AN:	AAH05383
MmCen1p	=	<i>Mus musculus</i> Centrin 1 AN:	AAD46390
MmCen2p	=	<i>Mus musculus</i> Centrin 2 AN:	AAD46391
MmCen3p	=	<i>Mus musculus</i> Centrin 3 AN:	AAH02162
MmCen4p	=	<i>Mus musculus</i> Centrin 4 AN:	AAM75880
RnCen1p	=	<i>Rattus norvegicus</i> Centrin 1 AN:	AAK20385
RnCen2p	=	<i>Rattus norvegicus</i> Centrin 2 AN:	AAK20386
RnCen3p	=	<i>Rattus norvegicus</i> Centrin 3 AN:	AAK83217
AtCenp	=	<i>Arabidopsis thaliana</i> Centrin AN:	CAB16762
AnCenp	=	<i>Atriplex nummularia</i> Centrin AN:	P41210
NtCenp	=	<i>Nicotiana tabacum</i> Centrin AN:	AAF07221
CrCenp	=	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> Centrin AN:	CAA41039
SdCenp	=	<i>Scherffelia dubia</i> Centrin AN:	CAA49153
MpCenp	=	<i>Micromonas pusilla</i> Centrin AN:	CAA58718
EoCenp	=	<i>Euplotes octocarinatus</i> Centrin AN:	CAB40791
TsCenp	=	<i>Tetraselmis striata</i> Centrin AN:	P43646
ScCdc31p	=	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AN:	P06704
CeCBpR08	=	<i>Caenorhabditis elegans</i> AN:	P30644
TtCenp	=	<i>Tetrahymena thermophila</i> AN:	AAF66602.

Die Sequenzen von *Rattus norvegicus* wurden mit Daten aus der Diplomarbeit von Ralf Wottrich (1998) komplettiert.

Tabelle 8.2 Alignment der verwendeten Aminosäuresequenzen in Abbildung 1.3

RnCaMp	-----	-----	-----	-M	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD		
MmCaMp	-----	-----	-----	-M	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD		
HsCaMp	-----	-----	-----	-M	ADQLTEEQIA	EFKEAFSLFD		
NgCenp	-----	-MQ	KYGSKKIGAT	SATSSNKQKV	QIELTDEQRQ	EIKEAFDLFD		
XlCenp	-----	-M	ASNYKKPSLG	VTTQRKKPVP	KTELTEEQKQ	EIREAFDLFD		
XlCen3p	-----	--	MSLAVRTD	VAVDKMKRKK	RRELTEEQKQ	EIKDAFELFD		
PtCenp	ARRGQQPPPQ	QQQAPPQKNQ	AGKFNPAEFV	KPGLTEEEVL	EIKEAFDLFD			
DsCenp	-----	-MSYR	-KTVV	SARRDQKKGR	VGGLTEEQKQ	EIREAFDLFD		
HsCen1p	-----	-M	ASGFKKPSAA	STGQKRKVAP	KPELTEDQKQ	EVREAFDLFD		
HsCen2p	-----	-M	ASNFKKANMA	SSSQKRMSP	KPELTTEEQKQ	EIREAFDLFD		
HsCen3p	-----	--	MSLALRSE	LLVDKTKRKK	RRELSEEQKQ	EIKDAFELFD		
MmCen1p	-----	-M	ASTFRKSNVA	STSYKRVKVP	KPELTEDQKQ	EVREAFDLFD		
MmCen2p	-----	-M	ASNFKKTMA	SSAQRKRMSP	KPELTEDQKQ	EIREAFDLFD		
MmCen3p	-----	--	MSLALRGE	LVVDKTKRKK	RRELSEEQKQ	EIKDAFELFD		
MmCen4p	-----	-M	ASSQR	----	I	TLDQWKKKAA	KVELNDTQKQ	EIKEAFDLFD
RnCen1p	-----	-M	ASTFRKSNVA	STSYKRVKVP	KPELTEDQKQ	EVREAFDLFD		
RnCen2p	-----	-M	ASNFKKTMA	SSAQRKRMSP	KPELTTEEQKQ	EIREAFDLFD		
RnCen3p	-----	-----	-----	-----	LVVDKTKRKK	RRELSEEQKQ	EIKDAFELFD	
AtCenp	-----	-MSEAAQLR	--	RGLKPKGK	TYGLTNQKRR	EIREAFDLFD		
AnCenp	-----	-MSSARTVR	---	KDKPRGR	HHGLTQQKRQ	EIKEAFELFD		
NtCenp	-----	-MTYLE	ERSTASLYRG	ASRREKPRGR	NQGLTQQKRQ	EIREAFELFD		
CrCenp	-----	-MSYKAKTVV	SARRDQKKGR	VG	-LTEEQKQ	EIREAFDLFD		
SdCenp	-----	-MSYR	-KAA	SARRDKAKTR	SAGLTEEQKQ	EIREAFDLFD		
MpCenp	-----	-----	-----	-----	-LTEEQKQ	EIRXAFDLFD		
EoCenp	-----	---	MIKKPEF	GLMQPPKRV	RQELSEEQKQ	EIKEAFDLFD		
TsCenp	-----	-----	-----	-----	-LTEEQKQ	DIREAFDLFD		
ScCdc31p	-----	---	MSKNRS	SLQSGP	---L	NSELLEEQKQ	EIYEAFSLFD	
CeCBpR08	---	-MCTEQK	PNLLKLSQLK	MVLRALGYDP	RNSKVQEMTR	KIKDGRSMVM		
TtCenp	-----	---	MSLKNTR	PPVKSTRVSR	PQ	-LTEEQKQ	EIKEAFDLFD	
Clustal Consensus					:	
RnCaMp	--	KDGDGTIT	TKELGTVMRS	LGQNPTEAEL	QDMINEVDAD	NGTIDFPEF		
MmCaMp	--	KDGDNTIT	TKELGTVMRS	LGQNPTEAEL	QDMINEVDAD	NGTIDFPEF		
HsCaMp	--	KDGDGTIT	TKELGTVMRS	LGQNPTEAEL	QDMINEVDAD	NGTIDFPEF		
NgCenp	--	MDGSGKID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMISGIDN	GSGKIDFND		
XlCenp	--	TDGTGTID	VKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIADIDKE	GTGKIAFSD		
XlCen3p	--	TDKDKAID	YHELKVAMRA	LGFDVKKADV	LKILKDYDGE	TTGKITFDD		
PtCenp	--	TDGTQSID	PKELKAAMTS	LGFEAKNQTI	YQMISDLDTD	GSGQIDFAEF		
DsCenp	--	TDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIADIDKA	GSGTIDFEEF		
HsCen1p	--	VDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPRKEEM	KKMISEVDRE	GTGKISFNDF		
HsCen2p	--	ADGTGTID	VKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMISEIDKE	GTGKMNFGDF		
HsCen3p	--	TDKDEAID	YHELKVAMRA	LGFDVKKADV	LKILKDYDRE	ATGKITFED		
MmCen1p	--	SDGSGTID	VKELKVAMRA	LGFEPRKEEM	KKMISEVDKE	ATGKISFNDF		
MmCen2p	--	ADGTGTID	IKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMISEIDKE	GTGKMNFSDF		
MmCen3p	--	TDKDQAID	YHELKVAMRA	LGFDVKKADV	LKILKDYDRE	ATGKITFED		
MmCen4p	--	IDGSGTID	LKELKIAMRA	LGFEPKKEEV	KQLIAEIDKE	GTGTICFED		
RnCen1p	--	SDGSGTID	VKELKVAMRA	LGFEPRKEEM	KKMISEVDKE	ATGKISFNDF		
RnCen2p	--	ADGTGTID	MKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMISEIDKE	GTGKMNFSDF		
RnCen3p	--	TDKDQAID	YHELKVAMRA	LGFDVKKADV	LKILKDYDRE	ATGKITFED		
AtCenp	--	IDGSGSID	ASELNVMARS	LGFEFEMNQI	NELMAEVDKN	QSGAIDFDEF		
AnCenp	--	TDGSGTID	AKELNVAMRA	LGFEFEMTEEQI	NQMIADVDDK	GSGAIDFDEF		
NtCenp	--	TDNSGTID	AKELNVAMRA	LGFEATEEEI	NQMIAEVDK	GSGAIDFDEF		
CrCenp	--	TDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMISEIDK	GSGTIDFEEF		
SdCenp	--	TDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIADIDK	GSGTIDFEEF		
MpCenp	--	TDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIADIDK	GSGTIDFEEF		
EoCenp	--	TNKTGSID	YHELKVAMRA	LGFDVKKPEI	LELMNEYDRE	GNGYIGFDD		
TsCenp	--	TDGSGTID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIADIDK	GSGTIDFEEF		
ScCdc31p	--	MNNDGFLD	YHELKVAMKA	LGFEFELPKREI	LDLIDEYDSE	GRHLMKYDD		
CeCBpR08	GWHGEKDYMD	VDELWNLQS	K	-DDEGDS	EDKVTTEMR	AFKLFDPESK		
TtCenp	--	TDGTGYID	AKELKVAMRA	LGFEPKKEEI	KKMIAEIDRE	GRGVIEFQDF		
Clustal Consensus	.	:	**	..	:	:	:	

8. Anhang

RnCaMp	LTMMARKMKD	TDSEEEIREA	FRVFDKDGNG	YISAAELRHV	MTNLGEKLT
MmCaMp	LTMMARKMKD	TDSEEEIREA	FRVFDKDGNG	YISAAELRHV	MTNLGEKLT
HsCaMp	LTMMARKMKD	TDSEEEIREA	FRVFDKDGNG	YISAAELRHV	MTNLGEKLT
NgCenp	LQLMTAKMSE	KDSHAEIMKA	FRLFDEDDSG	FITFANLKR	AKDLGENMTD
XlCenp	MCAMTQKMAE	KDSKEEIMKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENLTD
XlCen3p	NEVVTDLILD	RDPQEEILKA	FKLFDDDDSG	KISLRNLRR	ARELGETMAD
PtCenp	LKLMTARISE	RDSKADIQKV	FNLFDSEER	VITLKDRLK	AKELGETMDD
DsCenp	LQMMTSKMGE	RDSREEI IKA	FKLFDDDDNT	FITLKNLKR	AKELGENLTD
HsCen1p	LAVMTQKMSE	KDTKEEILKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	ANELGENLTD
HsCen2p	LTVMVTQKMSE	KDTKEEILKA	FKLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENLTD
HsCen3p	NEVVTDWILE	RDPHEEILKA	FKLFDDDDSG	KISLRNLRR	ARELGENMSD
MmCen1p	LAVMTQKMAE	KDTKEEILKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	ANELGESLTD
MmCen2p	LTVMVTQKMSE	KDTKEEILKA	FKLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENLTD
MmCen3p	NEVVTDWILE	RDPHEEILKA	FKLFDDDDSG	KISLRNLRR	ARELGENMSD
MmCen4p	FAIMSVKMSE	KDEKEEILKA	FKLFDDDDAT	SISLNNIKR	AKELGENLTE
RnCen1p	LAVMTQKMAE	KDTKEEILKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	ANELGESLTD
RnCen2p	LTVMVTQKMSE	KDTKEEILKA	FKLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENLTD
RnCen3p	NEVVTDWILE	RDPHEEILKA	FKLFDDDDSG	KISLRNLRR	ARELGENMSD
AtCenp	VHMMTTKFG	RDSIDELSKA	FKIIDHDNNG	KISPRDIKMI	AKELGENFTD
AnCenp	CHMMTAKIGE	RDTKEELMKA	FRIIDQDNNG	K-SPEDIQRI	AKELGENFTV
NtCenp	VHMMTAKFGE	RDTKEELKKA	FDVIDQDKNG	KISFADIQRI	ADELGERFTD
CrCenp	LTMMTAKMGE	RDSREEI IKA	FRLFDDDDNSG	TITIKDLRR	AKELGENLTE
SdCenp	LQMMTAKMGE	RDSREEI IKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENMTD
MpCenp	LTMMTAKMGE	RDSREEI IKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENMTD
EoCenp	LDIMTEKIKN	RDPVEEILKA	FKVFEEDNSG	KISLRNLKR	AKELGENLSD
TsCenp	LQMMTAKMGE	RDSREEI IKA	FRLFDDDET	KISFKNLKR	AKELGENMTD
ScCdc31p	YIVMGEKILK	RDPLDEIKRA	FQLFDDDDHTG	KISIKNLRR	AKELGETLTD
CeCBpR08	GTITVANLKM	VCNHVELKSK	FRTKVLK--	--GPNFLKSV	AKELGETLAD
TtCenp	LDLMTVKMAE	RDPREI IKA	FRLFDDDDNT	KISLKNLKR	ARELGEAMTE
Clustal Consensus	:	::	*	.	:: : :*** :

RnCaMp	EEVDEMIREA	DIDGDGQVNY	EEFVQMMTAK	-----
MmCaMp	EEVDEMIREA	DIDGDGQVNY	EEFVQMMTAK	-----
HsCaMp	EEVDEMIREA	DIDGDGQVNY	EEFVQMMTAK	-----
NgCenp	EELREMIEEA	DRSNQQQISE	D-FLRIMKKT	NLF--
XlCenp	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	QEFLRIMKKT	SLF--
XlCen3p	EELRAMIEEF	DKDGDGEINQ	EEFLSIMTGD	L----
PtCenp	SELQEMIDRA	DSGDGAQVTF	EDFYNIMTKK	TFA--
DsCenp	EELQEMTDEA	DRNGDGQIDE	DEFYRIMKKT	SLF--
HsCen1p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFLRIMKKT	SLY--
HsCen2p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVSE	QEFLRIMKKT	SLY--
HsCen3p	EELRAMIEEF	DKDGDGEINQ	EEFLAIMTGD	I----
MmCen1p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFLKIMKKT	NLY--
MmCen2p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	QEFLRIMKKT	SLY--
MmCen3p	EELRAMIEEF	DKDGDGEINQ	EEFLAIMTGD	I----
MmCen4p	DELQEMLEA	DRDGDGEINE	EEFLKMMKKT	SLY--
RnCen1p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFLKIMKKT	NLY--
RnCen2p	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	QEFLRIMKKT	SLY--
RnCen3p	EELRAMIEEF	DKDGDGEINQ	EEFLAIMTGD	I----
AtCenp	NDIEEMIEEA	DRDKDGEVNL	EEFMKMMKRT	SYG--
AnCenp	KDIQDMIEEA	DRDRDGEVNV	EEFLRMMKRT	SYAY-
NtCenp	REIQEMIEEA	DQDRDGEVNV	EDFMRMMRRT	SFGH-
CrCenp	EELQEMIAEA	DRNDDNEIDE	DEFIRIMKKT	SLF--
SdCenp	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFFRIMKKT	SLF--
MpCenp	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFFRIMKKT	SLF--
EoCenp	DELQAMIDEF	DKDQDGEISE	QEFLNIMKQT	SIY--
TsCenp	EELQEMIDEA	DRDGDGEVNE	EEFFRIMKKT	SLF--
ScCdc31p	EELRAMIEEF	DLGDGEINE	NEFLAICTDS	-----
CeCBpR08	ADFDEMIREA	GGDNNTGINE	QQFFEIMKKT	CLY--
TtCenp	EELQEMIDEA	DRDGDGEISE	EEFVRIMKKT	NLF--
Clustal Consensus	:: *	. . : :	: * :	

Folgende Ein- und Drei-Buchstaben Symbole wurden als Nomenklatur von der „*International Union of Pure and Applied Chemistry*“ (IUPAC) und der „*International Union of Biochemistry*“ (IUB) für die am häufigsten verwendeten Aminosäuren und Nucleinsäuren international verbindlich vereinbart und in dieser Arbeit auch wie folgt verwendet (IUPAC-IUB „*Commission on Biochemical Nomenclature*“ (CBN), 1968; 1970).

Tabelle 8.3 IUPAC/IUB-Symbole für Nucleinsäuren

Symbol	Bedeutung/ Nucleinsäure	Symbol	Bedeutung/ Nucleinsäure
A	S	S	C oder G
C	Y	Y	C oder T
G	K	K	G oder T
T	N	N	A, T, G oder C
U	B	B	nicht A
M	D	D	nicht C
R	H	H	nicht G
W	A oder T	V	nicht T

Tabelle 8.4 IUPAC/IUB-Symbole für Aminosäuren

Ein Buchstaben- Code	Drei Buchstaben- Code	Name der Aminosäure	Ein Buchstaben- Code	Drei Buchstaben- Code	Name der Aminosäure
A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	X	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

8.2. Abkürzungen

Im Folgenden sind im Text häufig verwendete Abkürzungen nochmals alphabetisch aufgelistet. Zusätzlich wurden in diese Liste allgemein gebräuchliche Abkürzungen von Einheiten und Chemikalien aufgenommen, die nicht im Text definiert wurden.

Ab	Antikörper (engl. „ <i>antibody</i> “)
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
AN	„ <i>Accession Number</i> “
APS	Ammonium-Persulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BB	Basalkörper (engl. „ <i>basalbody</i> “)
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cpm	Zählungen pro Minute (engl. „ <i>counts per minute</i> “)
DAPI	4, 6-Diamidino-2-Phenylindol; blau fluoreszierende Zellkernfärbung
ddH ₂ O	Doppelt-destiliertes Wasser
DIC	Differenzieller Interferenzkontrast
DMEM	„ <i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i> “
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	engl. „ <i>dots per minute</i> “
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> (Bakterium)
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraacetat

EM	Elektronen Mikroskopie
Fa.	Firma
FKS	Fötale Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GST	Gluthation S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HSP	engl. „ <i>heat shock protein</i> “
INL	Innere Körnerschicht
IPL	Innere plexiforme Schicht
IPTG	Isopropyl-1-thio- β -D-galactosid
IS	Innensegment der Photorezeptorzelle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
M	Molmasse
mAb	monoklonaler Antikörper
Mm	<i>Mus musculus</i>
mM	Millimol
mRNA	„ <i>messenger</i> “ RNA
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum
MW	Molekulargewicht (engl. „ <i>molcular weight</i> “)
NCBI	„ <i>National Center for Biotechnology Information</i> “
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte; die tiefgestellte Zahl bezeichnet die Wellenlänge
ONL	Äußere Körnerschicht
OPL	Äußere plexiforme Schicht
OS	Außensegment der Photorezeptorzelle
pAb	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCM	pericentrioläres Material
PCR	engl. „ <i>polymerase chain reaction</i> “
PDA	Phosphodiesterase

PFA	Paraformaldehyd
pmol	piko Mol
PLL	Poly-L-Lysin
PP	Phosphatase
PVDF-Membran	<u>P</u> oly <u>V</u> inylid <u>D</u> ine <u>F</u> luorid-Membran
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	retinales Pigmentepithel
rpm	engl. „ <i>rotations per minute</i> “
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„ <i>reverse transcription-polymerase-chain-reaction</i> “
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunden
sog.	sogenannten
SPB	Spindelpolkörper
Taq-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -Polymerase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TN	Troponin
UE	Untereinheit
ÜK	Übernachtkultur
v/v	Volumen pro Volumen
wt	etablierte Wildtyp-Maus <i>Mus musculus</i> C57
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
z.B.	zum Beispiel

8.3. Lebenslauf

8.4. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich meine Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich habe keinen anderen Promotionsversuch unternommen.

Mainz, den 24.10.2004

Andreas Gießl

Andreas Gießl