

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München**



**Untersuchungen zur Regulation von retinalen
Kationenkanälen mit Hilfe von Förster Resonanz Energie
Transfer**

von

Christos Paparizos

aus Eichstätt

2016

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 Abs. 1 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Christian Wahl-Schott betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 11.11.2016

.....
Christos Paparizos

Dissertation eingereicht am: 18.11.2016

1. Gutachter Prof. Dr. C. Wahl-Schott
2. Gutachter Prof. Dr. M. Biel

mündliche Prüfung am: 25.01.2017

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	7
1.1 Zielsetzung der Arbeit.....	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Chemikalien und Lösungen	18
2.2 Arbeiten mit DNA	18
2.2.1 Isolierung und Amplifikation von Plasmid DNA.....	18
2.2.2 Auftrennung von Nucleinsäuren	21
2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA	23
2.2.4 Polymerase Kettenreaktion	24
2.3 Kultur und Transfektion eukaryotischer Zellen.....	27
2.3.1 Kultur von HEK293-Zellen.....	27
2.3.2 Transiente Transfektion mit GeneExpressoMax.....	28
2.4 Herstellung viraler Vektoren.....	29
2.4.1 Transfektion der HEK293 T Zellen	29
2.4.2 Ernte der virushaltigen Zellen	31
2.4.3 Vorbereiten der Viren.....	31
2.5 FRET-Messungen	31
2.5.1 Theoretische Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers.....	31
2.5.2 Quantifizierung von FRET	33
2.5.3 Das FRET Ratio	34
2.5.4 Experimentelle Durchführung	38
2.5.5 Korrekturfaktoren des FRET-Mikroskops	40
2.5.6 Gestaltung der Fusionsporteine	44
2.6 Erfassung der Geräteeigenschaften	46
2.6.1 Untersuchungen zur Lichtintensität	47
2.6.2 FRET-Konstanten im Zeitverlauf	50
3. ERGEBNISSE	51
3.1 Untersuchung der Interaktion von CaBP4 und Cav1.4	51
3.2 Untersuchungen zu Interaktionen des CNG-Kanals	56
3.2.1 Untersuchungen zu Rhodopsin, Peripherin 2 und GNGB1a in HEK-Zellen.....	57
3.2.2 Untersuchungen zu Rhodopsin in Stäbchenaußensegmenten.....	59
4. DISKUSSION	61
5. ZUSAMMENFASSUNG	67

6. ANHANG	69
7. LITERATURVERZEICHNIS	73
8. PUBLIKATIONEN	76
9. DANKSAGUNG.....	77

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
A	Alanin
α	Alpha
<i>ad</i>	zu
ÁIED	<i>Áland Island Eye Disease</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
β	Beta
bp	Basenpaar(e) (<i>basepairs</i>)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c	Konzentration
ca.	zirka (<i>circa</i>)
Ca ²⁺	Calciumionen
CaBP4	Calcium bindendes Protein 4 (<i>calcium binding protein 4</i>)
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Cav	spannungsgesteuerter Calcium-Kanal
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälbermagen (<i>calf intestine phosphatase</i>)
cm	Zentimeter
CNBD	zyklische Nukleotide bindende Domäne
CNG	durch zyklische Nukleotide aktiviert (<i>cyclic nucleotide gated</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CORDX3	X-chromosomal gebundene Stäbchen-Zapfen-Dystrophie
CSNB2	<i>Congenital stationary night blindness type 2</i>
d	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
E	Glutaminsäure

ABKÜRZUNGEN

<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERG	Elektroretinogramm
et al.	und Kollegen
F	Phenylalanin
FRET	Förster-Resonanz-Energie Transfer
3 ³ FRET	<i>Three cube FRET</i>
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
G	Guanin
G	Glycin
g	Gramm
g	g-Kraft
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
G 418	Geneticin
h	Stunde(n)
HCN	<i>hyperpolarization cyclic nucleotide-gated</i>
HEK 293	menschliche embryonale Niere 293 (<i>human embryonic kidney 293</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
H ₂ O	Wasser
HVA	<i>high-voltage-activated</i>
I	Stromstärke
I _T	Strom durch T-Typ Calciumkanäle
K ⁺	Kaliumionen
kb	Kilobasenpaar(e)
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
kg	Kilogramm
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LB(+)	Luria-Bertani (Nährmedium mit Glukose)
LVA	<i>low-voltage-activated</i>
M	mol pro Liter
MCS	multiple Klonierungsstelle (<i>mutiple clonig site</i>)
max.	maximal(e)
µg	Mikrogramm

ABKÜRZUNGEN

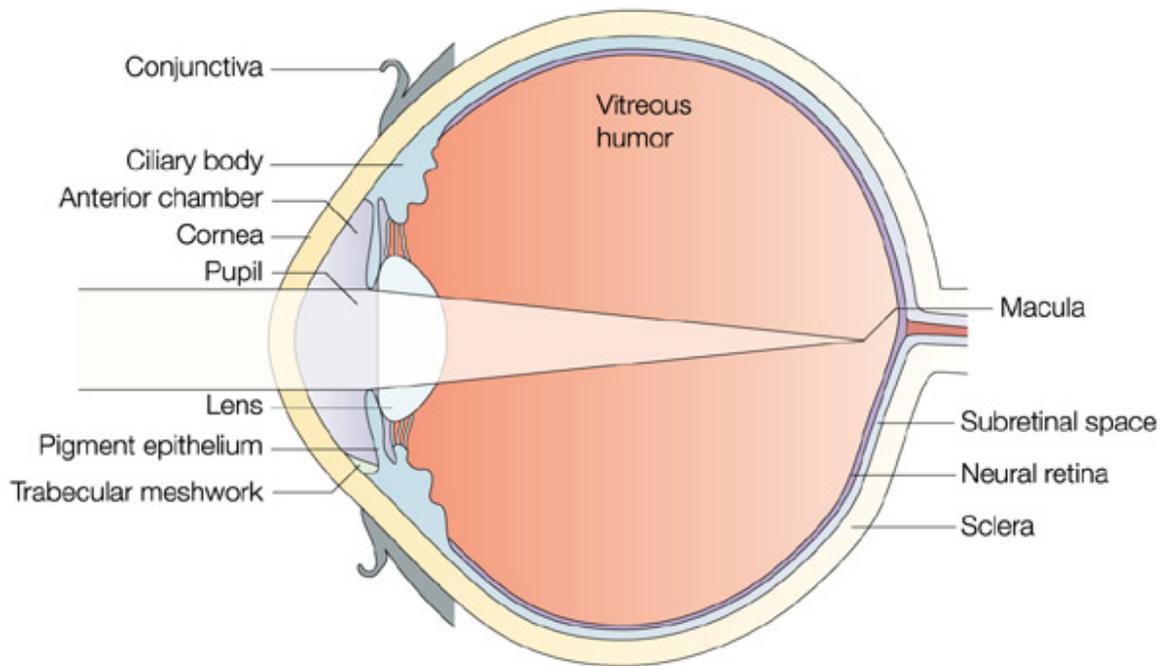
min	Minute(n)
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromol pro Liter
MPI	Max-Planck-Institut
ms	Millisekunde(n)
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
mV	Millivolt
n	Anzahl
Na ⁺	Natriumionen
NAADP	Nikotinsäure-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ng	Nanogramm
Neo	Neomycinresistenzgen
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
ORI	Replikationsursprung, (<i>origin of replication</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
pBS	pBlueskript II SK / KS (+) Vektor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pH	pH-Wert
PI(3,5)P ₂	Phosphatidyl-Inositol-3,5-Diphosphat
Rho	Rhodopsin
qs	so viel wie nötig (<i>quantum satis</i>)
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rotations per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

ABKÜRZUNGEN

S	Segment(e)
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
T	Threonin
T	Temperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPC2	<i>Two-pore-channel 2</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TrpML	<i>Transient receptor Potential channel ML</i>
UV	Ultraviolett
V	Spannung in Volt
V	Valin
V _{0,5}	halbmaximale Aktivierung
VSD	Spannungssensordomäne (<i>voltage sensing domain</i>)
WT	Wildtyp
x	Fach
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
∞	unendlich

1. EINLEITUNG

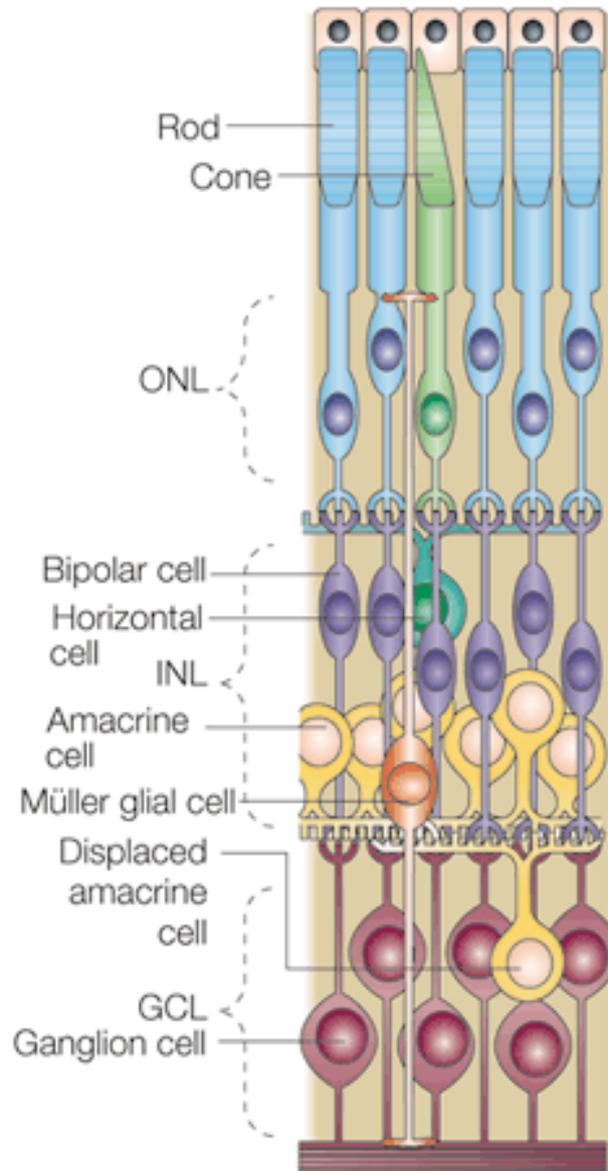
Durch sensorische Wahrnehmung steht der Mensch in Kontakt mit seiner Umwelt. Dabei liefern die fünf Sinne – Fühlen, Schmecken, Riechen, Hören und Sehen – ununterbrochen Informationen über die Umgebung. Die meisten Menschen betrachten den Sehsinn als ihre wichtigste sensorische Wahrnehmung, da viele Erinnerungen visuell erfahrene oder bearbeitete Information sind. Sehen ist ein komplexer physiologischer Vorgang, der eintreffendes Licht, also elektromagnetische Strahlen, in Nervenimpulse umwandelt, diese weiterleitet und anschließend im visuellen Cortex ein Bild entstehen lässt. Die Detektion von Licht findet im Auge statt. Das Auge des Menschen ist in der Lage, Licht im Bereich von 400 bis 800 nm Wellenlänge zu erfassen, was dem gesamten Farbspektrum von violett über grün und gelb bis rot entspricht. Beim Sehvorgang passiert das Licht die Hornhaut (lateinisch Cornea), die vordere Augenkammer, die Pupille und anschließend die Linse sowie den Glaskörper und trifft dann auf die Netzhaut (lateinisch Retina) (Abb.1-1). Die Retina ist ein geordnetes, polares Netzwerk von Neuronen, das sich an der Rückwand des Augapfels befindet. In der Retina von Wirbeltieren finden sich sieben verschiedene Zelltypen in drei unterschiedlichen Schichten. Das Licht muss zuerst alle diese Schichten durchdringen, um bei den distal gelegenen Photorezeptoren, funktionell unterteilt in Stäbchen und Zapfen, anzukommen. In der Macula, dem Ort der höchsten Sehschärfe, liegen mehrheitlich Zapfen vor. Diese dienen dem Farbsehen, während die in der Peripherie vorherrschenden Stäbchen für das skotopische, also Hell-Dunkel-Sehen, verantwortlich sind.



Nature Reviews | Immunology

Abb. 1–1: Weg des Lichts durch das Auge. Lichtstrahlen passieren die Hornhaut, die vordere Kammer, die Pupille und anschließend die Linse. Danach durchqueren sie den den Glaskörper und treffen schließlich auf die Retina (Hankins, Peirson et al. 2008).

Die Zellkörper der Photorezeptoren formen die äußere nukleäre Schicht (englisch: *outer nuclear layer*, ONL) der Netzhaut. Bei Lichtstimulation leiten die Photorezeptoren ihre Signale an den sogenannten Bändersynapsen zu den Bipolarzellen, deren Zellkörper die innere nukleäre Schicht (*inner nuclear layer*, INL) bilden. Von dort aus gelangen die Signale zur Ganglienzellschicht (*ganglion cell layer*, GCL) und schließlich über Axone des *Nervus opticus* zu anderen distal gelegenen Arealen der zentralen Sehbahn. In der INL bilden Amakrinzellen und Horizontalzellen laterale Verbindungen aus und modulieren so den direkten Signalweg von den Photorezeptoren zu den Ganglienzellen. Amakrinzellen befinden sich nicht nur in der INL, sondern auch in der GCL. Neben retinalen Neuronen existieren in der Netzhaut auch Gliazellen, deren Zellkörper in der INL liegen und deren Fortsätze alle Schichten der Retina durchdringen (Abb. 1–2).

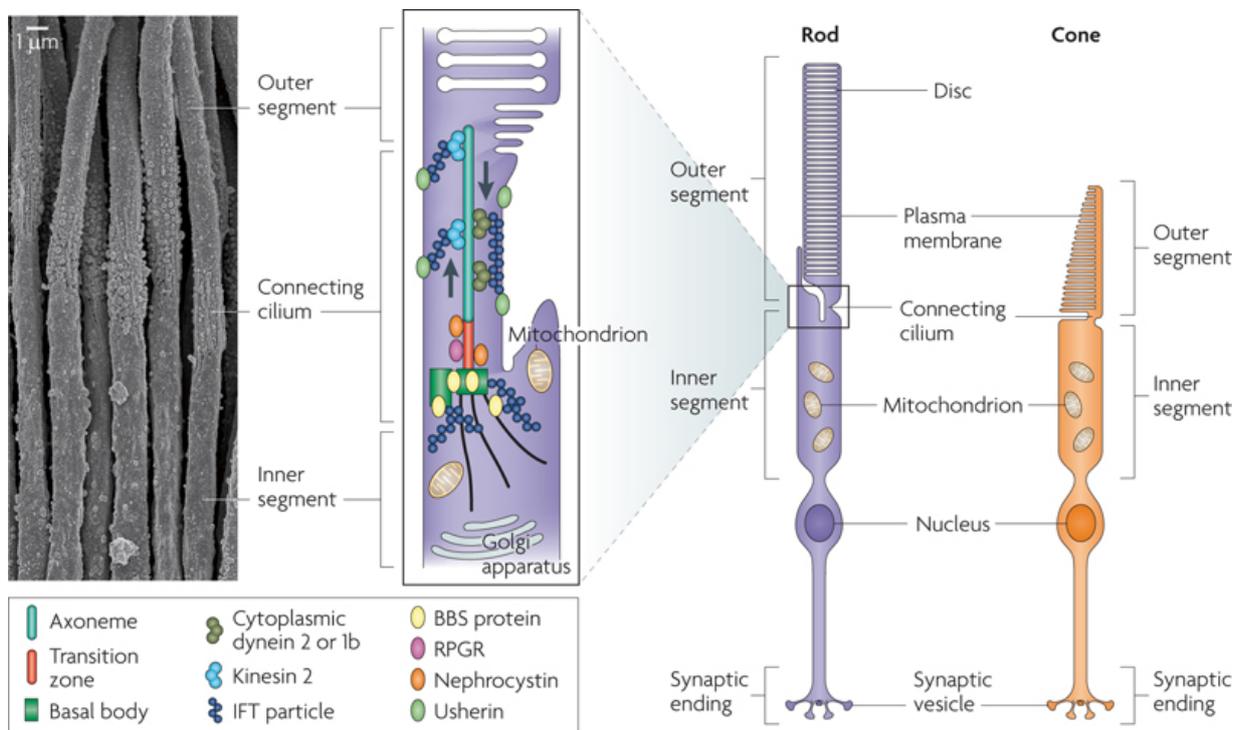


Nature Reviews | Neuroscience

Abb. 1–2: Aufbau der Retina. Die Retina besteht aus mehreren Schichten, die das Licht durchdringen muss, bis es in den Außensegmenten der Photorezeptoren detektiert wird. Zuerst passieren die Photonen die Ganglienzellschicht, die innere plexiforme und nukleäre Schicht und im Anschluss die äußere plexiforme und nukleäre Schicht (Dyer and Cepko 2001).

Beim Sehvorgang passieren Photonen diese verschiedenen Abschnitte der Retina und treffen schließlich in der äußeren nukleären Schicht auf die Photorezeptoren. Diese Zapfen beziehungsweise Stäbchen sind polare Zellen, die morphologisch in ein Außen- und ein Innensegment gegliedert werden können. Die Außensegmente sind spezialisiert auf die Detektion von Licht, die Innensegmente hingegen stellen mit Hilfe der Mitochondrien die Energieversorgung sicher. Die Lichtdetektion in den Außensegmenten erfolgt in den als *Disc* bezeichneten intrazellulären Lipidmembraneinheiten der Stäbchen und in den dazu homologen Membraneinstülpungen der Zapfen. Einfallendes Licht führt zu einer komplexen

Signalkaskade, die bis an die Synapsen weitergeleitet wird. Diese Übersetzung von Licht in ein neuronales Signal bezeichnet man als Phototransduktion.



Nature Reviews | Genetics

Abb. 1-3: Morphologie der Photorezeptoren. Sowohl Stäbchen (links, Rod) als auch Zapfen (rechts, Cone) besitzen einen charakteristischen polaren Aufbau. Die Detektion des Lichts findet in den Außensegmenten statt. Das dort entstehende Signal wandert über die gesamte Membran zu den Synapsen (englisch synaptic ending) (Wright, Chakarova et al. 2010).

Die Phototransduktion beginnt in den apikalen Außensegmenten, in denen bei Dunkelheit hohe cGMP- (zyklische Guanosinmonophosphat) Konzentrationen vorliegen. cGMP bindet an durch zyklische Nucleotide gesteuerten Kanäle (englisch *cyclic nucleotide gated channel*, CNG-Kanal), die dadurch geöffnet werden. In Folge strömen Natrium- und Calcium-Ionen in das Zellinnere ein, man spricht in diesem Zusammenhang vom sogenannten Dunkelstrom. In der Dunkelheit ist die Plasmamembran der Photorezeptoren dadurch auf etwa -40mV depolarisiert. Im ersten Schritt der Phototransduktion wird der G-Protein gekoppelte Lichtrezeptor Rhodopsin durch Eintreffen von Licht in seine aktive Form (Metarhodopsin) überführt. Metarhodopsin aktiviert seinerseits das G-Protein Transducin, das stimuliert im Anschluss die Phosphodiesterase 6 zum Abbau von cGMP. Die sinkende cGMP-Konzentration führt zur Schließung der CNG-Kanäle und somit in Folge zu einer Hyperpolarisation (Abb. 1-4). Das elektrische Signal wird passiv entlang der Zellmembran des Photorezeptors zur Synapse weitergeleitet. Die Änderung der Membranspannung reguliert dort spannungsabhängige Calciumkanäle und verändert damit direkt die

calciumabhängige Ausschüttung von Neurotransmittern an der Bändersynapse zwischen Photorezeptor und Bipolarzelle.

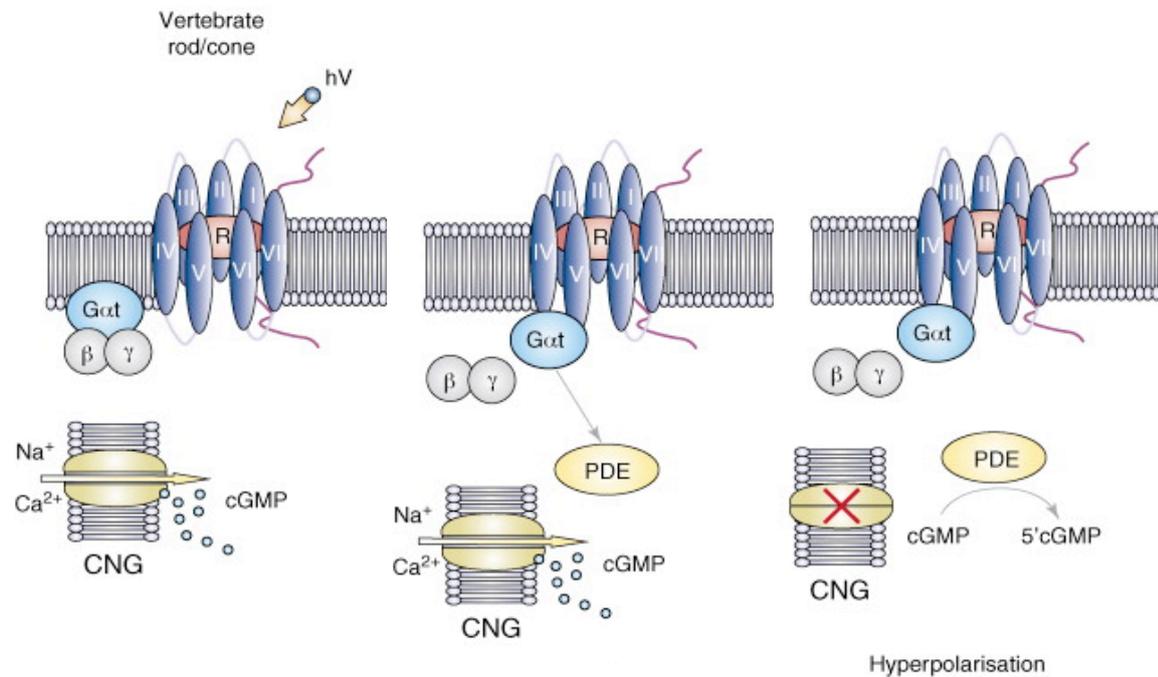


Abb. 1-4: Phototransduktion in Außensegmenten. Im Dunkeln sind CNG-Kanäle in der Retina geöffnet und depolarisieren die Zellmembran durch Na⁺ bzw. Ca²⁺ Einstrom (links). Auftreffendes Licht ($h\nu$) trifft auf Rhodopsin (R) und stimuliert die Phosphodiesterase 6 (PDE) (Mitte). In Folge der erhöhten Phosphodiesterase-Aktivität sinkt die intrazelluläre Konzentration von cGMP und wegen der nun geschlossenen CNG-Kanäle hyperpolarisiert die Zellmembran (rechts)(Hankins, Peirson et al. 2008).

Für den beschriebenen Sehprozess in den Außensegmenten und die anschließende Neurotransmission an den Bändersynapsen der Photorezeptoren spielen Proteine eine entscheidende Rolle. Fokus dieser Arbeit war, den Beginn der Phototransduktion und die synaptische Neurotransmission an den Bändersynapsen genauer zu analysieren. Daher wurden drei zentrale Proteine dieser Prozesse ausgewählt und weiter untersucht: Rhodopsin als Lichtrezeptor, der Stäbchen CNG-Kanal als Übersetzer von chemischem zu elektrischem Signal und der spannungsgesteuerte Calciumkanal Cav1.4 als Steuereinheit für die Ausschüttung von Neurotransmittern.

Das licht-sensitive Rhodopsin gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (englisch *g-protein coupled receptors*, GPCR). Tatsächlich kodieren etwa zehn Prozent aller humanen Gene für GPCR. Mit ihrer charakteristischen heptahelikalen Struktur sind sie die

größte Gruppe von Genprodukten im Menschen. Die eigentliche Lichtdetektion erfolgt durch an Rhodopsin kovalent gebundenes Retinal. Rhodopsin übersetzt – wie alle GPCR – dieses externe Signal in eine Konzentrationsänderung eines sekundären Botenstoffs. Rhodopsin ist in den Stäbchen-Disc-Membranen lokalisiert. Um Licht zu detektieren aktiviert es nach Konformationsänderung durch eintreffende Photonen Transducin. Transducin – die α -Untereinheit des trimeren G-Proteins – beeinflusst über die Phosphodiesterase die zelluläre cGMP-Konzentration und damit indirekt die Offenwahrscheinlichkeit des membranständigen CNG-Kanals.

CNG-Kanäle sind wichtige zelluläre Schalter bei der Signaltransduktion in Photorezeptoren sowie in olfaktorischen Neuronen. Sie werden durch zyklische Nucleotide wie zyklisches Adenosin-Mono-Phosphat (cAMP) und zyklisches Guanosin-Mono-Phosphat (cGMP) aktiviert (Abb. 1-5). In den Photorezeptoren erfolgt die Regulation der Offenwahrscheinlichkeit dieses Kanals ausschließlich durch cGMP. Im aktivierten, also cGMP-gebundenen Zustand, leiten CNG-Kanäle Natrium- und Calcium-Ionen. CNG-Kanäle haben eine komplexe Struktur: Der native Stäbchenkanal ist ein Heterotetramer, das sich aus drei CNGA1-Untereinheiten und einer CNGB1a-Untereinheit zusammensetzt. Jede dieser Untereinheiten besteht aus sechs Transmembranhelices, wobei die Pore von den Segmenten 5 und 6 gebildet wird. Der N-Terminus liegt ebenso wie der C-Terminus auf der intrazellulären Seite. Die Steuerung des Kanals erfolgt über die sogenannte zyklische Nucleotide bindende Domäne (englisch: *cyclic nucleotide binding domain*, CNBD). Sie ist sensitiv für zyklische Nucleotide und damit die Steuerungsdomäne des Ionenkanals. Das Zusammenspiel von Rhodopsin und CNGB1a ist extrem wichtig für eine funktionelle Retina. Mutationen in den zu Grunde liegenden Genen führen zu *Retinitis pigmentosa*. Diese schwere Erkrankung hat zunächst den Verlust der Sehstäbchen und anschließend auch den Verlust der Sehzapfen zu Folge. Dieses pathologische Geschehen führt nach anfänglich eingeschränktem Sichtfeld mit Tunnelblick in den meisten Fällen zum vollständigen Verlust der Sehkraft. Es ist damit die häufigste Ursache für einen genetisch bedingten Verlust der Sehfähigkeit. Bisher sind mehr als 30 unterschiedliche Gene bekannt, die diese Erkrankung auslösen. Unter ihnen ist Peripherin2 ein spannendes Beispiel. Es ist ein in den retinalen Discs exprimiertes Protein mit vier transmembran Domänen, das für die funktionelle Entwicklung und Architektur der Retina notwendig ist. In der adulten Retina ist allerdings bisher keine Funktion bekannt, obwohl man weiß dass es mit der CNGB1a Untereinheit interagiert (Poetsch, Molday et al. 2001, Boesze-Battaglia and Goldberg 2002, Ritter, Khattree et al. 2011, Conley, Stuck et al. 2012). Da Rhodopsin und Peripherin2 in den Discs der Stäbchen kolokalisieren befinden sich diese drei Proteine in unmittelbarer Nachbarschaft zueinander. Sie sind zentrale Elemente der Phototransduktion, an deren Ende der CNG-Kanal steht. Dieser vermittelt bei Öffnung einen Natrium und Calciumeinstrom in die Zelle.

Das führt zu einer Depolarisation der Zelle und beeinflusst direkt spannungsgesteuerte Calciumkanäle an den Synapsen zwischen Stäbchen und Bipolarzellen.

An den Bändersynapsen der Retina wird der spannungsgesteuerte Calciumkanal Cav1.4 exprimiert. Die durch Membranspannung regulierten Calciumkanäle lassen sich entsprechend ihrer elektrophysiologischen, pharmakologischen und strukturellen Eigenschaften charakterisieren. Es existieren zehn verschiedene Typen, die von zehn verschiedenen Genen (CACNA1 A bis I und CACNA1 S) kodiert werden. Low-Voltage-Activated-Calciumkanäle (LVA-Kanäle, Cav3.1–3.3) benötigen eine geringe Depolarisation der Zellmembran um einen transienten Calciumeinstrom herbeizuführen. Sie werden deshalb als T-Typ Kanäle (T wie transient oder *tiny*, klein) bezeichnet und besitzen eine geringe Aktivierungsschwelle sowie eine kleine Einzelkanalleitfähigkeit. Die HVA-(High-Voltage-Activated-) Kanäle lassen sich in L-Typ Calciumkanäle (L für *long lasting* bzw. *large single channel conductance*; Cav1.1-1.4) mit einem lang andauernden Calcium-Einstrom und hoher Einzelkanalleitfähigkeit sowie in N/P/Q- und R-Typ Calciumkanäle (Cav2.1-2.3) unterteilen. Calciumkanäle vom L-Typ sind bei der Freisetzung von Neurotransmittern und Hormonen, der Kontraktion der Herz- und Skelettmuskulatur, sowie der Genexpression und Zelldifferenzierung involviert (Catterall 2000, Dolmetsch, Pajvani et al. 2001, Gomez-Ospina, Tsuruta et al. 2006, Van Petegem and Minor 2006). Zusätzlich werden die HVA-Kanäle nach ihren pharmakologischen Eigenschaften kategorisiert. Cav1.1–Cav1.4 (L-Typ Calciumkanäle) lassen sich durch Dihydropyridine, wie zum Beispiel Nifedipin und Amlodipin, blockieren. Sie werden deswegen als Dihydropyridin-Rezeptoren bezeichnet.

Der retinale Cav1.4 ist ein L-Typ Calciumkanal, der durch Nifedipin blockiert werden kann. Als einziger Vertreter der L-Typ Calciumkanäle kann er nicht durch Calcium inaktiviert werden. Neben der fehlenden calciumabhängigen Inaktivierung (englisch: *calcium dependent inactivation*, CDI) zeichnet er sich durch seine schwache spannungsabhängige Inaktivierung (englisch: *voltage dependent inactivation*, VDI) aus (Wahl-Schott, Baumann et al. 2006). Dadurch vermittelt er einen lang anhaltenden Calciumstrom, der an den sogenannten Bändersynapsen zwischen Stäbchen und Bipolarzellen zur Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat führt. Die dadurch ausgelösten Signale gelangen über den Sehnerv zur weiteren Verarbeitung ins Gehirn. Eine fehlerhafte Funktion von Ionenkanälen kann zu verschiedenen Erkrankungen führen, die zusammenfassend als *Channelopathien* (von englisch *channel*, Kanal und griechisch *pathie* Krankheit) bezeichnet werden.

So haben Mutationen in dem zugrunde liegenden Gen von Cav1.4 Kanälen verschiedene Formen genetisch bedingter Retinaerkrankungen zur Folge. Cav1.4 wird durch das *CACNA1F*-Gen kodiert, das sich auf dem X-Chromosom befindet. Die meisten pathogenen

Mutationen in *CACNA1F* resultieren in einer nicht progredienten Form der *kongenitalen stationärer Nachtblindheit Typ 2* (CSNB2) (Bech-Hansen, Naylor et al. 1998, Strom, Nyakatura et al. 1998). Darüber hinaus sind Mutationen in *CACNA1F* mit der X-chromosomal vererbten Zapfen-Stäbchen-Dystrophie und der *Åland Island Augenerkrankung* (ÅIED, Forsius-Eriksson-Syndrom) assoziiert. Interessanterweise haben auch Mutationen in anderen Genen des Menschen ähnliche Erkrankungen zur Folge, wie beispielweise Mutationen des Calcium-bindenden-Protein 4 (CaBP4, calcium binding protein 4), die zu stationär verlaufender Nachtblindheit, also Symptomen ähnlich der CSNB2, führen. CaBP4 ist außerdem ein bekannter Interaktionspartner von Cav1.4 und ein dem Calmodulin (CaM) verwandtes Protein (Haeseleer, Imanishi et al. 2004). Während CaM ubiquitär exprimiert wird und häufig Calciumkanäle, aber auch andere Proteine reguliert, gehört CaBP4 zu einer Familie von neuronalen Calcium-bindenden Proteinen. Es besitzt ebenso wie CaM vier EF-Hand-Motive sowie zwei globuläre Domänen. EF-Hände sind charakteristische Strukturen zur Calcium-Chelatierung. Interessanterweise ist die zweite EF-Hand von CaBP4 im N-Lobe vermutlich nicht in der Lage Calcium zu binden.

Auffällig bei der Betrachtung dieser Pathologien ist, dass Defekte innerhalb bestimmter Schlüsselstellen der Phototransduktion und anschließender Neurotransmission zur selben Erkrankung führen. Proteine kommen in einem biologischen System niemals isoliert vor, sie stehen immer in Kontakt mit verschiedenen anderen Polypeptiden. Das nähere Verständnis von Proteininteraktionen ermöglicht die Erklärung der Physiologie beziehungsweise Pathophysiologie. Deswegen wurden in dieser Arbeit krankheitsverursachende Mutationen von CaBP4 und die potentielle Interaktion im Netzwerk von Rhodopsin, Peripherin2 und dem Stäbchen-CNG-Kanal untersucht.

Um physiologische Vorgänge wie die Phototransduktion oder die Neurotransmission an der Bändersynapse besser verstehen zu können muss man Wechselwirkungen zwischen Proteinen untersuchen. Dafür benötigt man praktisch anwendbare Werkzeuge, also analytische Methoden, mit deren Hilfe man Interaktionen nachweisen kann. In dieser Arbeit wurde mit Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) gearbeitet. Das Phänomen wurde vom Physiker Theodor Förster erstmals 1958 beschrieben. Fluoreszenzfarbstoffe, sogenannte Fluorophore können durch Licht angeregt werden. Ein angeregter fluoreszierender Donor-Farbstoff überträgt dabei an ein sehr nahes Akzeptor-Fluorophor strahlungslos – ohne Emission von Photonen – Energie. Das führt zur Abschwächung der Donor-Fluoreszenz und zur Verkürzung der Fluoreszenz-Lebenszeit (englisch *lifetime*) sowie zum Anstieg der Akzeptor-Fluoreszenz. Diese Effekte sind die direkte Folge des Energietransfers machen diesen gut detektierbar und somit quantifizierbar. Dabei ist

entscheidend, dass der Transfer maßgeblich von der räumlichen Orientierung und der Entfernung der Fluorophore zueinander beeinflusst wird.

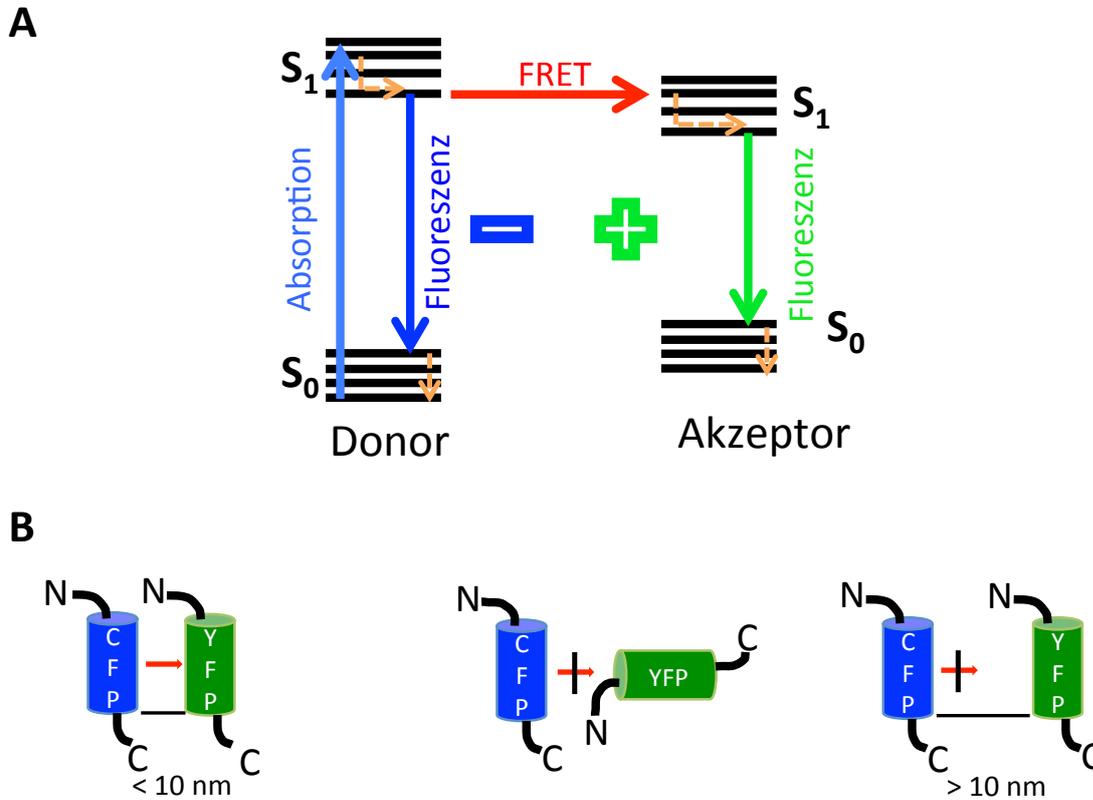


Abb. 1-5. Förster-Resonanz-Energie-Transfer.

A) schematische Darstellung des Energietransfers. Das Donorfluorophor wird durch eintreffendes Licht in den angeregten Zustand S_1 gebracht. Wenn die Voraussetzungen für FRET erfüllt sind wird ein Teil der Energie auf das benachbarte Akzeptorfluorophor übertragen, welches die Energie unter Fluoreszenz wieder abgibt und in den Grundzustand S_0 zurückfällt. B) (links) Voraussetzung für den Energietransfer sind räumliche Nähe und Orientierung, weder bei fehlender Orientierung (mitte) noch bei zu großem Abstand (rechts) kann der Energietransfer stattfinden.

Der Transfer findet bei parallel orientierten und sehr nahen Fluorophoren statt. Sehr nah bedeutet kleiner als 10 nm, also in der Größenordnung von atomaren Wechselwirkungen. Obwohl FRET bereits seit über einem halben Jahrhundert bekannt war, wurde die Anwendung dieser Methode in der medizinischen Forschung erst durch die Nutzung der genetisch codierten Farbstoffe revolutioniert. Ausgangspunkt war dabei das grün fluoreszierende Protein (englisch: *green fluorescent protein*, GFP) aus der Qualle *aequorea victoria*. O. Shimomura, M. Chalfie und R. Tsien erhielten für die Entdeckung und Weiterentwicklung von GFP 2008 den Nobelpreis für Chemie. GFP wurde seither für unterschiedliche Anwendungen optimiert und es stehen je nach Bedarf verschiedene Varianten von fluoreszierenden Proteinen zur Verfügung. Ihnen allen ist gemein, dass Sie

aus elf β -Faltblättern eine Faßstruktur von in etwa 2,4 nm Durchmesser und 4nm Länge aufbauen. Diese zylindrischen Proteine bestehen aus mindestens 200 Aminosäuren. Sie lassen sich problemlos, mit Hilfe gentechnologischer Standardmethoden an andere Proteine fusionieren. Damit ist es möglich sie in lebenden Zellen zu exprimieren und somit sind sie für FRET und zur Untersuchung von Proteinwechselwirkungen nutzbar.

In dieser Arbeit wurde die Kombination von blauem CFP (englisch: *cyan fluorescent protein*) und gelbem YFP (englisch: *yellow fluorescent protein*) bzw. die verbesserten Varianten cerulean (blau) und citrine (gelb) genutzt. Sie wurden eingesetzt um neue Erkenntnisse über die Regulation von retinalen Kationenkanälen zu erhalten.

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine neue quantitative Methode zu etablieren und im Anschluss physiologisch relevante Protein-Protein-Interaktionen nachzuweisen. Dabei sollten unterschiedliche Anwendungen der *three cube* FRET Methode getestet werden.

1. Etablierung der quantitativen *three cube* FRET Methode
2. Der Nachweis von Interaktionen mit Hilfe von löslichen Proteinen und Proteinfragmenten im Kontext des L-Typ Calciumkanals Cav1.4. Dabei sollte die Interaktionsdomäne von CaBP4 im C-Terminus des Kanals identifiziert werden und geklärt werden ob bekannte humanpathogene Mutationen des CaBP4 weiterhin mit dem Calciumkanal interagieren. Außerdem sollte ein Modell entwickelt werden, welches sowohl den physiologischen Zustand als auch den pathologischen Befund erklärt.
3. Die Aufklärung der Interaktion der Stäbchen CNG Untereinheit B1a, Rhodopsin und Peripherin2. Es sollte die Interaktion genauer geklärt werden und dabei sollte im speziellen die Interaktionsdomäne in Peripherin2 eingegrenzt werden. Anschließend sollte das FRET-Modell auch in isolierte murine Stäbchenzellen transferiert werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

Für die gentechnologischen Arbeiten lag eine Genehmigung der Regierung von Oberbayern vor.

2.1 Chemikalien und Lösungen

Alle verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders vermerkt, von den Firmen Merck, Roth, Sigma-Aldrich oder Biorad bezogen und entsprachen der Qualität „pro analysi“ oder „für molekularbiologische Zwecke“. Für die Herstellung aller Lösungen wurde generell hochreines entionisiertes Wasser (Reinstwassersystem Easypure UV / UF, Werner GmbH) verwendet. Bei Anwendungen, bei denen eine sehr hohe Reinheit notwendig war, wie z. B. bei PCRs oder Arbeiten in der Zellkultur, wurden die Lösungen zusätzlich autoklaviert.

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 Isolierung und Amplifikation von Plasmid DNA

Plasmide sind ringförmige, doppelsträngige DNA Moleküle, die in Bakterien unabhängig von der chromosomalen DNA vorkommen. Dort dienen sie der leichteren Verbreitung von genetischem Material unabhängig von der Zellteilung. In der Molekularbiologie werden sie als sog. Vektoren, das sind synthetische Plasmide, verwendet um Fremd-DNA in die Zelle einzuschleusen und diese zu vermehren. Charakteristisch dabei ist der bakterielle Replikationsursprung (origin of replication), eine Antibiotikaresistenz zur Selektion und die multiple cloning site (MCS), die eine Reihe von Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen besitzt die nur einmal im Vektor schneiden. Durch die MCS ist es möglich das Gen von Interesse (engl. *gene of interest*, GOI) in das Plasmid klonieren.

2.2.1.1 Verwandte Plasmide

In der vorliegenden Arbeit wurde für die Versuche in HEK - Zellen pcDNA3 (5,4 kb, Invitrogen) verwandt. Durch den starken Cytomegalievirus (CMV) Promotor gewährleistet dieser Vektor die starke, konstitutive Expression in eukaryotischen Zellen. Zusätzlich ist ein

Ampicillin-Resistenzgen enthalten welches die Selektion der transformierten Bakterien während der Klonierungsarbeiten ermöglicht.

Für die Klonierung im Bereich der AAV Viren wurde pAAV2.1-mcs verwendet (Zitat Michalakakis). Zusätzlich zur MCS und einer Ampicillin Resistenz enthält es Verpackungssignale für die Virusproduktion. Diese *inverted terminal repeats* (ITRs) flankieren schließlich das GOI. Diese Erkennungsmerkmale führen schließlich zur Verpackung des gewollten Gens in das Virus und erlauben schließlich seine Anwendung.

2.2.1.2 Kultivierung von Escherichia coli

Die Kultur von transformationskompetenten escherichia coli (e. coli) Bakterien erfolgte in glukosehaltigem, autoklaviertem Luria-Bertani-Medium (LB+). Zur Selektion wurde dem Flüssigmedium bzw. dem Agar das entsprechende Selektionsantibiotikum zugesetzt. Zur Vermehrung der Bakterienkultur erfolgte die Kultivierung bei 37°C in einem Schüttelinkubator (CERTOMAT® IS, B. Braun Biotech International) bei 225 rpm, bzw. im Fall der Agarplatten in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C.

LB(+)-Medium		LB(+)-Agar	
Pepton	10 g	Agar	15 g
Hefeextrakt	5 g	LB(+)-Medium	ad 1000 ml
NaCl	5 g		
Glucose	1 g		
H ₂ O	ad 1000 ml		
	pH 7,2-7,5		

2.2.1.3 Transformation kompetenter e. coli

Nach dem Protokoll von Sambrook und Russel (2001) wurden ein 100 µl Aliquot von transformationskompetenten E. coli schonend auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 10 – 50 ng Plasmid-DNA bzw. 10 – 15 µl Ligationsansatz ein Hitzeschock von 45 s bei 42°C durchgeführt. Nach 2 Minuten bei 0°C wurden 900 µl SOC-Medium dazu gegeben und das 1,5 ml Eppendorf Gefäß 1h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur 2 min bei 3000 rpm abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und das vorsichtig

resuspendierte Pellet auf Antibiotika-haltigen Platten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert und nach spätestens 20 h bei 4°C aufbewahrt.

SOC-Medium

Pepton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	20 mM
Glucose	20 mM
H ₂ O	ad 1000 ml

2.2.1.4 Alkalische Lyse (Miniprep)

Um die gewachsenen Bakterienkolonien von der Agarplatte auf richtige Integration des Plasmids zu testen, wurde eine alkalische Lyse im kleinen Maßstab durchgeführt. Dabei wurden einzelne Klone von der Platte gepickt und mit 7 ml Antibiotika-haltigem Medium versetzt und über Nacht bei 37°C und 225 rpm vermehrt. Die Zellsuspension wurde am Morgen abzentrifugiert (3500 rpm, 10 min) und die Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse isoliert. 1 µl davon wurden im Restriktionsverdau zur Identifikation der richtigen Klone genutzt.

2.2.1.5 Alkalische Lyse (Maxiprep)

Um DNA in größerer Menge und höherer Qualität zu gewinnen wurde mit 100 ml Kulturen gearbeitet. Nach Inkubation über Nacht (37°C, 225rpm) wurden die Plasmide mit Hilfe des PureYield™ Midiprep System (Promega) isoliert. Dabei wurden die Bakterien ebenfalls alkalisch lysiert, allerdings wurde die DNA zusätzlich über Silicasäulen aufgereinigt. Dadurch ist die DNA sauberer und somit von höherer Qualität als bei den Minipreparationen (2.2.1.4)

2.2.1.6 Quantifizierung von DNA

Zur Quantifizierung der DNA wurden die Absorptionseigenschaften der Nucleinsäuren genutzt. Die spezifische Absorption wurde bei 260nm in einem Eppendorf BioPhotometer vermessen. Aufgrund des Lambert-Beerschen Gesetzes kann von der gemessenen Extinktion auf die Konzentration geschlossen werden. Bei doppelsträngiger DNA und einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine Extinktion von 1 ca. 50 µg/ml. Das Verhältnis der Absorption von 260 nm und 280 nm sollte zwischen 1,7 und 2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen durch Proteine, höhere Werte auf Verunreinigungen durch einzelsträngige DNA bzw. RNA hin. Peptide, Phenole und Aromaten absorbieren bei 230nm. Somit sollte das Verhältnis der OD260 zu OD230 größer als 2 sein.

2.2.2 Auftrennung von Nucleinsäuren

Die Auftrennung von DNA erfolgte über Gelelektrophorese. Genutzt wurde dabei die durch Phosphatreste negative Ladung der DNA. Somit bewegt sich diese im elektrischen Feld Richtung Anode und wird nach ihrer Größe und Form aufgetrennt. Um die Größe der DNA Fragmente abschätzen zu können, wurde ein Größenmarker mit aufgetragen (GeneRuler™, Fermentas). Der Ladepuffer für die DNA Proben (6xdye) enthielt zur Verfolgung des Verlaufs der Auftrennung die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol. Als Laufpuffer diente 1xTBE.

10 x TBE		6 x Dye (Gel-Ladepuffer)	
Tris	540 g	10 x TBE	60 ml
Borsäure	275 g	Ficoll Typ 400	18 g
0,5 M EDTA pH8,0	200 ml	0,5 M EDTA pH 8,0	24 ml
H ₂ O	ad 5 l	Bromphenolblau 50 mg / ml	3 ml
		Xylencyanol 50 mg / ml	3 ml
		H ₂ O	ad 100 ml
1 x TBE (Gel-Laufpuffer)			
10 x TBE	1 l		
H ₂ O	9 l		
	pH 7,2-7,5		

2.2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurden 0,7-2% Agarose Gele genutzt. Die Agarose wurde hierfür in 1xTBE aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (100mg/ml) versetzt, so dass eine Endkonzentration von 0,8 μ g/ml vorlag. Dies diente der Sichtbarmachung der Nucleinsäuren auf dem Geldoc (Biorad) nach der Auftrennung mit 100 bis 135 V.

2.2.2.2 PAGE-Gelelektrophorese

Für sehr kleine Bandengrößen (<440 bp) wurde die Polyacrylamid Gelelektrophorese verwendet. In 5%-Gelen wurden die DNA Fragmente mit 10min bei 100 V und im Anschluss mit 260 V aufgetrennt, danach in 0,8 μ g/ml Ethidiumbromid Lösung angefärbt, mit Wasser gewaschen und unter dem Geldoc ausgewertet. Präparative Gele hatten eine Dicke von 1,5 mm und Gele zu analytischen Zwecken eine Dicke von 0,75 mm.

5% Polyacrylamidgel

Rotiphorese 40	3,75ml
10xTBE	3ml
H ₂ O	ad 30ml
TEMED	20 μ l
APS	70 μ l

2.2.2.3 Isolierung der DNA nach Auftrennung

Um die DNA nach der Gelelektrophorese aus dem Gel zu isolieren, wurden die gesuchten Banden unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und im Fall der Agarose Gele mit einem Kit (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Bioscience) nach Anweisung des Herstellers weiter verarbeitet. Im Fall der präparativen PAGE-Gele wurden die Nucleinsäuren mit Elektroelution isoliert. Die ausgeschnittene DNA-Bande wurde mit 300 μ l 1xTBE luftblasenfrei in einen Dialyseschlauch (Sigma) gegeben und unter Kühlung 2 - 3 h bei 145 mA in einer horizontalen Elektrophoresekammer (Laufpuffer 1x TBE) eluiert. Der Puffer des Dialyseschlauchs, in dem sich nach der Elution die DNA befand, wurde im Anschluss in ein Reaktionsgefäß überführt; es folgte eine DNA-Fällung (2.2.2.4).

2.2.2.4 Präzipitation der DNA

Um DNA aufzukonzentrieren und zu reinigen, wurde diese aus wässriger Lösung ethanolisch ausgefällt. Dazu wurden der vorhandenen Flüssigkeit 10% 3M Natriumacetat pH 5,2 und das 2,5fache Volumen 100% Ethanol (-20°C) zugesetzt. Nach dem Durchmischen wurde das Gefäß bei -80°C für 10 min inkubiert und daraufhin zentrifugiert (4°C, 13000 rpm, 10 min). Das Pellet wurde nochmals mit 100 µl 70%igem Ethanol gewaschen und erneut für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde am Ende unter Vakuum getrocknet (SpeedVac, Heraeus) und schließlich in der gewünschten Menge Wasser aufgenommen.

2.2.2.5 Die Phenol-Chloroform-Extraktion

Durch die Phenol-Chloroform-Extraktion wurde besonders reine DNA gewonnen. Mit diesem Arbeitsschritt wurden Proteine von der DNA entfernt, die bei einem etwaigen nachfolgenden Schritt stören könnten. Das war z.B. der Fall bei Restriktionsenzymen vor einer Dephosphorylierung von Vektor DNA (2.2.3.2), oder nach einer PCR vor einem Restriktionsverdau. Die vorhandene DNA Lösung wurde mit autoklaviertem Wasser auf 300 µl aufgefüllt und anschließend mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Gemisch (Roth 25:24:1) versetzt, stark durchmischt und zentrifugiert. Proteine sammeln sich dabei in der unteren organischen Phase. Mit der DNA-haltigen wässrigen Phase wurde der vorhergehende Schritt wiederholt und abschließend eine Präzipitation der DNA durchgeführt (2.2.2.4).

2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

Neben der Amplifikation und Aufreinigung war es notwendig die Vektor DNA zu linearisieren und das einzufügende Stück (Insert) vorzubereiten. Deswegen war es notwendig enzymatische Modifikationen vorzunehmen. Die dafür notwendigen Enzyme waren von den Firmen Fermentas, NEB bzw. Roche und wurden nach den Anweisungen der Hersteller eingesetzt.

2.2.3.1 Restriktionsverdau

Verwendung fanden Typ-II-Restriktionsendonukleasen, welche die DNA innerhalb einer palindromischen Erkennungssequenz spalten, so dass komplementäre Überhänge an den

5'- bzw 3'-Enden entstanden sind (sticky ends). Als Ausgangsmaterial wurden entweder Plasmid-DNA oder über PCR amplifizierte DNA-Fragmente verwendet. Die Enzymmenge, Zusammensetzung der Puffer und die Reaktionsbedingungen des Restriktionsverdau wurden entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.3.2 Dephosphorylierung

Dadurch, dass beim Restriktionsverdau kohäsive Enden entstehen, die spontan wieder zusammenfinden können, ist es notwendig die 5'-Phosphatgruppen durch die CIP (calf intestinal phosphatase), einer Phosphatase aus Kalbsdärmen, abzuspalten. Somit kann es nur zwischen Vektor und Insert zu einer Ligation kommen. Die Dephosphorylierung wurde nach einer Gelextraktion oder nach einer Natriumacetat-Fällung bei vorheriger Phenol-Chloroform Extraktion durchgeführt. Dabei wurden die CIP (NEB) und rAPid Alkalische Phosphatase (Roche) verwendet.

Standard Dephosphorylierungsansatz NEB

DNA (max 4µg)	qs
10x Puffer NEB3	3 µL
CIP	1 µL
H ₂ O	Ad 30 µL

Die rAPid Alkalische Phosphatase wurde nach Anweisung des Herstellers verwendet.

2.2.4 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden in dieser Arbeit DNA-Fragmente (inserts) zur Klonierung generiert. In speziellen Fällen kamen Sonderformen der PCR, wie die Overlap- oder die Quickchange-PCR zum Einsatz. Das Standardprotokoll wurde dabei bedarfsgemäß angepasst je nach Primer, Länge des Konstrukts bzw. nach Sonderform der PCR.

2.2.4.1 Standard-Klonierungs-PCR

Wegen der Exonukleaseaktivität, d.h. der Fähigkeit Synthesefehler selbst zu erkennen und zu korrigieren, diente die Phusion-Polymerase (Finnzymes) zusammen mit dem entsprechenden Reaktionspuffer (HF-Puffer), der Standard-Klonierungs PCR. Außerdem verfügt sie über eine außergewöhnlich hohe Synthesegeschwindigkeit von 30 - 60 bp/s. Die Bedingungen für die PCR-Reaktion mussten je nach Primer und Template angepasst werden, da sich die Temperatur für die Primeranlagerung (annealing) entsprechend der spezifischen Schmelztemperatur der verwandten Primer verändern. Außerdem richtet sich die Elongationszeit nach der Größe des zu amplifizierenden DNA-Fragments der Ausgangs-DNA (template).

Reaktionsansatz

Primer forward (10pmol/μl)	2,5 μl
Primer reverse (10pmol/μl)	2,5 μl
5x HF-Puffer	10 μl
Template	15 – 30ng
nNTPs	8 μl
Phusion Polymerase	0,5 μl
H ₂ O	ad 50 μl

Reaktionsbedingungen

Initiale Denaturierung	98°C	3min	
Denaturierung	98°C	30s	
Annealing	52-60°C	30s	20 - 40 Zyklen
Elongation	72°C	30 – 60bp/s	
Finale Elongation	72°C	5min	

Im Anschluss wurde das PCR-Produkt aufgereinigt, gefällt, einem Restriktionsverdau unterzogen, isoliert und erneut aufgereinigt, um schließlich Verwendung in der Ligation zu finden.

2.2.4.2 Overlap-PCR

Zusätzlich zur Standard-Klonierungs-PCR kam die Overlap-PCR zum Einsatz. Mit dieser Methode ist es möglich 2 unterschiedliche PCR-Produkte miteinander zu verknüpfen bzw. Sequenzen zu entfernen. Dabei werden zuerst 2 Standard-Klonierungs-PCRs durchgeführt mit jeweils einem flankierenden Primer und einem mit überhängenden Enden, welcher auch Mutationen tragen kann. Die Primer waren so gewählt, dass 2 Produkte entstanden, die teilweise zueinander komplementär waren, welche im Anschluss als Matrizenstränge für die Overlap-PCR dienten und mit Hilfe der flankierenden Primer zu einem Strang verbunden wurden. Dieser bestand nun wie gewünscht aus der Kombination der beiden Ausgangssequenzen.

2.2.4.3 Quickchange-PCR

Die Quickchange PCR ist, wie z.B. die Overlap-PCR, eine Sonderform der PCR. Sie wird eingesetzt, um in einem Plasmid einzelne Nukleotide zu mutieren, zusätzlich einzufügen oder zu deletieren. Ausgangspunkt ist ein doppelsträngiger DNA-Vektor mit dem gewünschten Insert und zwei Mutationsprimer, die - bis auf die Mutationen - komplementär zu den beiden DNA-Strängen sind. Diese Mutationen befinden sich mittig, flankiert von etwa 10-15 Basen und werden während der PCR verlängert. Die Ausgangs-DNA wird im Anschluss durch enzymatischen Verdau vollständig abgebaut. Die PCR wurde mit dem Quickchange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Quickchange-PCR-Protokoll:

Reaktionsansatz

Primer forward (10pmol/ μ l)	1 μ l
Primer reverse (10pmol/ μ l)	1 μ l
10x Reaction-Puffer	5 μ l
Template	10 – 100ng
dNTPs	1 μ l
Quick-Solution	3 μ l
H ₂ O	ad 50 μ l
+ Pfu Turbo DNA-Polymerase	1 μ l

Reaktionsbedingungen			
Initiale Denaturierung	95°C	1min	
Denaturierung	95°C	50s	
Annealing	55-60°C	30s	18 Zyklen
Elongation	68°C	1 min/kb	
Finale Elongation	68°C	7min	

2.3 Kultur und Transfektion eukaryotischer Zellen

Um Kontaminationen zu verhindern, wurden alle Tätigkeiten unter einer Sterilwerkbank (Laminar Air Flow, HERAsafe HS 18, Heraeus) durchgeführt. Die dabei verwandten Medien und Standard-Lösungen wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

2.3.1 Kultur von HEK293-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Interaktionsstudien durchgeführt. Die dafür notwendige heterologe Expression wurden in der humanen Nierenzelllinie HEK293 (human embryonic kidney, ATCC Nr. CRL-1573) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um durch Transfektion mit dem Adenovirus 5 immortalisierte Zellen. Diese wurden in Flaschen (Sarstedt), bei 37°C und 10% CO₂ in einem Inkubator (Heraeus) kultiviert. Als Kulturmedium diente dabei DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) mit D-Glucose (1 g/l bzw. 4,5 g/l), Pyruvat (0,11g/l) sowie 10% FBS (Biochrom) und Antibiotika (100 Einheiten/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin, beides Biochrom). Sobald die Zellen eine Konfluenz von in etwa 80% erreicht hatten, was nach ca. 3 Tagen der Fall war, wurden sie gesplittet. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen durch Trypsin (Trypsin-EDTA-Lösung, 0,05%Trypsin, 0,02% EDTA) vom Boden der Flasche abgelöst in Medium resuspendiert, vereinzelt und im Verhältnis 1:10 in ein neues Kulturgefäß überführt. Alle 4 Wochen wurde ein neuer Gefrierstock aufgetaut und kultiviert.

PBS

NaCl	40 g
KCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ x 12H ₂ O	14,5 g
KH ₂ PO ₄	1,2 g
H ₂ O	ad 5000 ml
pH 7,4 einstellen	20 mM

Trypsin-EDTA-Lösung

Stocklösung (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA)	10 ml
PBS	ad 100 ml

2.3.2 Transiente Transfektion mit GeneExpressoMax

Für die Fluoreszenz-Messungen war es notwendig HEK-Zellen transient, d.h. nicht dauerhaft zu transfizieren. Dadurch konnten die gewünschten fluoreszenzmarkierten Proteine exprimiert. Dafür wurde GenExpressoMax nach den Angaben des Herstellers verwendet. Das Verhältnis von DNA zu Transfektionsreagenz betrug 1:3 und das zugrunde liegende Medium war 75 ml DMEM (4,5 g/l Glucose).

2.3.2.1 Transfektion für FRET-Messungen

Einen Tag vor der Transfektion wurden $5-7,5 \times 10^4$ Zellen auf eine 12-well Platte in 1 ml Kulturmedium ausgesät.

2.4 Herstellung viraler Vektoren

2.4.1 Transfektion der HEK293 T Zellen

Zur Transduktion muriner Retinae war es nötig AAV (Adeno Assoziierte Viren) Vektoren herzustellen. HEK293T-Zellen dienten der Virenverpackung. Dazu wurden die Zellen in DMEM (4,5 g/L Glucose, Pyruvat, 10% FBS) + 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. 80% konfluente Zellen wurden zur Transfektion mit viralen Plasmiden verwendet. Zur Herstellung der AAV Vektoren wurden mit Hilfe der Calcium-Phosphat-Methode drei Plasmide (Vektorplasmid, Adeno-Helferplasmid und Verpackungsplasmid) in die HEK 293T-Zellen eingebracht.

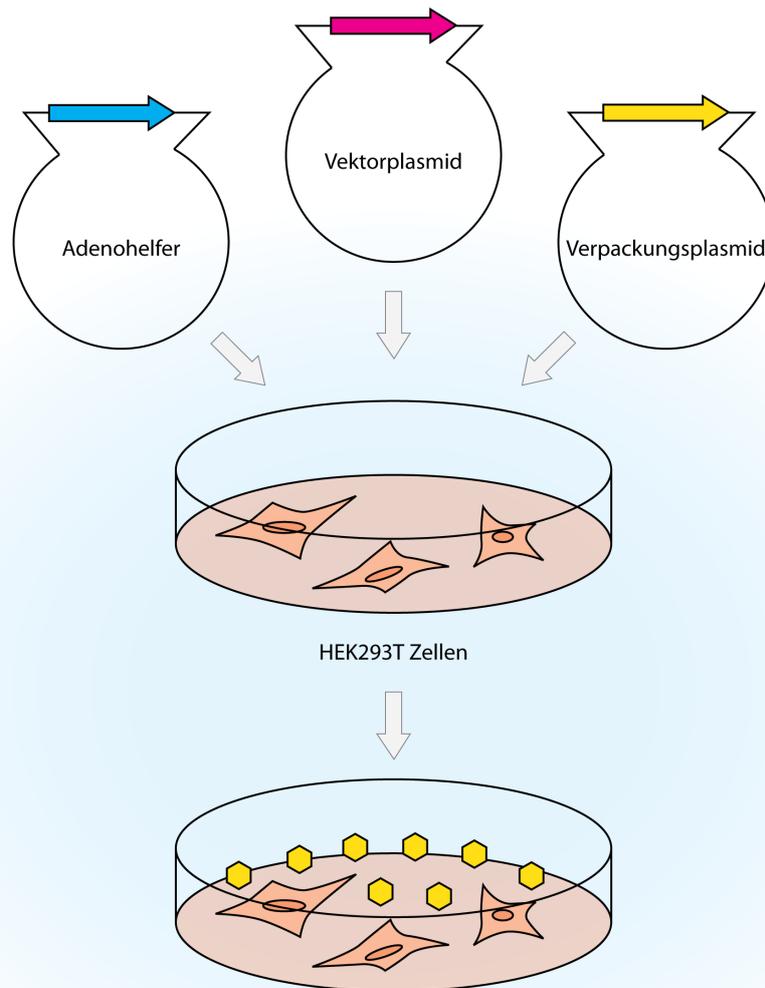


Abb. 2 – 1. Transfektion zur Herstellung von AAV Vektoren: Es sind 3 Plasmide nötig um Viren zu erhalten, die nicht vermehrungsfähig sind, aber trotzdem die gewünschte Geninformation transportieren. Das Vektorplasmid mit der Geninformation, das Adenhelferplasmid und das Verpackungsplasmid damit Viren entstehen können. Da weder das Helfer- noch das Verpackungsplasmid mit ITR flankiert sind enthalten die Viren diese Information nicht und sind somit reine Geninformationsträger, die sich nicht vermehren können.

Der Transfektionsansatz wurde nach der Calcium-Phosphat-Methode hergestellt und zusätzlich vor der Wasserzugabe mit 0,1% Polybrene (Hexadimethrin Bromid) (8 mg/mL Sigma) und 10% Dextran 500 (10 mg/mL, Sigma) versetzt.

Nach dem vortexen wurde dem Tranfektionsansatz 2xBBS zugesetzt und nach einer Inkubationszeit von 10 min wurde er auf 15 Platten mit HEK293T-Zellen gegeben. Die Zellen wurden bei 37°C und 3-5% CO₂ über Nacht gestresst und am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt sowie die Bedingungen auf 10% CO₂ geändert.

2.4.2 Ernte der virushaltigen Zellen

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers (VWR) geerntet und bei 3000 g für 15 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 7,5 mL Lysepuffer aufgenommen und nach dem Resuspendieren 3 mal in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und anschließend bei 37°C wieder aufgetaut. Nach Bedarf können auf diese Art geerntete Zellen bei -80°C gelagert werden.

Lysepuffer

150mM NaCl

50mM Tris-HCl, pH 8

Steril filtrieren

2.4.3 Vorbereiten der Viren

Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese mit Benzonase (50U/mL, VWR) versetzt und bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde zuerst zentrifugiert (25 min, 3700 x g, 4° C) und danach der Überstand über einen Iodixanol Gradienten aufgereinigt. (grieger et al) Die 40% Iodixanol-Phase enthält das Virus und kann bei -80° C gelagert werden. Im Anschluss daran wurde die Reinheit mit Hilfe von Anionenaustauschchromatographie verbessert. Die dabei erhaltenen Fraktionen gleicher Leitfähigkeit wurden auf Filtersäulen (Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Units, 100kDa, Millipore) gegeben und mehrmals mit 3400 x g zentrifugiert. Die Virensuspension blieb im Filter zurück und wurde nach dem Ausspülen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Im Anschluss wurde der Titer mit Hilfe von quantitativer real-time PCR unter Verwendung von SYBR Green bestimmt und zur Transduktion in den subretinalen Raum von black six *wildtyp* Mäusen injiziert.

2.5 FRET-Messungen

2.5.1 Theoretische Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers

Der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) ist ein physikalisches Phänomen von fluoreszierenden Farbstoffen und wurde 1946 erstmals von Theodor Förster beschrieben.

Fluoreszenz ist die Eigenschaft von starren Chromophoren, nach Exzitation mit Licht einer bestimmten Wellenlänge, Licht einer längeren Wellenlänge wieder zu emittieren. Die dabei ausgesandte Energie ist schwächer als die zuvor absorbierte. Das Emissionsspektrum ist daher immer gegenüber dem Exzitationsspektrum in Richtung höherer Wellenlänge verschoben. Dieser Zusammenhang ist unter dem Namen Stoke's Verschiebung bekannt. Voraussetzung für Fluoreszenz ist die Absorption von Photonen. Dabei werden Elektronen im Fluorophor vom Grundzustand S_0 auf die energetisch höheren Zustände S_1 bzw. S_2 angehoben. Dieser Prozess wird Exzitation genannt. Nur vom energetisch niedrigsten angeregten Zustand S_1 kann das Elektron unter Spinerhalt und unter Emission von Licht wieder in den Grundzustand S_0 zurückkehren. Dieser Zusammenhang wird als Kasha's Regel bezeichnet. Nach Kashas Regel entsteht Fluoreszenz nur aus dem niedrigsten Anregungszustand heraus. Das bedeutet, die Form des Fluoreszenzemissionsspektrums bleibt immer gleich, während sich dessen Amplitude in Abhängigkeit der Anregungswellenlänge verändert. Diese Tatsache wird auch als „shape invariance“ in der Fachliteratur beschrieben und ist Grundlage für die Quantifizierbarkeit von FRET.

Für FRET benötigt man zwei Farbstoffe, einen Donor und Akzeptor, wobei das Emissionsspektrum des Donors sich mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors überschneiden muss. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür die Paare *cyan fluorescent protein* (CFP) und *yellow fluorescent protein* (YFP) bzw. die verbesserten Varianten mit höheren Quantenausbeuten, *Cerulean* und *Citrine*, verwendet. Diese vier fluoreszierenden Proteine sind vom *green fluorescent proteins* (GFP) abgeleitet. Sind beide Fluorophore in räumlicher Nähe ($R \leq 10\text{nm}$) und möglichst parallel angeordnet, überträgt der Donor seine durch Absorption erhaltene Energie strahlungslos, über Dipol – Dipol Wechselwirkungen auf den Akzeptor. Als Maß für den Energietransfer dient die FRET-Effizienz. Sie nimmt Werte zwischen 0 und 1 an und entspricht dem Energieanteil, der vom Donor auf Akzeptor übertragen wird. Die FRET-Effizienz ist abhängig vom Abstand R zwischen den Fluorophoren und dem sog. Försterradius R_0 . R_0 ist der Abstand bei dem die Energieübertragung zu 50% stattfindet und charakteristisch für ein bestimmtes FRET Pärchen.

$$E = R_0^6 / (R_0^6 + R^6)$$

Bei der Berechnung der FRET-Effizienz fließt der Abstand R mit der sechsten Potenz ein. Das bedeutet zum einen, dass Donor und Akzeptor sich sehr nahe kommen müssen ($R \leq 10\text{nm}$). Zum anderen bedeutet es, dass die FRET-Effizienz E , bei einem Abstand der Fluorophoren größer als R_0 steil abfällt. Dieser Zusammenhang bedingt die hohe Sensitivität der Methode und macht sie ideal um Protein-Protein Interaktionen nachzuweisen.

FRET ist geeignet Interaktionen in lebenden Zellen zu zeigen. Es bietet aber auch die Möglichkeit Proteine, nach Expression in Bakterien biochemisch aufzureinigen und *in vitro* zu untersuchen. Durch dynamische FRET-Messungen, d.h. Experimente, in denen die FRET-Fluoreszenz in Abhängigkeit der Konzentration von Stoffen im zeitlichen Verlauf untersucht wird, können auch Konformationsänderungen von Proteinen nachverfolgt werden.

2.5.2 Quantifizierung von FRET

Sofern FRET stattfindet ist es an zwei charakteristischen Veränderungen des Fluoreszenzspektrums erkennbar. Die Donorfluoreszenz ist aufgrund der Energieübertragung auf den Akzeptor verringert (*donor quenching*) und dessen Fluoreszenz steigt an (*sensitized emission*) (Abb. 2 – 2). Beide Veränderungen des Spektrums werden zur Quantifizierung von FRET verwendet. In dieser Arbeit wurde eine ratiometrische Methode benutzt, um FRET in lebenden Zellen zu quantifizieren: Das sog. *three cube* FRET, welches den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz quantifiziert und diese auf den Akzeptor normiert.

Nach der spezifischen Donoranregung bei 440 nm führt FRET zum einen zu einer Reduktion der Donoremission (*donor quenching*) und zum anderen zu einem Anstieg der Akzeptorfluoreszenz (*sensitized emission*). FRET bedingt, das nach der spezifischen Donoranregung bei 440 nm, zum einen eine Reduktion der Donoremission (*donor quenching*) und zum anderen ein Anstieg der Akzeptorfluoreszenz (*sensitized emission*) folgt. Diese beiden charakteristischen Veränderungen kann man sich zur Quantifizierung von FRET zu Nutze machen. Des Weiteren wird zwischen destruktiven und nicht destruktiven Methoden unterschieden. In dieser Arbeit wurde eine nicht destruktive, ratiometrische Methode angewandt, um FRET in lebenden Zellen zu quantifizieren: Das sog. *Three Cube* FRET, welches den Anstieg der Akzeptorfluoreszenz quantifiziert und diesen auf den Akzeptor normiert.

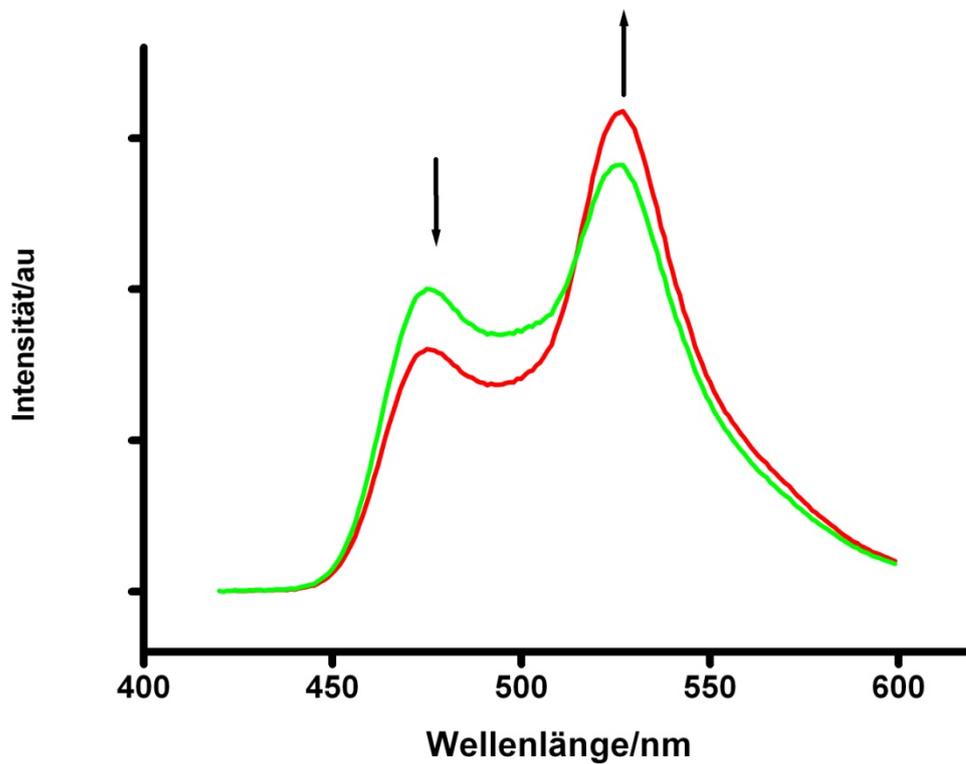


Abb. 2-2: Die Folgen des Energietransfers sind im Summenspektrum von CFP und YFP sichtbar. In Rot ist das Spektrum der beiden Fluorophore dargestellt, falls FRET stattfindet. In grün dargestellt ist der Spektrungsverlauf bei fehlendem FRET. Erkennbar ist dabei der Anstieg der FRET-Fluoreszenz während das Donorsignal abnimmt (angezeigt durch die schwarzen Pfeile an den Peakmaxima).

2.5.3 Das FRET Ratio

Durch das FRET Ratio (FR) wird beim *three Cube* FRET der Energie Transfer quantifiziert. Das FRET Ratio (FR) ist definiert als Anteil des Anstiegs der Akzeptor-Emission durch FRET (*sensitized emission*). Aus einem exemplarischen CFP-YFP-Spektrum (Abb. 2 – 3) lassen sich die Prinzipien des *Three-cube*-FRET herleiten. Die gemessene Akzeptor-Emission nach Donoranregung besteht nicht nur aus dem durch Energietranfer verursachten Teil, sondern auch aus einigen von FRET unabhängigen Komponenten, die durch die spektralen Eigenschaften der Fluorophore herrühren.

Die Anteile der Akzeptor-Emission im FRET-Präparat nach Anregung von CFP oder Cer sind:

FRET (1)

Donor bleed through (2)

Acceptor cross excitation (3)

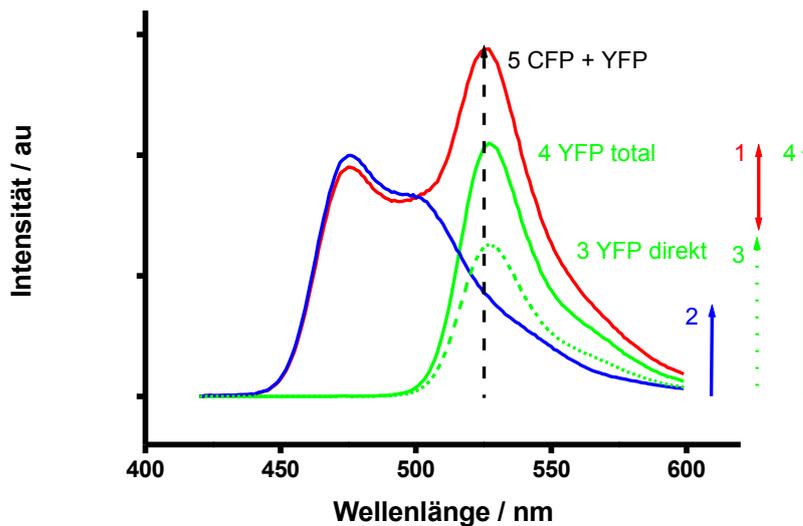


Abb. 2 – 3: Die Komponenten des FRET-Signals. Die YFP-peak-Emission (5) besteht aus mehreren Teilen. Sie ist die Summe aus dem Donor bleed through (2), Acceptor cross excitation (3) und FRET (1).

Dabei wurden folgende Signale ausgewertet:

S_{CFP}	CFP-Filter	Donor-Exzitation – Donor-Emission
S_{YFP}	YFP-Filter	Akzeptor-Exzitation – Akzeptor-Emission
S_{FRET}	FRET-Filter	Donor-Exzitation – Akzeptor-Emission

Zusätzlich werden D und A als Indizes genutzt, um zwischen Zellen mit Donor und Akzeptor (FRET-Präparate) und Zellen mit entweder Donor oder Akzeptor (Kalibrations-Präparate) zu unterscheiden. $S_{\text{FRET, DA}}$ entspricht gemäß dieser Bezeichnung dem Fluoreszenzsignal, das in Zellen, die Donor und Akzeptorfluorophoren exprimieren, mit dem FRET-Filterwürfel gemessen wird.

Um S_{CFP} , S_{YFP} und S_{FRET} erfassen zu können, müssen zusätzlich zu einem FRET-Präparat, welches Donor und Akzeptor exprimiert, auch Kalibrationspräparate gemessen werden, die nur Donor bzw. nur Akzeptor exprimieren. Mit Hilfe dieser Kalibrationspräparate werden Konstanten in Zellen ohne Energietransfer bestimmt, mit deren Hilfe es möglich ist, den *Donor bleed through* und die *Acceptor cross excitation* in Gegenwart von FRET im Präparat zu korrigieren.

Ein Teil an der Emission im Akzeptorkanal (Abb. 2 – 3) stammt, aufgrund der überlappenden Spektren der Fluorophore, vom *donor bleed through*. Die Ursache hierfür ist die Cer- bzw. CFP-Emission im Bereich des Maximums der Akzeptor-Emission. Das Donor-Kalibrationspräparat erlaubt es die Konstante R_{D1} zu bestimmen. R_{D1} , der prozentuale Anteil der Donoremission im Bereich der FRET-Fluoreszenz, ermöglicht es den *donor bleed through* Anteil von der YFP-Emission abzuziehen.

$$R_{D1} = S_{FRET,D} / S_{CFP,D}$$

Durch Messen der CFP-Peak Emission im FRET Präparat ($S_{CFP,DA}$) und anschließender Multiplikation mit R_{D1} erhält man den Anteil vom Donorsignal im FRET-Filter. Subtrahiert man diesen von der gesamten FRET Fluoreszenz ($S_{FRET,DA}$), bekommt man den Wert F_{AD} . F_{AD} entspricht der Akzeptorfluoreszenz im FRET-Kanal nach Donoranregung.

$$F_{AD} = S_{FRET,DA} - R_{D1} \times S_{CFP,DA}$$

F_{AD} enthält zusätzlich zur reinen FRET Fluoreszenz einen Anteil an *acceptor cross excitation*, d.h. YFP bzw. Cit wird direkt durch die Donoranregungswellenlänge stimuliert. Abermals liegt die Ursache in den überlappenden Spektren der Fluorophore. Das Akzeptor-Kalibrationspräparat ermöglicht die Bestimmung der Konstante R_{A1} , mit deren Hilfe dieser Anteil erfasst wird. R_{A1} entspricht dem prozentualen Anteil von YFP-Fluoreszenz im FRET-Kanal.

$$R_{A1} = S_{FRET,A} / S_{YFP,A}$$

R_{A1} wird mit der reinen Akzeptor-Emission im YFP-Filterwürfel multipliziert um den Anteil der *acceptor cross excitation* im FRET-Filterwürfel auszurechnen. Allerdings muss zusätzlich bedacht werden, dass im FRET-Präparat bei YFP-Anregung ein geringer Anteil Donor mit angeregt wird. Dieser wird fälschlicherweise zusammen mit der YFP-Emission erfasst und muss deswegen ebenso wie die davor beschriebenen Phänomene rechnerisch ergriffen werden. Dieser Teil wird *donor cross talk* genannt und wird korrigiert durch die konstante R_{D2} , die im Donorkalibrationspräparat mitbestimmt wird.

$$R_{D2} = S_{YFP,D} / S_{CFP,D}$$

Multipliziert man R_{D2} mit dem CFP-Signal im FRET-Präparat, erhält man den Anteil an CFP-Emission im YFP-Filter bei Akzeptor-Anregung. Den so erhaltenen Wert wird vom Gesamt-YFP-Signal subtrahiert um die tatsächlich auf YFP zurück zu führende Fluoreszenz im YFP-Filterwürfel zu erhalten und damit den *donor cross talk* zu eliminieren. Dieses Ergebnis wird mit R_{A1} multipliziert, um die FRET-Fluoreszenz des Akzeptors ohne Donor zu erhalten F_A .

$$F_A = R_{A1} \times (S_{YFP,DA} - R_{D2} \times S_{CFP,DA})$$

F_A entspricht der Fluoreszenz des Akzeptors im FRET-Filterwürfel und ist um den donor cross talk bereinigt. Daraus ergibt sich, dass die berechneten Größen F_{AD} und F_A sich nur um den durch FRET bedingten Anstieg der YFP-Fluoreszenz unterscheiden. Somit erhält man das FR, welches sich nach Definition dem fraktionellen Anstieg der YFP-Emission durch FRET darstellt, aus dem Quotienten von F_{AD}/F_A .

$$FR = F_{AD} / F_A = [S_{FRET,DA} - R_{D1} \times S_{CFP,DA}] / [R_{A1} \times (S_{YFP,DA} - R_{D2} \times S_{CFP,DA})]$$

Zur Auswertung wird der oben angegeben Term herangezogen. Dabei gilt, ist der erhaltene Wert des FRET RATIO größer als 1, so findet der Energietransfer zwischen den Fluorophoren statt während bei einem Wert gleich 1 kein Transfer erfolgt.

Mit Hilfe des FRET RATIO wurden in dieser Arbeit *steady-state*-FRET-Messungen durchgeführt.

Alternativ zu dieser Methode stehen unterschiedliche destruktive Methoden zur Quantifizierung von FRET zur Verfügung. Eine davon ist das *acceptor photobleaching*. Dabei wird die Donorfluoreszenz nach und vor selektivem Ausbleichen des Akzeptors (*donor dequenching*) gemessen, somit kann man ein und dieselbe Zelle unter FRET Bedingungen und unter Bedingungen, in denen kein Energietransfer möglich ist, untersuchen. Die FRET-Effizienz wird dabei aus den relativen Fluoreszenzintensitäten des Donors, in Abwesenheit ($S_{CFP, D}$), d.h. nach *acceptor photobleaching*, und Anwesenheit des Akzeptors ($S_{CFP, DA}$) berechnet.

$$E = 1 - \frac{S_{CFP,DA}}{S_{CFP,D}}$$

Nachteilig wirkt sich dabei aus, dass die Zeit für das Ausbleichen des Akzeptors nicht unerheblich ist ($t \geq 30\text{min}$) und es oftmals schwer ist den ganzen Prozess ohne Einflussnahme auf den Donor durchzuführen. Eine reduzierte Donoremision nach durch donor bleaching führt zu einer fälschlicherweise reduzierten FRET-Effizienz. Die genannten Punkte sind der Grund dass das *acceptor photobleaching* in dieser Arbeit nicht angewandt wurde.

2.5.4 Experimentelle Durchführung

Nach dem Aussähen und den Transfektionen in 12-well Platten wurden die Zellen mindestens 1 h vor Messbeginn auf IbiTreat Trägern ausgesät. Die DNA-Menge wurde je nach Expressionsstärke der Konstrukte angepasst, lag aber routinemäßig bei 0,75 $\mu\text{g/well}$ und Konstrukt. 12 – 36 Stunden nach Transfektion erfolgten die FRET-Messungen bei Raumtemperatur in glukosehaltiger Badlösung.

FRET – Badlösung

NaCl	140 mM
KCl	5 mM
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	1 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mM
Glucose x 1 H ₂ O	10 mM
Na-Hepes	10 mM
Mit NaOH pH7,4 einstellen	

Die Messungen wurden an einem inversen Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 200 mit einem 40x Öl Objektiv (Fluar 40x OIL/ 1,3 Zeiss, Deutschland) und einem photometrischen System (Till Photonics, Deutschland) durchgeführt. Die Anregung erfolgte mit einem Polychrom V (Till Photonics, Deutschland) bei 440 nm \pm 7,5 nm im Falle von CFP/Cer respektive 505 nm \pm 7,5 nm im Falle von YFP/Cit. Die Fluoreszenz von einer ganzen Zelle wurde mit Hilfe von folgenden Filterwürfeln (Filter; Exzitationsband; Dicroic; Emissionsband; Hersteller) gemessen: CFP (438nm \pm 12nm; 458nm; 483nm \pm 16nm; AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland), YFP (500nm \pm 12nm; 520nm; 542 \pm 16,5 nm; AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland), FRET (438nm \pm 12nm; 458nm; 542 \pm 16,5 nm; AHF Analysentechnik, Tübingen, Deutschland). Die Fluoreszenz wurde mit Axoscope 10.2 ausgewertet.

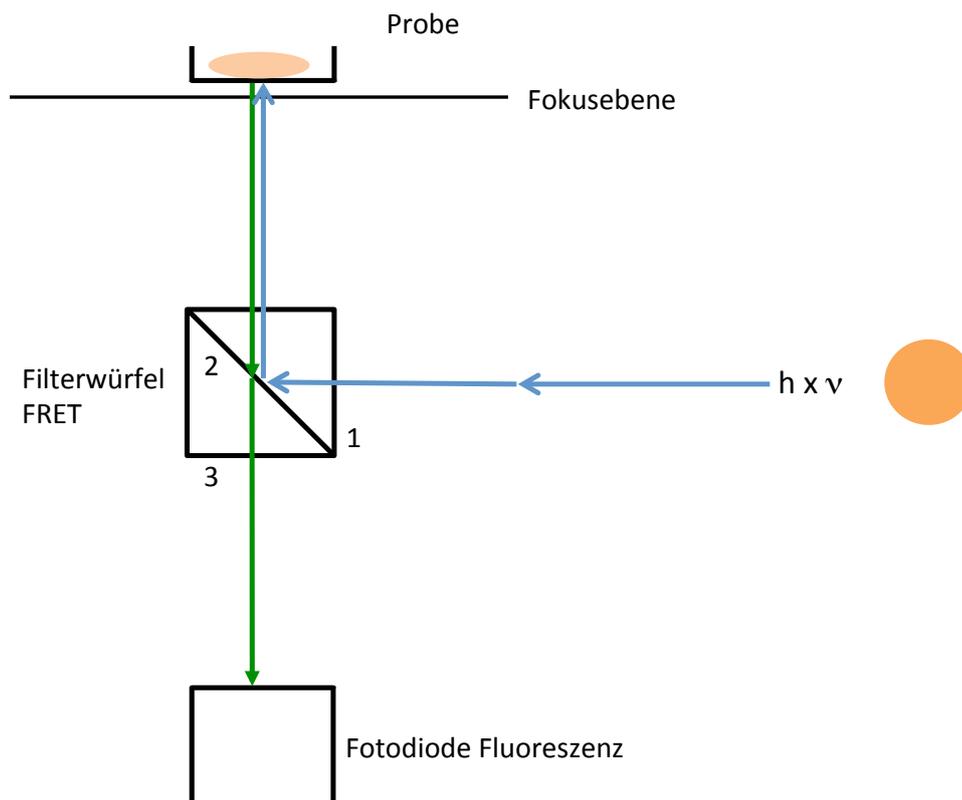


Abb. 2 – 4: Schematische Darstellung des FRET – Experiments. Licht wird von der Xenonlampe (orange) ausgestrahlt und durch den Dicroic im Filterwürfel nach oben zur Zelle im Ibidi Schälchen geworfen. Dort werden die Protein Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und das ausgesandte Licht passiert sowohl Dicroic als auch den Exzitationsfilter und erreicht die Fotodiode zur Quantifizierung.

2.5.5 Korrekturfaktoren des FRET-Mikroskops

Das FRET RATIO ist linear abhängig vom Anteil gebundener Akzeptorfluorophoren. Je mehr Akzeptor – an Donormoleküle gebunden ist, umso höher ist der absolute Wert des FR. Also lässt sich die FRET – Effizienz nur bestimmen, wenn man den Anteil von gebundenen Akzeptormolekülen (A_{geb}) bestimmen oder abschätzen kann. Dazu benötigt man Kenntnis über die verwendeten Fluorophore und Filter.

Also muss diese Berechnung für jedes FRET Mikroskop individuell durchgeführt werden. Man muss zwei Konstanten für den Donor – bzw. für den Akzeptor – Lichtweg bestimmen (M_D bzw. M_A). Da jedes FRET-Mikroskop unterschiedlich ist, kann man im Rahmen der FRET-Berechnung die spektralen Eigenschaften der Filter, der Lampe und die der Fluorophore einfließen lassen. Damit kann man später den freien Akzeptoranteil berechnen und FRET nutzen um Affinitäten zu schätzen (Zitat Yue) Es gilt zwei Konstanten nämlich M_D

(für den Donor) und M_A (für den Akzeptor) für den Donor- bzw. Akzeptor-Strahlengang zu erfassen. Dabei gilt

$$M_D = [\varepsilon_D(\lambda)]_{\lambda=426-450nm} \times [f_D(\lambda)]_{\lambda=529-555nm}$$

und

$$M_A = [\varepsilon_A(\lambda)]_{\lambda=426-450nm} \times [f_A(\lambda)]_{\lambda=529-555nm}$$

wobei $[\varepsilon_X(\lambda)]_{\lambda=426-450nm}$ der durchschnittliche molare Extinktionskoeffizient von Donor (X=D) bzw. Akzeptor (X=A) im Bereich des Anregungsfilters und $[f_X(\lambda)]_{\lambda=529-555nm}$ der Durchschnittswert der Donor- bzw. Akzeptor-Emission im Bereich des FRET-Emissionsfilters ist. Also sind sie direkt proportional zur Fluoreszenz der Farbstoffe nach Anregung für den Donor im FRET – Filterwürfel.

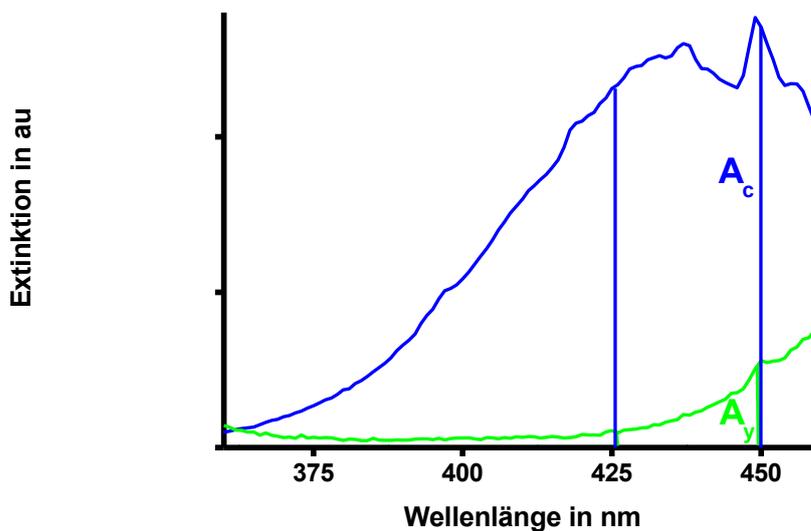


Abb. 2 – 4: Integrale der skalierten Absorptionsspektren von CFP und YFP. CFP ist in blau, YFP in grün dargestellt. Die Integrationsgrenzen bei 426 und 450 nm sind in denselben Farben markiert. A_c und A_y sind die Ergebnisse der Integration, welche im Anschluss durch 24 geteilt werden um den Durchschnittswert zu bestimmen.

Im Detail bedeutet dies, dass die beiden Anregungsspektren auf bekannte Werte skaliert wurden: Das Donorspektrum bei 437 nm auf $26000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$; das Akzeptorabsorptionsspektrum bei 514 nm auf $84000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Anschließend wurde mit dem Produkt der Transmission des Anregungsfilters sowie des Dicroic multipliziert um den Anteil an der Energie zu gewichten, die tatsächlich an der FRET-Probe ankommt. Das erhaltene Spektrum wurde von 426-450 nm integriert und durch 24 geteilt, so dass das Ergebnis dem durchschnittlichen molaren Extinktionskoeffizienten über die Wellenlängen des

FRET-Filters entspricht. (Abb. 2 – 4) Das Integral des Fluoreszenzspektrums wiederum wurde auf die jeweilige Quantenausbeute von CFP (0,4) bzw. YFP (0,61) skaliert und ebenso, zur Erfassung des Strahlengangs mit dem Produkt der Transmission des Dicroic und des Emissionsfilters multipliziert um mögliche Energieverluste im Strahlengang zu erfassen. Im Anschluss daran wurde das Intergral von 529-555 nm erfasst sowie durch 26 dividiert (Abb. 2 – 5). Dadurch wurde die durchschnittliche Fluoreszenz über den Emissionfilter erfasst. Die Produkte, M_D bzw. M_A , erfassen die Eigenschaften des Strahlengangs im FRET-Mikroskop und die Fluorophore. Im Fall dieser Arbeit wurde M_D mit

$$M_D = 23,791 \times 1,603 \times 10^{-3} = 0,03813$$

und M_A mit

$$M_A = 2,3131 \times 9,1451 \times 10^{-3} = 0,02186$$

bestimmt.

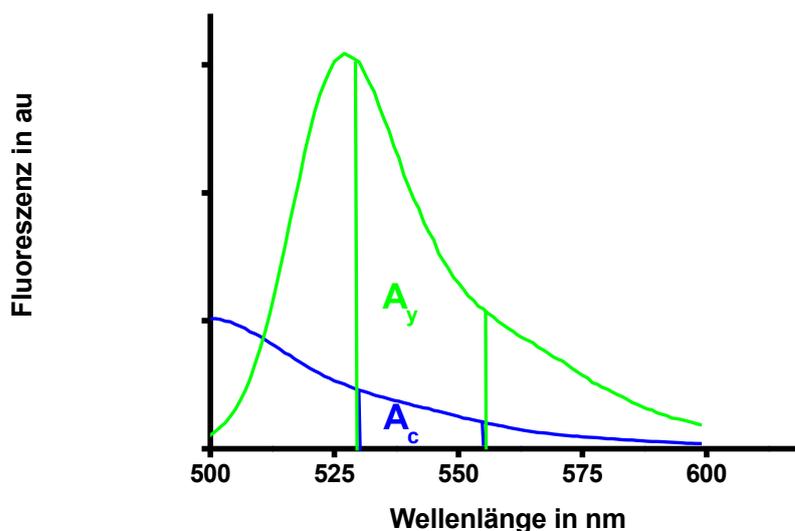


Abb. 2 – 5: Integrale der skalierten Emissionsspektren von CFP und YFP. CFP ist in blau, YFP in grün dargestellt. Die Integrationsgrenzen bei 529 und 555 nm sind ebenso markiert. A_c und A_y sind die Ergebnisse der Integration, welche im Anschluss durch 26 geteilt werden um den Durchschnittswert zu bestimmen.

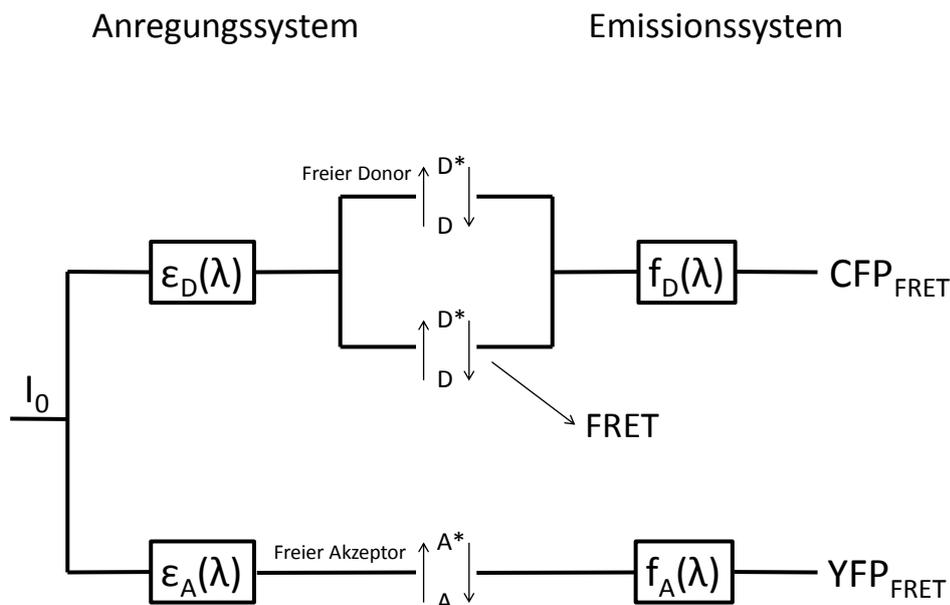


Abb. 2 – 6: Vereinfachtes Schema aus zur Erklärung von M_A und M_D . $\epsilon_x(\lambda)$ ist der molare Extinktionskoeffizient und $f_x(\lambda)$ die durchschnittliche Fluoreszenz von Donor ($X=D$) bzw. Akzeptor ($X=A$). D^* und A^* stehen für die angeregten Zustände von Donor und Akzeptor. Die eingestrahler Intensität I_0 führt in Abhängigkeit von $\epsilon_x(\lambda)$ zur Anregung der Fluorophore und bei räumlicher Nähe potentiell zu FRET aber auch zu FRET unabhängiger Fluoreszenz: CFP_{FRET} und YFP_{FRET} falls CFP nicht nahe genug an YFP ist

Nur gebundene Fluorophore, d.h. Donor- und Akzeptorfarbstoffe in unmittelbarer Nachbarschaft können zu FRET führen. In FRET-Präparaten gibt es aber immer einen gewissen Anteil freier Farbstoffe, die durch das Licht zur Fluoreszenz angeregt werden. Mit Hilfe der Konstanten M_D und M_A lässt sich nun die gesamte Anzahl dieser Moleküle abschätzen:

$$CFP_{geschätzt} = \frac{\left[CFP_{FRET, ohne Transfer} + E_{eff} \times YFP_{FRET, Transfer} \times \frac{M_D}{M_A} \right]}{M_D}$$

$$YFP_{geschätzt} = \frac{YFP_{FRET, ohne Transfer}}{M_A}$$

$CFP_{geschätzt}$ wird noch zusätzlich um den Anteil der Donormoleküle ergänzt, die bereits im Energietransfer beteiligt sind. D. h. der Term $E_{eff} \times YFP_{FRET, Transfer} \times M_D/M_A$ berücksichtigt die

Abnahme der Donoremission aufgrund des Transfers und berücksichtigt mit M_D/M_A die spektralen Eigenschaften der FRET-Apparatur.

Mit Hilfe der so kalkulierten Werte lässt sich über lineare Regression A_b schätzen, damit die FRET – Effizienz eines Donor – Akzeptorpärchens bestimmen und schließlich relative Affinitäten im FRET – System berechnen.

2.5.6 Gestaltung der Fusionsproteine

Beim 3³-FRET handelt es sich um eine sehr sensitive Methode zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Daher muss die Anbringung der Fluoreszenzmarkierungen gut durchdacht sein. Für die Untersuchung der verschiedenen Typen von Ionenkanälen sind unterschiedliche Strategien nötig um die Wechselwirkung mit den jeweiligen Interaktionspartnern zu untersuchen. Beispielsweise muss bei Transmembranproteinen beachtet werden, dass bei ungerader Anzahl der Transmembrandomänen die Platzierung des Fluorophors kritisch ist (Abb. 2 – 7)

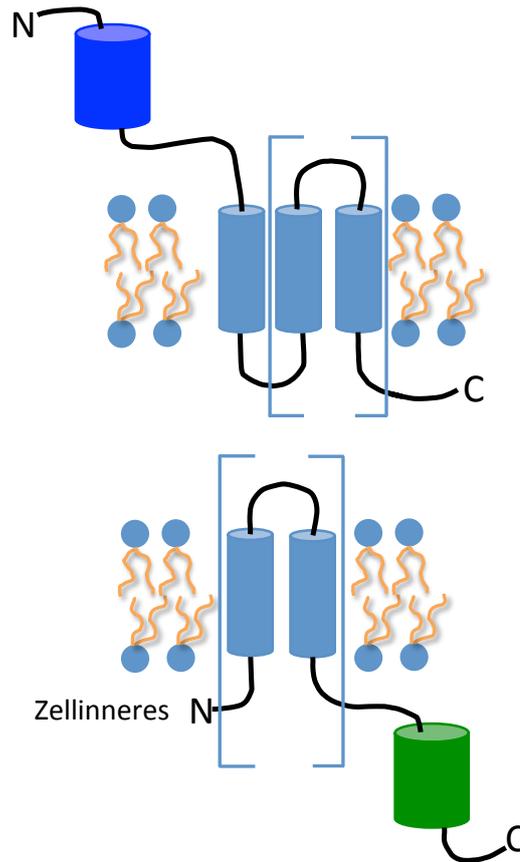


Abb. 2-7: Platzierung der Fluorophore an Transmembranproteinen. Bei gerader Anzahl der Transmembrandomänen (oben) gibt es nur eine Möglichkeit auf welcher Seite der Membran die Fluoreszenzmarkierungen angebracht werden können. Dagegen ist bei ungerader Anzahl der Domänen (unten) Kenntnis des zu markierenden Proteins nötig, um zu Wissen auf welcher Seite der Membran die GFP-Derivate angebracht worden sind.

Bei den Untersuchungen zum Thema CNG handelt es sich um membranständige Proteine. Das Fluorophor wurde in diesem Fall intrazellulär angebracht da dort konstantes Milieu herrscht. GFP-Derivate können als unterschiedliche Sensoren genutzt werden, weil sie auf veränderte Bedingungen Ihrer Umwelt reagieren. Da man bei FRET die spektralen Eigenschaften aber nicht verändern möchte, ist das Zellinnere der ideale Ort um die Fluoreszenzfarbstoffe zu beherbergen. Gerade im Fall des Rhodopsins wie bei allen Proteinen mit einer ungeraden Anzahl an Transmembrandomänen ist es möglich die Markierung am falschen Terminus anzubringen. Nämlich so, dass sie entweder in die Discs zeigt, oder außerhalb der Zelle liegt (Abb. 2 – 9). Ähnlich liegt der Fall bei Untersuchungen zum Peripherin2. Gerade bei Cer-Peripherin 2TM13 kann es, wie bei allen Proteinen mit ungerader Anzahl an Transmembrandomänen, passieren, dass falsch-negative Ergebnisse

kreiert werden, weil die FRET-Partner auf gegenüberliegenden Membranabschnitten angebracht worden sind.

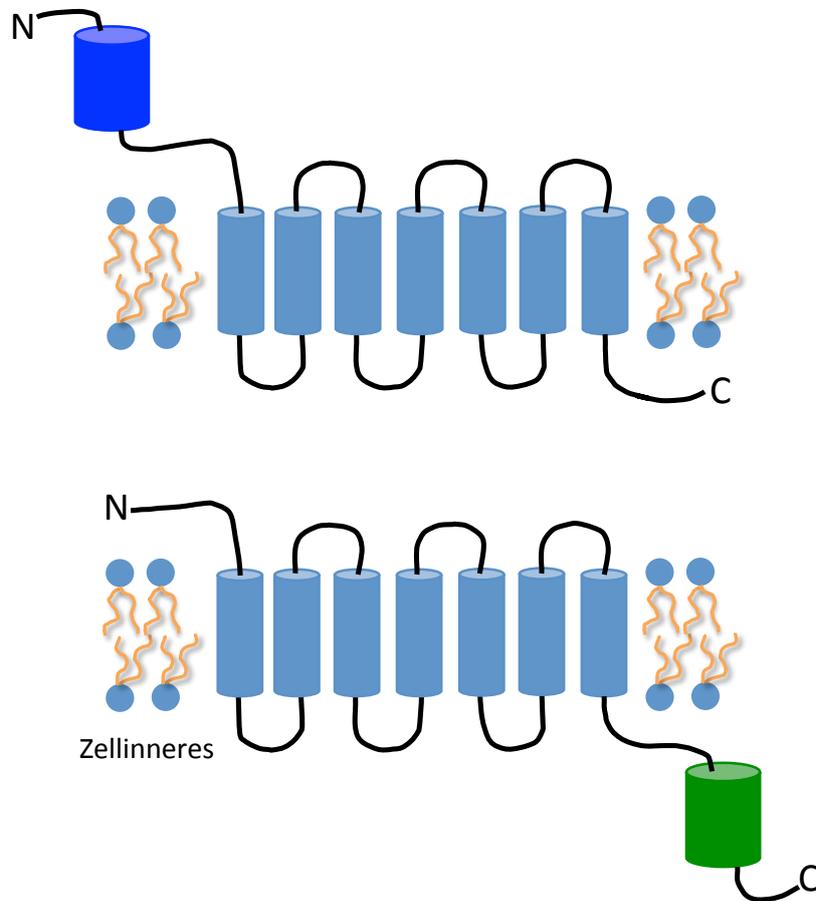


Abb. 2 – 9: Lokalisation der Fluorophore im Fall des heptahelikalen Proteins Rhodopsin. Um ein möglichst gleichbleibendes Milieu was den pH Wert angeht zu haben, bietet es sich an, die Fluoreszenzfarbstoffe im inneren der Zelle zu platzieren.

2.6 Erfassung der Geräteeigenschaften

Fluoreszenz ist im Gegensatz zur Absorption abhängig von der eingestrahlenen Lichtintensität. Dabei gilt: Je heller das eingestrahlte Licht ist, umso mehr Fluoreszenz wird erzeugt. Die hier verwendete Methode des *three-cube* FRET ist, abhängig vom einem möglichst hohen Signal/Rausch Verhältnis, in der Lage, auch sehr schwache Interaktionen aufzulösen. Da insbesondere den Versuchen aus dem Bereich des CaBP4 schwache Protein-Protein-Wechselwirkungen zu Grunde liegen, wurden zu Beginn der Arbeit geräteabhängige Parameter erfasst, da starke Schwankungen der Lichtintensität die Ergebnisse entscheidend verfälschen könnten.

2.6.1 Untersuchungen zur Lichtintensität

Um die Messung von Protein-Interaktionen mit möglichst hoher Auflösung zu erzielen, wurde zuerst überprüft, wie sich die Messausstattung, bestehend aus Lichtquelle und Mikroskop, ohne Probe verhält. Damit wurde geklärt, ob die apparative Ausstattung selbst für diese Art von FRET-Experiment geeignet ist. Die offensichtlich größte Quelle von Störungen sind Schwankungen der Anregungsintensität in der Fokusebene. Die Ursachen dafür sind sehr unterschiedlich: Beispielsweise rotiert der Spannungsbogen der Xenonlampe, was zu einem ständig wechselnden Abstand der Lichtquelle zur Probe führt. Aber auch Spannungsschwankungen im Netzteil verändern die Intensität des Anregungslichts. Außerdem ist der Verschleiß, der zu einer stetigen Abnahme der Lichtleistung der Lampe bis zu ihrem Ausbrennen führt, eine signifikante Fehlerquelle. Um Schwankungen des Exzitationslichts zu erfassen, wurde die Intensität im CFP-, YFP- und FRET-Würfel gemessen und hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs analysiert.

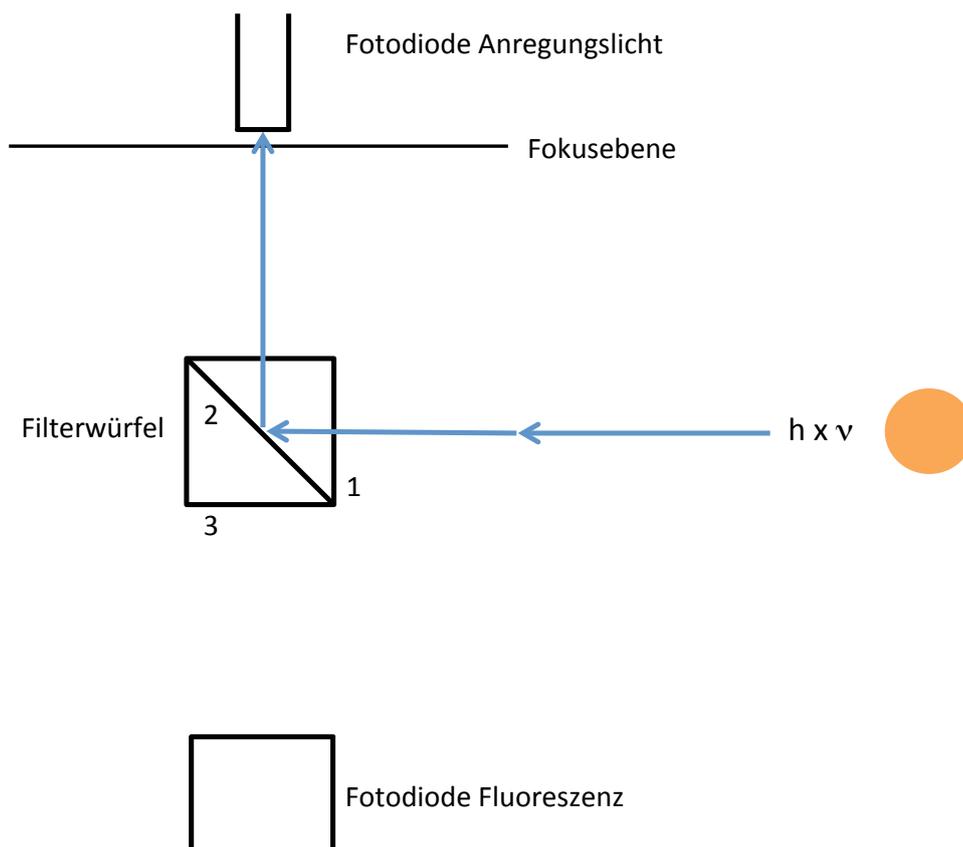


Abb. 2 – 10: Messen der Lichtintensität in der Fokusebene. Licht ($h \times v$) strahlt von der Lampe (orange, rechts) auf den Filterwürfel. Dabei passiert es den Exzitationsfilter (1), den Dicroic (2) und erreicht dann die Fotodiode in der Messebene. Diese erfasst die Lichtintensität. Die Daten werden auf Schwankungen untersucht.

Nachdem zuerst überprüft wurde, dass die manuell mit Hilfe eines Voltmeter gemessenen Werte mit denen der Software Axoscope 10.2 aufgezeichneten übereinstimmten, wurde die Lichtintensität im Verlauf des Strahlengangs nach den Filterwürfeln gemessen (Abb. 3 – 1). Die Abbildungen 2 – 11 bis 2 – 14 zeigen, dass das Exzitationslicht des Polychromes V - unabhängig vom Filter - einer geringen Schwankungsbreite und einer sehr geringen Abweichung vom Mittelwert unterliegt.

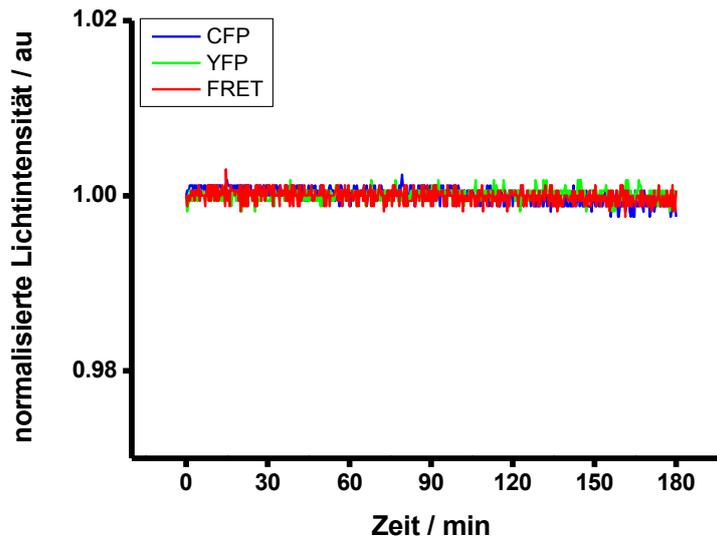


Abb. 2 – 11: Der zeitliche Verlauf der Lichtintensitäten in den Filterwürfeln ist konstant. Das Anregungslicht im CFP- (blau), YFP- (gelb) und FRET-Filterwürfel (grün) bleibt über 3 h hinweg konstant.

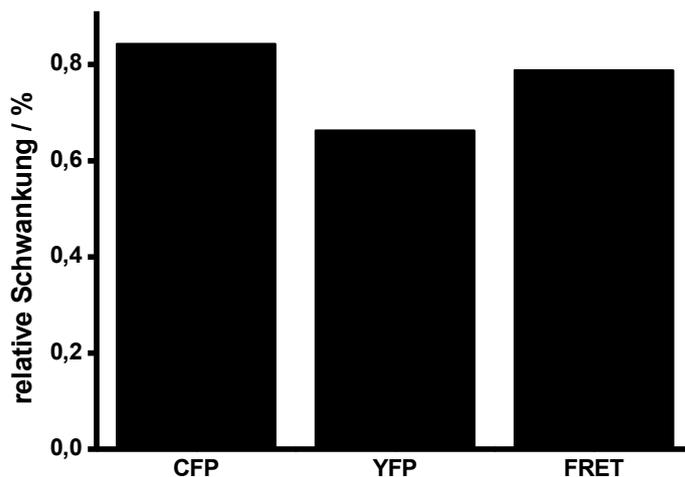


Abb. 2 – 12: Die relative Schwankung der Lichtintensitäten ist gering. Die Schwankungen im CFP (links), YFP (mitte) und FRET-Filterwürfel (rechts) sind in einer ähnlichen Größenordnung (zwischen 0,6-0,9%). Auf der Y-Achse ist die maximale Schwankung im Bezug zu ihrem Mittelwert angegeben.

Die relativen Schwankungen der Intensitäten betragen weniger als 1% ihrer Mittelwerte unabhängig von der Auswahl der Anregungswellenlänge λ und dem Filtersatz (CFP, YFP oder FRET). Das Gleiche zeigte sich bei der Untersuchung der relativen Standardabweichung, die weniger als 0,17% betrug. Daraus ergibt sich der sehr geringe Standardfehler, welcher bei 0,0016% lag.

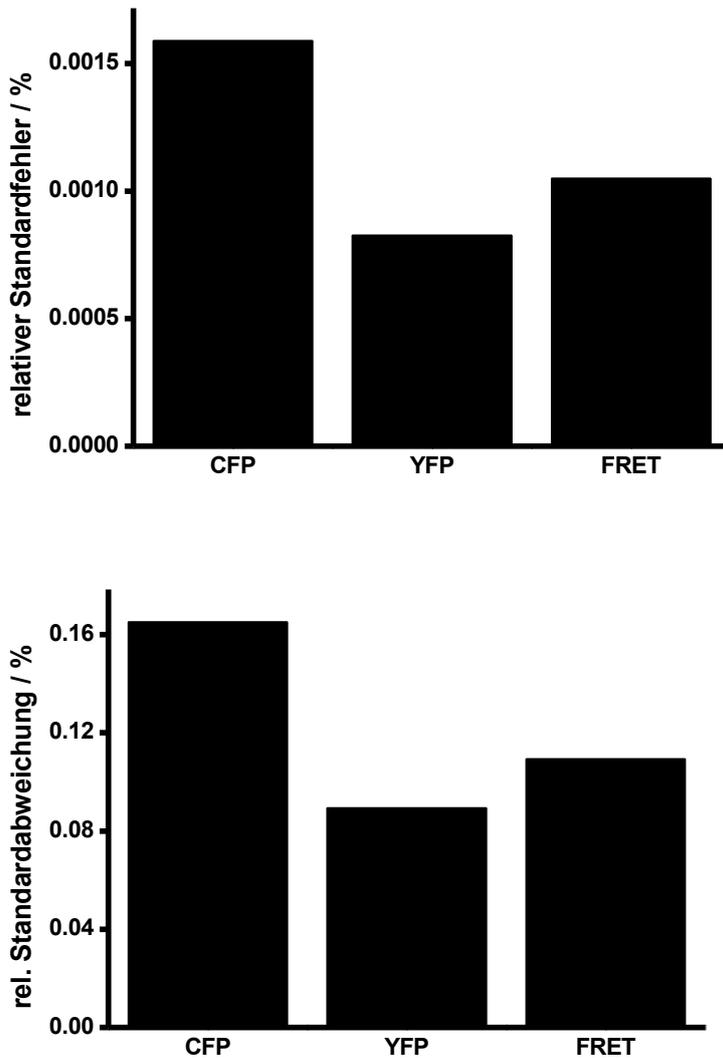


Abb. 2 – 13: Der relative Standardfehler und –abweichung der Lichtintensität sind klein. Oben dargestellt der relative Standardfehler (%) in den Filterwürfeln über 3 h hinweg. Unten die Standardabweichung (%). CFP (links), YFP (mitte) und FRET (rechts)

2.6.2 FRET-Konstanten im Zeitverlauf

Die Konstanten für den *donor bleedthrough* R_{D1} und die *acceptor cross excitation* R_{A1} wurden zu jedem Experiment erfasst und über ein halbes Jahr aufgezeichnet. R_{D1} wird benötigt um das Signal der YFP – Emissionswellenlänge nach Donor – Anregung um den CFP – Anteil zu korrigieren. R_{A1} hilft den Anteil von YFP zu erfassen, der direkt durch Donoranregung, also Fälschlicherweise bei der FRET – Messung auftritt. Mit diesen beiden Konstanten kann rein rechnerisch, die durch FRET entstandene Akzeptorfluoreszenz ermittelt werden. Beide Werte verhalten sich schwankend. Dies deutet auf noch nicht identifiziertes Optimierungspotential der Einflussfaktoren des FRET-Experiments hin. Da es sich beim *three cube* FRET um eine sehr sensitive Methode handelt werden die Kalibrationspräparate grundsätzlich jeden Tag neu erfasst um präzise zu arbeiten.

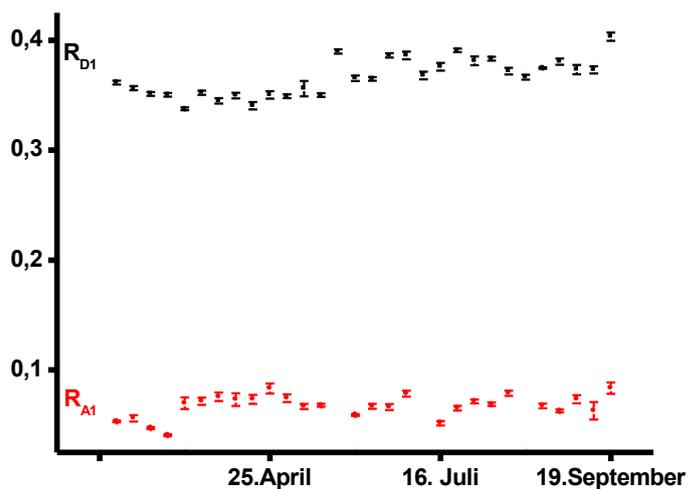


Abb. 2 – 14: Die Konstanten R_{D1} und R_{A1} schwanken im Verlauf eines halben Jahres. Die Werte von R_{D1} (oben, schwarz) und R_{A1} (unten, rot) sind mit Standardfehler (Fehlerbalken in schwarz bzw. rot) dargestellt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Untersuchung der Interaktion von CaBP4 und Cav1.4

Zur Untersuchung der Interaktion von CaBP4 und Cav1.4 wurden verschiedene fluoreszierende Konstrukte des C-Terminus von Cav1.4 zusammen mit CaBP4 koexprimiert (Abb. 3-1). Der C-Terminus von Cav1.4 besteht aus drei Schlüsselmotiven: EF-Hand, IQ-Domäne, und ICDI. Die ICDI im distalen C-Terminus unterscheidet Cav1.4 deutlich von den anderen L-Typ Calciumkanälen denen diese Domäne fehlt. Sie verhindert die Calciumabhängige-Inaktivierung, die für andere L-Typ Calciumkanäle charakteristisch ist. Deswegen wird sie „Inhibitor der Calciumabhängigen-Inaktivierung“ (ICDI) genannt (Wahl-Schott, Baumann et al. 2006). CaM interagiert mit Cav1.4 und anderen L-Typ Calciumkanälen (Griessmeier, Cuny et al. 2009). Für diese Wechselwirkung ist eine Sequenzfolge von Aminosäuren im proximalen C-Terminus notwendig. Diese beginnt mit den Aminosäuren Isoleucin (Einbuchstabencode I) und Glutamin (Einbuchstabencode Q) und wird deshalb als IQ-Domäne bezeichnet. Sie ist über die Familie der Cav1.x konserviert. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob auch CaBP4 als zu CaM strukturell ähnliches Protein an diese Domäne bindet. Dazu wurden die statischen FRET-Signale von verschiedenen Variationen des C-Terminus von Cav1.4 und CaBP4 gemessen. Dabei zeigte sowohl der ganze C-Terminus von Cav1.4 als auch der von Cav1.4 Δ ICDI in Kombination mit CaBP4 ein deutliches FRET-Signal. Um die Wechselwirkung weiter einzuschränken, wurde das Peptid Cav1.4 Δ ICDI schrittweise weiter verkürzt. Also wurde EF – IQ und schließlich nur die EF-Hand mit CaBP4 koexprimiert. Das FRET-Signal von EF – IQ zusammen mit CaBP4 war ebenso hoch wie das von Cav1.4 und CaBP4. EF-Hand und CaBP4 gemeinsam zeigten ein FRET RATIO von 1, was auf eine fehlende Interaktion oder räumlich unpassend angeordnete Fluorophore hindeutet. Letzteres kann nicht final ausgeschlossen werden ist in diesem Fall aber unwahrscheinlich, da die Fluorophore immer an derselben Stelle angebracht wurden und der C-Terminus von Cav1.4 nur sukzessive verkürzt wurde (Abb. 3-2).

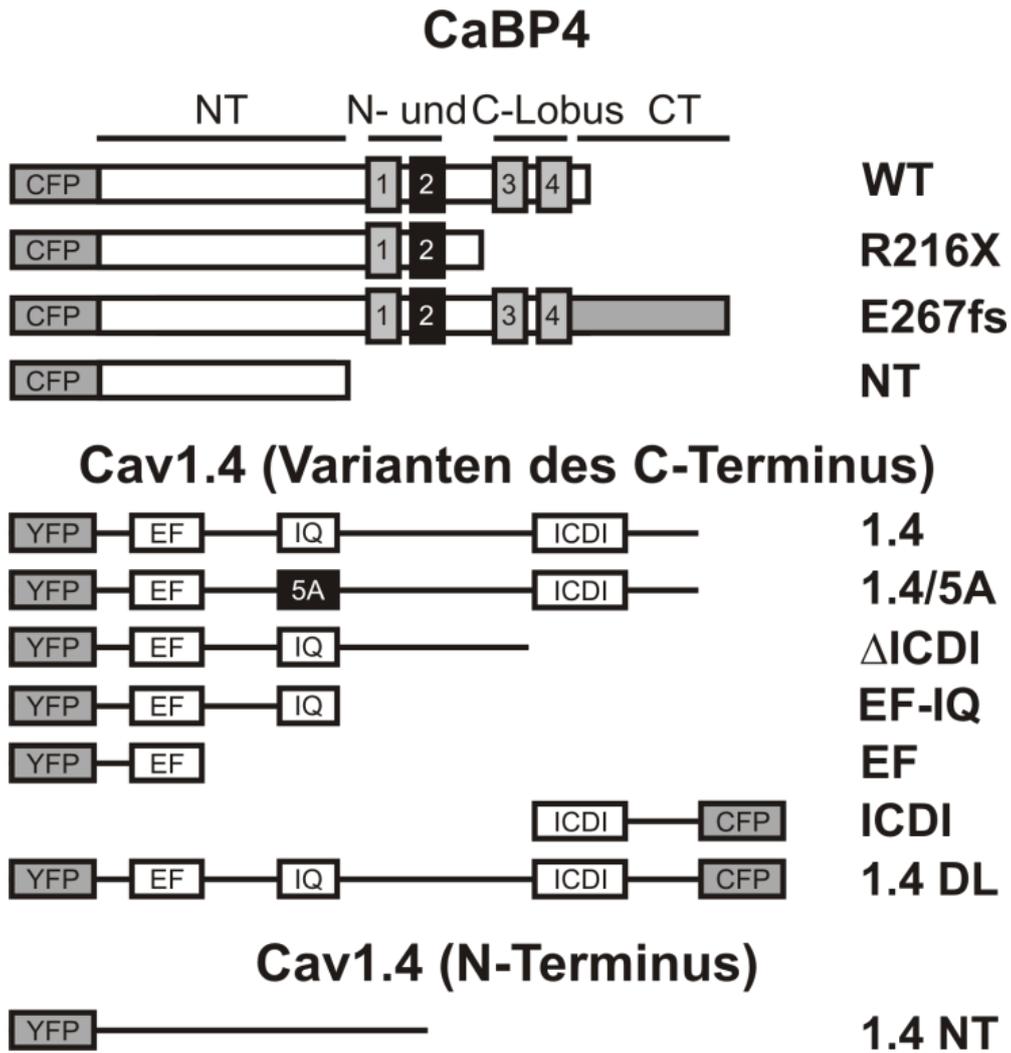


Abb. 3 - 1: FRET – basierte Konstrukte zur Untersuchung am Cav1.4. Oben Varianten von CaBP4; EF-Hände sind mit 1, 2, 3, 4 gekennzeichnet; Mitte C-Terminus vom Cav1.4, Unten Cav1.4 N-Terminus

Dieses Ergebnis deutet auf eine Wechselwirkung von CaBP4 mit der IQ-Domäne hin. Um diese Hypothese zu prüfen wurde zusätzlich CaBP4 mit einer Mutante des C-Terminus von Cav1.4 koexprimiert, deren IQ-Domäne verändert wurde. Die ersten fünf Aminosäuren des IQ-Motivs wurden durch fünf Alanine ersetzt, weswegen die Mutante als 1.4/5A bezeichnet wird. Beim FRET-Experiment von 1.4/5A und CaBP4 wurde ein FRET RATIO nahe 1 ermittelt. Dieses Ergebnis ist ein Indiz für eine fehlende Interaktion.

Interessanterweise bindet CaBP1 – ein genetischer Verwandter von CaBP4 – an Cav1.2 an einer Stelle im N-Terminus des Calciumkanals (Oz, Tsemakhovich et al. 2011). Hinzukommend sind CaM Bindungsstellen in den N-Termini von Cav1.2 sowie Cav1.4 bekannt. Das Motiv für die CaBP1 Wechselwirkung ist über die Familie der L-Typ Calciumkanäle nicht konserviert. Um eine mögliche Interaktion des N-Terminus von Cav1.4 und CaBP4 zu überprüfen wurde ein YFP-markierter N-Terminus kloniert und zusammen mit CaBP4 koexprimiert. Das FRET-Signal wurde nahe 1 ermittelt. Somit ist eine Wechselwirkung unwahrscheinlich.

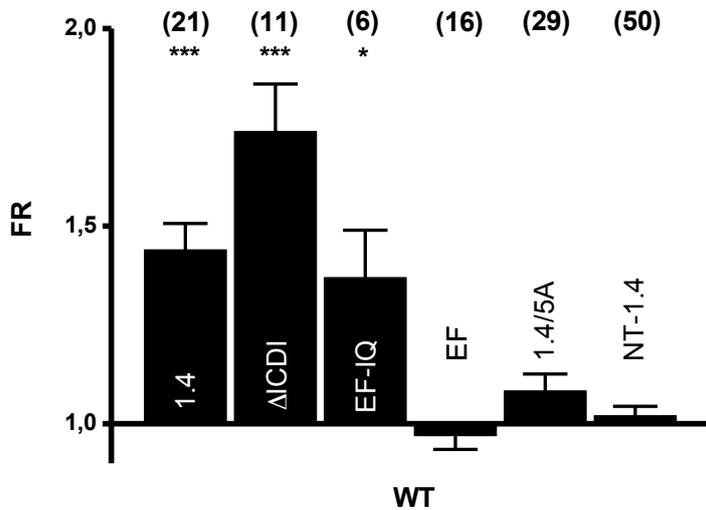


Abb. 3-2. WT CaBP4 interagiert mit dem C-Terminus von Cav1.4. FRET Experimente von unterschiedlichen Abschnitten des C-Terminus von Cav1.4 mit WT CaBP4. Die Konstrukte sind benannt nach Abb. 3-1.

Zu Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass der proximale und distale Teil des C-Terminus von Cav1.4 – die IQ Domäne und die ICDI – miteinander interagieren. Dabei erschwert die ICDI die Aktivierung von Cav1.4. Möglicherweise kann CaBP4 diesen Effekt auf Cav1.4 aufheben. Im FRET-Experiment würde man in diesem Fall ein verändertes FR erwarten. Dazu wurden der fluoreszenzmarkierte C-Terminus ohne ICDI (Δ ICDI) und die ICDI koexprimiert. Das FR wurde ermittelt und verglichen mit dem FR welches man erhält wenn zusätzlich zum FRET-Pärchen (Δ ICDI und ICDI) CaBP4 ohne Fluoreszenzmarkierung stabil exprimiert wird. Bei einem Einfluss auf die Interaktion zwischen den Domänen erwartet man dann einen Einfluss auf das FR. Tatsächlich verringert sich das FR in Gegenwart von CaBP4 (Abb. 3-3, links).

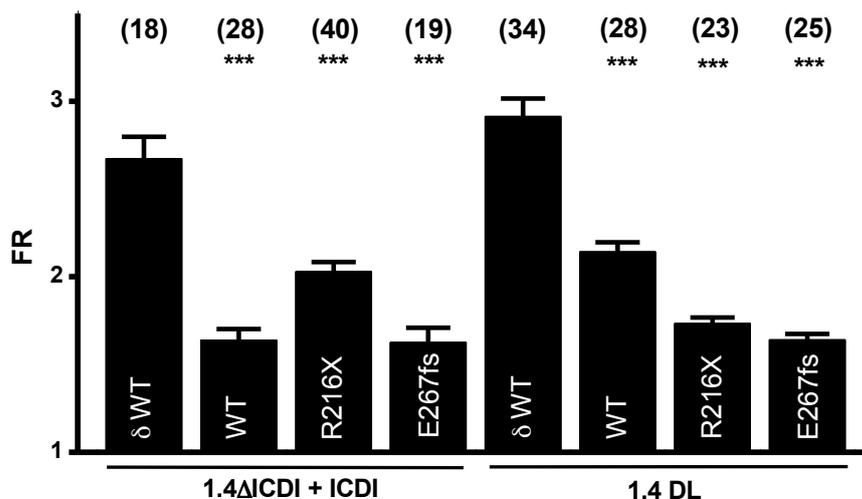


Abb. 3-3: Sowohl WT CaBP4 als auch Varianten von CaBP4 verändern die Bindung der ICDI Cav1.4ΔICDI. Linke Hälfte YFP-1.4ΔICDI mit ICDI-CFP (von links ko-transfiziert: ohne, mit WT und Varianten von CaBP4), rechte Hälfte (von links ko-transfiziert: ohne, mit WT und Varianten von CaBP4).

Allerdings muss ein verringertes FR nicht immer bedeuten, dass sich der Abstand der Proteine verändert hat. Eine andere Ursache wäre ein verändertes Expressionsniveau mit viel mehr Akzeptor- als Donormolekülen. Wenn sich deutlich mehr Akzeptor- als Donormoleküle im Sichtfeld des Mikroskops befinden bedeutet das viele ungebundene Akzeptormoleküle, die am Transfer nicht teilnehmen können. Das führt im 3^3 -FRET zu einem verringertem FR. Um diesen Fall zu untersuchen, besteht die Möglichkeit, FRET an einem einzelnen Protein zu messen (1.4DL): In der vorliegenden Arbeit wurde der gesamte C-Terminus an seinen Enden mit den fluoreszierenden Proteinen markiert. Es wurde der N-Terminus mit YFP und der C-Terminus mit CFP verknüpft und anschließend analog dem Δ ICDI / ICDI - Versuch das FR in Gegenwart und Abwesenheit von nicht markiertem CaBP4 ermittelt. Auch in diesem Fall verändert sich das FR hin zu kleineren Werten (Abb. 3-3, rechts). Also stimmt das Verhältnis der Donor- und Akzeptorfluorophore auch beim intermolekularen FRET. Allerdings besteht zum zweiten die Möglichkeit, dass sich nicht der Abstand, sondern nur der Winkel der Fluorophore im Raum zueinander verändert hat. Beide Erklärungen für ein verringertes FRET RATIO – der verringerte Abstand und der veränderte Winkel – zeigen deutlich einen Einfluss von CaBP4 auf die Interaktion der ICDI mit dem proximalen C-Terminus.

Anhand von 1.4DL im Vergleich zu Δ ICDI koexprimiert mit ICDI wurde exemplarisch geprüft ob die in dieser Arbeit benutzten DNA Mengen passend für 3^3 -FRET gewählt waren (Abb. 3-4). Dabei zeigte sich zum einen dass keine einseitige Lyse der Fluorophore oder ein Abbruch der Proteinbiosynthese standfand: Ein höheres Level an CFP-Fluoreszenz

bedeutete auch immer einen Anstieg der YFP-Fluoreszenz (Abb. 3-4, links), was gleichbedeutend ist mit einem vollständig exprimiertem 1.4DL Konstrukt.

Zum anderen waren die DNA-Mengen von ICDI und Δ ICDI in jedem Fall so gewählt, dass dasselbe Donor/Akzeptor-Verhältnis abgedeckt wurde. Das erhaltene Verhältnis war auch in jedem Fall wie bei 3^3 -FRET gewünscht zu Gunsten des Donors verschoben. Damit wurde sichergestellt, dass keine falschen Negativeergebnisse mit einem verringerten FRET RATIO zu Stande kamen und die Ergebnisse anhand des Beispiels aus Abb. 3-3 verifiziert.

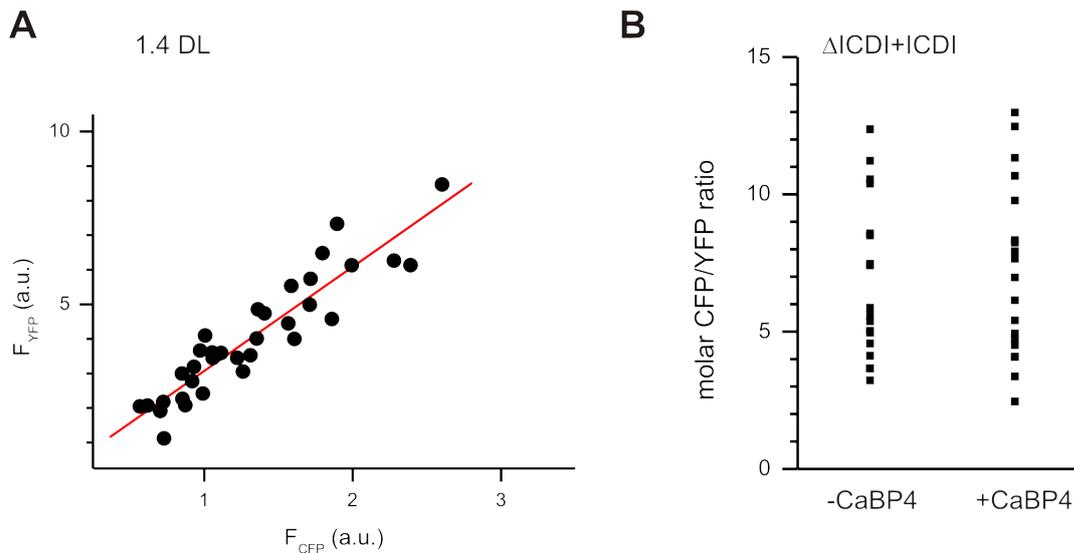


Abb. 3-4: Darstellung des molaren Verhältnisses der Fluorophore. Bei einem intramolekularen FRET Konstrukt ist die Akzeptoremission direkt proportional zur Donoremission (links). Exemplarisch dargestellt Δ ICDI und ICDI koexprimiert in Abwesenheit und Gegenwart von CaBP4. Deutlich erkennbar in beiden Fällen wurde das Selbe Donor / Akzeptor Verhältnis abgedeckt (rechts).

Als nächstes wurden zwei Mutationen von CaBP4, die mit einer autosomal rezessiven Form von einer humanen nicht degenerativen erblichen Retinaerkrankung (*human congenital retinal disease* (CSNB2)) zusammenhängen, untersucht. Die erste der beiden Mutationen (CaBP4-R216X) führt zu einem verkürzten CaBP4 Protein, welchem der *c-lobe* mit den beiden funktionellen EF-Händen 3 und 4 fehlt (Zitat). In der zweiten Mutation (CaBP4-E267fs) ist der letzte Aminosäurerest der EF-Hand 4 (E267) mutiert. Damit wird die saure und negativ geladene Aminosäure Aspartat durch das unpolare Valin ersetzt. Zusätzlich verschiebt sich dabei der Leserahmen der mRNA (*frameshift, fs*) und führt zu einem verlängerten Protein. Durch Westernblot-Experimente wurde die Expression von CFP-markierten CaBP4 Varianten in HEK-Zellen bestätigt. Das FRET-Signal von beiden Mutationen des CaBP4 zusammen mit dem C-Terminus von Cav1.4 war sogar höher als das des *wildtyp* CaBP4 (Abb. 3-5). Also ist es wahrscheinlich, dass die mutierten Proteine weiterhin an den Kanal binden. Beide pathologische Varianten verringerten ebenso wie der WT CaBP4 die Bindung der ICDI-Domäne an den C-Terminus ohne ICDI (Abb. 3-3).

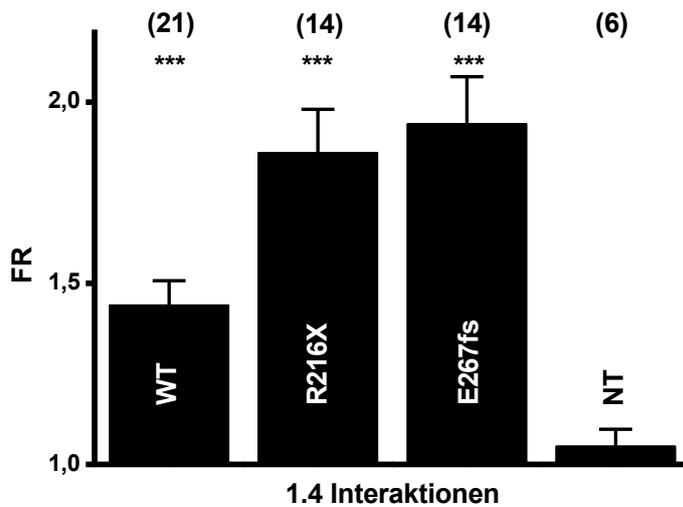


Abb. 3-5: Pathogene CaBP4 Varianten zeigen FRET-Signal zusammen mit dem C-Terminus von Cav1.4. YFP-CT1.4 zusammen mit CFP-CaBP4, -R216X, -E267fs und -N-Terminus von CaBP4.

3.2 Untersuchungen zu Interaktionen des CNG-Kanals

Vor Beginn dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Professor Dr. Mann vom Max-Planck-Institut für Biochemie ein SILAC basierter massenspektroskopischer Proteomics-Ansatz (Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture) durchgeführt, um potentielle Interaktionspartner der Stäbchen CNGB1a Untereinheit zu finden. Dabei wurden das bereits als Interaktionspartner bekannte Protein Peripherin2 (Prph2) und Rhodopsin identifiziert. Diese in der Massenspektrometrie gefundene Wechselwirkung sollte mit Hilfe der 3³-FRET Methode bestätigt werden. Hierfür wurden verschiedene FRET-Konstrukte – unter anderem zur Eingrenzung der Interaktionsdomäne verschiedene verkürzte Proteinvarianten von Peripherin2 – (Abb. 3-6) kloniert. Für die FRET-Analyse wurden die fluoreszierenden Fusionsproteine in HEK - Zellen und zum Teil in murinen Außensegmenten exprimiert

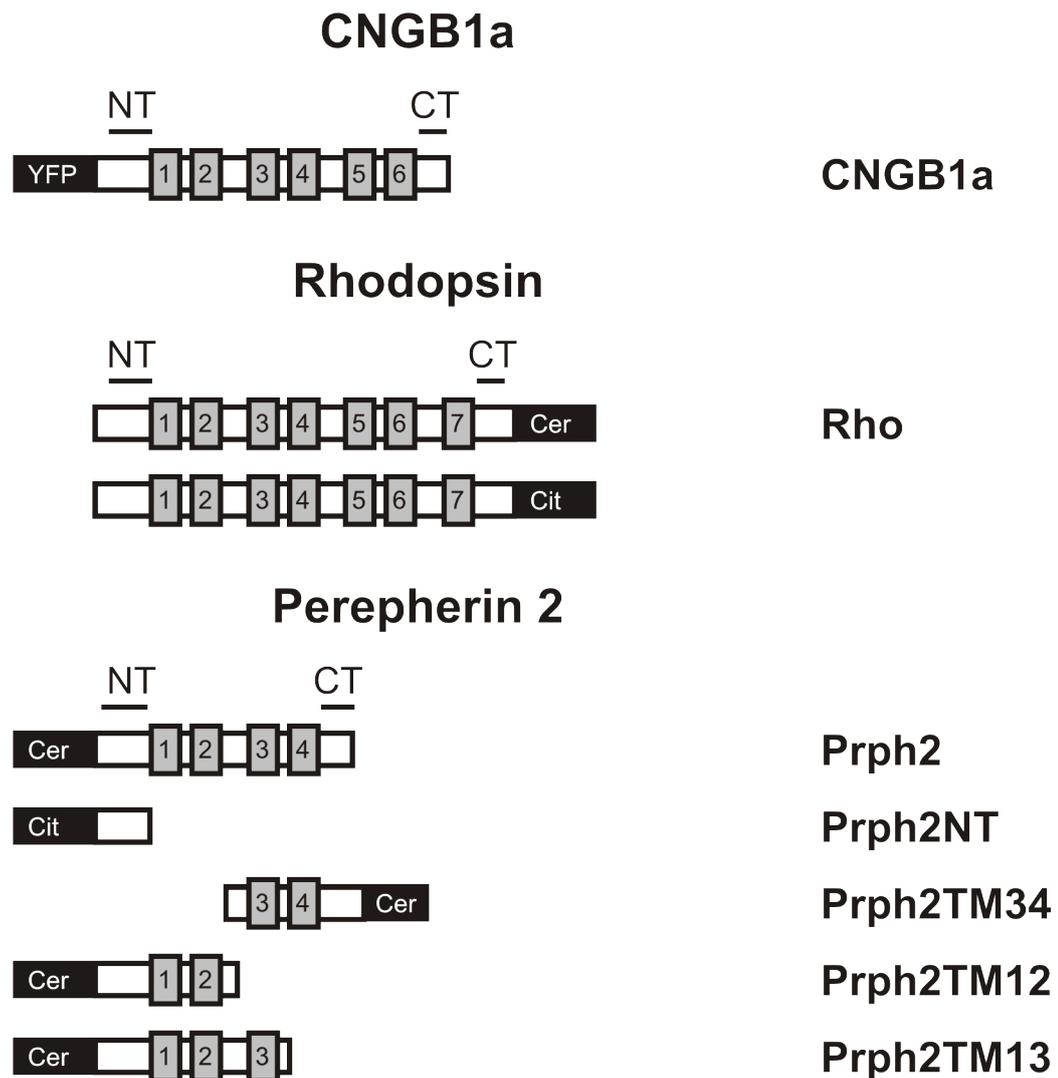


Abb. 3-6: Konstrukte für FRET Untersuchungen von CNGB1a, Rhodopsin und Peripherin2. Varianten von GNGB1a (oben), Rhodopsin (mitte) und Peripherin 2 (unten) wurden mit GFP-Varianten markiert. Die Zahlen stehen für die Transmembrandomänen von Peripherin 2. Der N- beziehungsweise C-Terminus wird durch NT und CT gekennzeichnet.

3.2.1 Untersuchungen zu Rhodopsin, Peripherin 2 und GNGB1a in HEK-Zellen

Um die Protein-Protein-Wechselwirkungen der CNGB1a-Untereinheit aus den Stäbchen grundsätzlich zu charakterisieren, wurden zuerst Experimente in HEK-Zellen durchgeführt. Dabei diente eine bekannte Homomerisierung des Rhodopsins als Positivkontrolle (Fotiadis, Liang et al. 2003, Suda, Filipek et al. 2004, Knepp, Periole et al. 2012). Diese zeigte in HEK - Zellversuchen ein deutliches FRET-Signal von 3,4. (Abb. 3-7). Da eine direkte Wechselwirkung zwischen Rhodopsin und Peripherin2 bisher nicht bekannt war, wurde diese potentielle Interaktion in HEK-Zellversuchen untersucht. Fluoreszenz markiertes Peripherin2

zeigte zusammen mit Rhodopsin sowie auch mit CNGB1a ein FRET Ratio deutlich größer als eins, was auf eine Interaktion hindeutet.

Weiter stellte sich die Frage, wie Peripherin2 mit Rhodopsin und der B1a Untereinheit des CNG-Kanals wechselwirkt. Da eine direkte Interaktion von Rhodopsin und dem Stäbchen CNG-Kanal überraschend wäre wurde zuerst Rhodopsin zusammen mit Peripherin2 untersucht. Hierbei zeigte sich ein deutliches FRET-Signal ebenso wie bei der bekannten Interaktion der CNGB1a - Untereinheit zusammen mit Peripherin2. Das Signal reduzierte sich deutlich sobald man ausschließlich Rhodopsin zusammen mit CNGB1a exprimierte (Abb. 3-7).

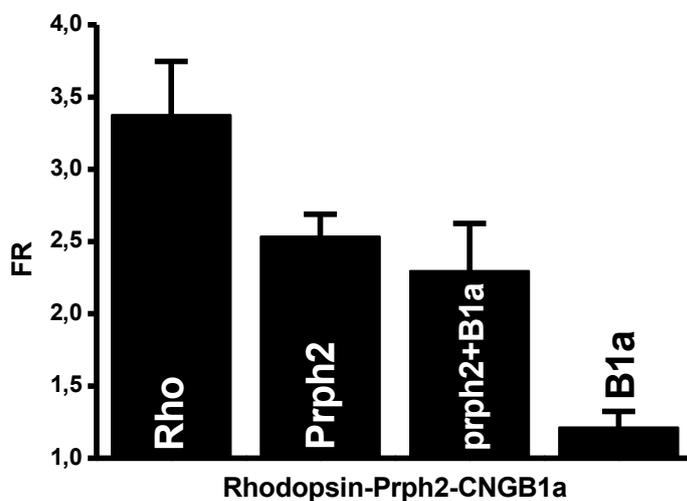


Abb. 3-7: Rhodopsin, Peripherin 2 und CNGB1a Interaktionen in HEK - Zellen. Rhodopsin bildet Multimere und zeigt FRET zusammen mit Peripherin 2 (von links 1. und 2. Spalte) ebenso wie Peripherin2 zusammen mit CNGB1a. Rhodopsin zusammen mit CNGB1a dient als Negativkontrolle.

Das FR von Peripherin2 zusammen mit Rhodopsin deutet auf eine direkte Interaktion beider Proteine hin.

Diese zuvor unbekannte direkte Interaktion von Peripherin 2 mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptor Rhodopsin wurde durch verschiedene, verkürzte Proteinvarianten von Peripherin2 weiter charakterisiert um die für die Wechselwirkung nötige Domäne zu identifizieren. Dazu wurden unterschiedliche Varianten von Peripherin2 kloniert (Abb. 3-6). Diese wurden nacheinander mit Rhodopsin koexprimiert. Dabei zeigte sich das größte FRET Ratio bei der Kombination von Rhodopsin mit den letzten beiden Transmembran Domänen von Peripherin2 (Peripherin 2TM34). Der lösliche N-Terminus von Peripherin 2 ergab ein FRET Ratio nahe 1, ähnlich wie die membranassoziierten verkürzten Peripherin2 Varianten. Weder die ersten beiden transmembran Einheiten (Peripherin 2TM12) noch Peripherin2 ohne die

vierte Transmembrandomäne (Peripherin 2TM13) zeigen FRET zusammen mit Rhodopsin. Also zeigte nur das vollständige Peripherin2 sowie die letzten zwei Transmembransegmente des Proteins ein FRET - Signal. Da Peripherin 2TM13 kein FRET - Signal mit Rhodopsin zeigte ist die vierte Membranhelix von Peripherin2 notwendig für ein FRET - Signal in Kombination mit Rhodopsin. Das deutet auf eine Bindungsdomäne im Bereich des vierten Transmembransegments von Peripherin 2 hin (Abb. 3-8).

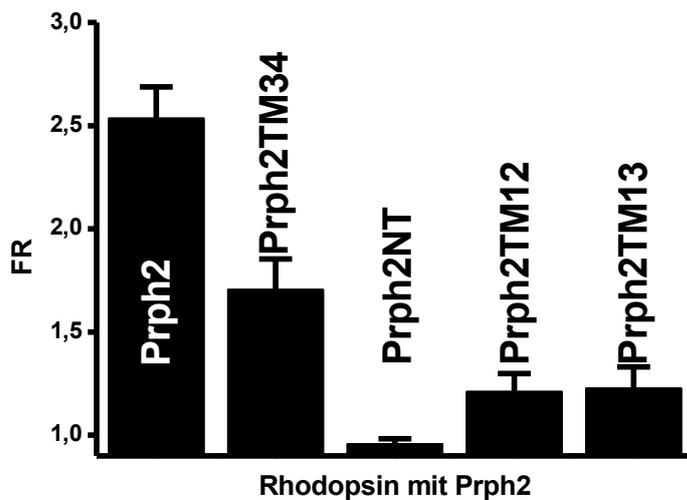


Abb. 3 -8: Untersuchungen zur Interaktionsdomäne von Peripherin 2 und Rhodopsin. Alle Studien wurden zusammen mit Rhodopsin-cit durchgeführt. Von links nach rechts unterschiedliche Segmente von Peripherin2. Ganzes Peripherin2-cer, transmembran Domäne 3+4 cer (Peripherin 2TM34), der N-Terminus von Peripherin2-cer (Peripherin 2NT) und Peripherin 2 ohne C-Terminus und transmembran Domäne 4 (Peripherin 2TM13).

3.2.2 Untersuchungen zu Rhodopsin in Stäbchenaußensegmenten

Um die Resultate der FRET-Versuche in HEK-Zellen zu überprüfen und tatsächlich zeigen zu können, dass die Interaktion in den Außensegmenten eine Rolle spielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit grundsätzlich die Möglichkeit etabliert, FRET-Untersuchungen an Stäbchenaußensegmenten durchzuführen. Die zu untersuchenden Konstrukte wurden durch subretinale Injektion von gentechnisch veränderten Adeno assoziierten Viren (AAV) in murinen Außensegmenten exprimiert. Anschließend wurden die Retinae präpariert und die Außensegmente isoliert. Die Proteine wurden aufgrund der Vorergebnisse aus HEK-Zellen ausgewählt. Zum einen das robuste FRET-Signal der Rhodopsin-Homomerisierung und zum

anderen das fehlende FRET-Signal der ersten beiden Transmembransegmente von Peripherin 2 in Kombination mit Rhodopsin (Abb. 3-9).

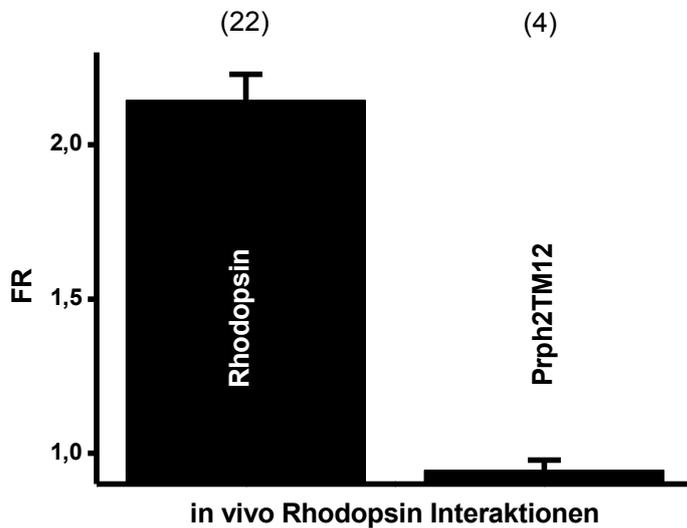


Abb. 3-9 Rhodopsin bildet Homomultimere in Stäbchenaußensegmenten: Rhodopsin-cit zusammen mit Rhodopsin-cer. Als Kontrolle dient Peripherin 2TM12 zusammen mit Rhodopsin.

Dabei wurde deutlich, dass die zwar unter dem natürlichen Rhodopsin-Promoter aber viral überexprimierten Konstrukte in den Außensegmenten vorzufinden waren. Diese konnten gezielt unter dem Mikroskop ausgewählt und anschließend deren Fluoreszenzsignal mit Hilfe der Photodiode ausgewertet werden. Dabei zeigte sich, dass die Homomerisierung von Rhodopsin ein ähnlich starkes FRET - Signal *in vivo* wie zuvor auch in HEK - Zellen verursacht.

Um zu beweisen, dass dieses Ergebnis nicht durch die artifizielle virale Expression zu Stande kam wurden die ersten beiden Domänen von Peripherin zusammen mit Rhodopsin exprimiert. Im Gegensatz zur Homomerisierung des Rhodopsin ergab das FR dieser Kombination circa 1. Daher ist diese Kombination als Negativkontrolle für Stäbchen *in vivo* FRET geeignet.

4. DISKUSSION

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, die Interaktion von Cav1.4 und CaBP4 zu untersuchen. Dabei wurde die für die Wechselwirkung nötige Domäne im proximalen C-Terminus des Kanals identifiziert. Die erhaltenen FRET-Daten sprechen deutlich für folgendes Modell: CaBP4 verändert die Bindung der ICDI-Domäne an den C-Terminus von Cav1.4. Dabei bindet CaBP4 analog zu CaM eng an die IQ-Domäne von Cav1.4. Die Wechselwirkung zwischen Cav1.4 und CaBP4 verschwindet, sobald die IQ-Domäne des Kanals entweder mutiert ist (1.4-5A) oder entfernt wurde (1.4-EF). Zusätzlich zu dieser Bindestelle wurden weder im C- noch im N-Terminus des Kanals Hinweise auf weitere Interaktionsdomänen gefunden. Die durchgeführte FRET-Untersuchung in HEK-Zellen zeigte kein FRET-Signal zwischen CaBP4 und 1.4-5A bzw. NT1.4. Dies verdeutlicht, dass entweder keine andere Interaktionsstelle im C- respektive N-Terminus des L-Typ Calcium-Kanals vorhanden ist oder keine passende Konformation vorliegt um ein $FR > 1$ zu erhalten. Folglich teilt sich CaBP4 mit CaM dieselbe Interaktionsdomäne im proximalen C-Terminus des Calciumkanals.

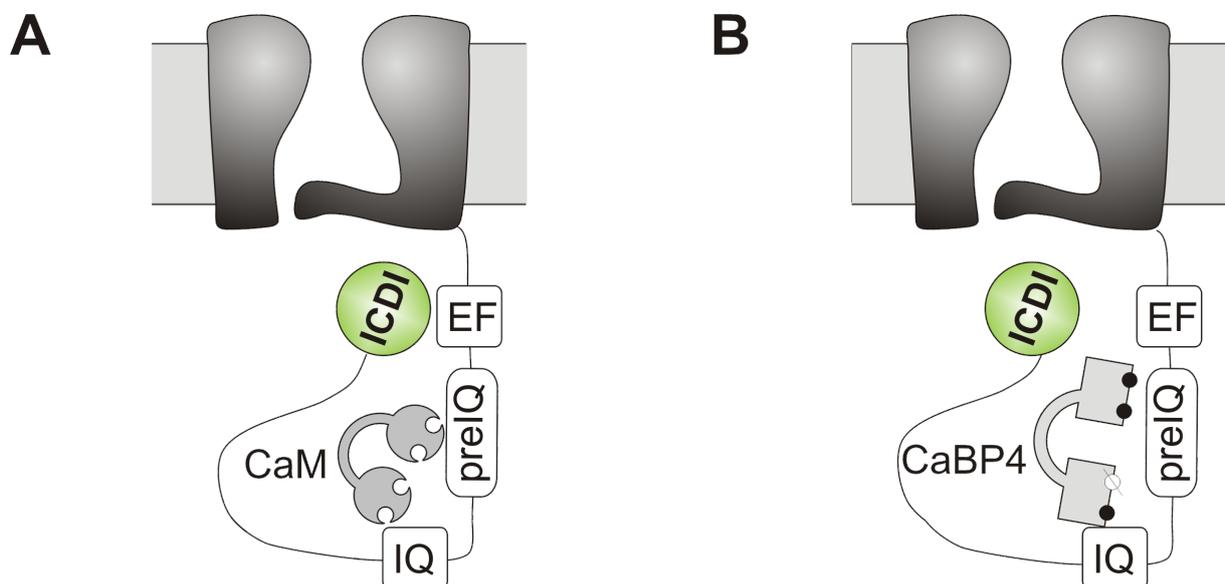


Abb. 4-1: Cav1.4 in Ab- und Anwesenheit von CaBP4. Ohne CaBP4 moduliert CaM Cav1.4 und verlängert die spannungsabhängige Inaktivierung des Kanals (A, linkes Bild). CaBP4 moduliert die Position der ICDI im distalen C-Terminus, so dass die Verfügbarkeit des Kanals während physiologischer Membranpotentiale erhöht ist.

Funktionelle Studien in anderen Arbeiten haben gezeigt, dass sich die Aktivierungskurve von Cav1.4 in Gegenwart von CaBP4 nach links, in Richtung physiologischer Membranpotentiale verschiebt. Das bedeutet, dass bereits beim Ruhemembranpotential von Stäbchen-Photorezeptoren ein signifikanter Anteil der Cav1.4-Kanäle geöffnet ist (Corey, Dubinsky et

al. 1984, Witkovsky, Schmitz et al. 1997, Schneeweis and Schnapf 2000, Moriondo, Pelucchi et al. 2001, Thoreson, Rabl et al. 2004). Eine Kanalmutation, der die ICDI-Domäne fehlt (Cav1.4 Δ ICDI), zeigt bereits in Abwesenheit von CaBP4 dieselbe verschobene Aktivierungskurve. Auf diesen Kanal hat CaBP4 keinen weiteren Einfluss mehr. Es braucht also die ICDI um Cav1.4 zu regulieren. Zusätzlich hemmt CaBP4 die Inaktivierung von Cav1.4 und erhöht dadurch die Verfügbarkeit des Kanals, also den Anteil der tatsächlich unter physiologischen Membranpotentialen offenen Kanäle (Shaltiel, Pappas et al. 2012).

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit antagonisiert CaBP4 auch funktionell den Effekt, den die ICDI auf den Kanal hat. Obwohl sich CaM und CaBP4 dieselbe Interaktionsdomäne im C-Terminus des Kanals teilen, verändert die Bindung von CaBP4 die Konformation von Cav1.4 anders als die Interaktion von CaM. Wie lassen sich diese unterschiedlichen Effekte von CaM und CaBP4 erklären? Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass CaBP4 die Bindung der ICDI-Domäne an den proximalen C-Terminus abschwächt. Eine mögliche Erklärung wäre, dass CaBP4 die ICDI nur teilweise vom Kanal verdrängt. Zu dieser Theorie passt, dass das FRET-Signal zwischen ICDI-Domäne und proximalem C-Terminus in Gegenwart von CaBP4 nur abgeschwächt wird und nicht völlig verschwindet (Abb. 3-3). Im Rahmen dieser Hypothese war es interessant pathologische relevante Mutationen des CaBP4 ebenso wie den *Wildtyp* von CaBP4 zu untersuchen.

Die beiden Mutationen des CaBP4 – CaBP4 216X und CaBP4 267fs (Abb. 3-1) – wurden bereits zuvor in unterschiedlichen humangenetischen Arbeiten mit erblich bedingter Nachtblindheit in Verbindung gebracht (Zeit, Kloeckener-Gruissem et al. 2006, Littink, van Genderen et al. 2009). Obwohl sich beide Proteine strukturell unterscheiden, führen beide Mutationen von CaBP4 zu den gleichen Symptomen bei den betroffenen Patienten. Diese Symptome decken sich mit dem Krankheitsbild der CSNB2, der inkompletten kongenitalen stationären Nachtblindheit (Channelopathie des Cav1.4).

Damit stellte sich die Frage ob die mutierten Proteine noch an den Kanal binden. Da die einfachste Erklärung für die Entstehung der Nachtblindheit bei diesen Patienten wäre, dass die Interaktion nicht mehr stattfindet. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen dagegen, dass die Bindung der pathologisch mutierten Varianten von CaBP4 an den Calciumkanal weiterhin stattfindet. Es ist sogar auffällig, dass das ermittelte FR beider Mutationen mit dem C-Terminus von Cav1.4 höher als das des *Wildtyp*-Proteins ist. Sogar die stark verkürzte Variante CaBP4 216X gibt zusammen mit dem C-Terminus von Cav1.4 ein deutliches FRET-Signal während der reine N-lobe von CaBP4 kein FR größer 1 hervorruft. Das bedeutet, dass der N-Terminus und der N-lobe bereits für die Bindung an den Kanal ausreichend sind.

Funktionelle Studien in HEK-Zellen haben gezeigt, dass weder 216X noch 267fs in der Lage sind, die Aktivierungskurve des Cav1.4 analog dem *Wildtyp* CaBP4 nach links zu verschieben. Sie modifizieren allerdings – ähnlich dem *Wildtyp*-Protein – die Bindung der ICDI an den proximalen Teil des C-Terminus von Cav1.4. Die gefundenen Ergebnisse, dass beide CaBP4-Mutanten mit dem C-Terminus interagieren, aber nicht die funktionellen Effekte des *Wildtyp*-Proteins haben, lassen die Vermutung zu, dass c- und n-lobe vorhanden sowie strukturell intakt sein müssen, um gemeinsam den Kanal zu modulieren. Dies ist ein notwendiger Bestandteil der physiologischen Neurotransmission an den Bändersynapsen.

Um neue Kandidaten für eine bisher unbekannte Wechselwirkung mit der CNGB1a-Unterheit zu finden, wurde vor Beginn dieser Arbeit eine SILAC-basierte Massenspektrometrie durchgeführt. Bei diesem Screening konnten mehrere Treffer identifiziert werden, die im Anschluss mit Hilfe von FRET detaillierter untersucht wurden. Dadurch konnten die unterschiedlichen Stärken beider Methoden gezielt genutzt werden. Massenspektrometrische Untersuchungen sind ähnlich wie Hefe-zwei-Hybrid Systeme in der Lage große Mengen an Daten in kurzer Zeit bezüglich vieler Interaktionspartner zu liefern. Auf Grund der Methodensensitivität kann es dabei zu falsch positiven Testergebnissen kommen. Da der Energietransfer bei FRET in der 6. Potenz vom Abstand der Fluorophore abhängt, erzeugt die hier verwendete 3^3 -FRET Methode eher falsch negative Resultate. Es handelt es sich um eine Methode mit hoher Präzision, die keine falsch positiven Resultate erwarten lässt. Damit ergänzen sich beide Methoden gut. Eine weitere wichtige Eigenschaft von 3^3 -FRET ist seine Unabhängigkeit von der Zellgröße: Da das FR ratiometrisch bestimmt wird, nivelliert sich die Anzahl der fluoreszierenden Moleküle im Sichtfeld, die mit dem Zellvolumen bzw. der Zellgröße direkt korreliert. Damit ist es ein mächtiges Werkzeug zur Beurteilung von Proteininteraktionen in lebenden Zellen, denn die betrachteten Interaktionen ereignen sich nicht nur in physiologischer Umgebung, sondern auch im richtigen Zellkompartiment. Damit bietet die hier verwendete Methode Vorteile gegenüber anderen Methoden und ermöglicht die Interpretationen der Daten im physiologischen und pathophysiologischen Modell.

Bei Rhodopsin und Peripherin2, den beiden gefundenen Interaktionskandidaten aus dem Screening, handelt es sich um Proteine, die in der Zellmembran der Stäbchen (Rhodopsin) und in deren Discs (Rhodopsin und Peripherin2) auftreten. Der CNG-Kanal ist in der Stäbchenmembran lokalisiert (Cook, Molday et al. 1989). In HEK-Zellen konnte mit Hilfe der FRET-Technik gezeigt werden, dass Rhodopsin nicht direkt an den CNG-Kanal bindet. Es benötigt Peripherin2 als molekularen Adapter, um einen Komplex mit dem Kanal zu formen. Die hier vorliegende Arbeit zeigt, dass Peripherin2 in HEK-Zellen einen stabilen Komplex

sowohl mit Rhodopsin als auch CNGB1a bildet. Unter physiologischen Bedingungen werden die beiden Proteine in Stäbchenzellen exprimiert. Da es sich bei Stäbchenzellen um hochspezialisierte, polare Zellen handelt, war es Ziel dieser Arbeit einen Weg zu finden, FRET-bezogene Fragestellungen auch in nativem Gewebe untersuchen zu können. Durch virale Transduktion wurden Fusionsproteine bestehend aus Fluorophor und Protein in murinen Stäbchen exprimiert. In Übereinstimmung mit biochemischen Daten aus anderen Arbeiten zeigen die FRET-Experimente, dass Rhodopsin nicht nur in HEK-Zellen, sondern auch in isolierten Stäbchenaußensegmenten Dimere oder Oligomere bildet. Somit ist 3^3 FRET auch in nativen Retina-Zellen quantifizierbar, bestätigt die initialen Ergebnisse HEK-Zellen und ermöglicht dadurch in Zukunft weiterführende Studien in Stäbchenzellen.

Die Daten dieser Arbeit sprechen also für ein Modell, in dem Peripherin2 eine Art „Brücke“ zwischen der CNGB1a-Kanaluntereinheit und Rhodopsin darstellt (Abb. 4-2). Die für die Rhodopsin/Peripherin2-Wechselwirkung nötigen Domänen in Peripherin2 wurden identifiziert. Da beide Proteine hauptsächlich in den Disk-Membranen von Stäbchen-Photorezeptoren lokalisiert sind, war es naheliegend anzunehmen, dass die Interaktion über die Transmembrandomänen vermittelt wird. In der Koexpression mit Rhodopsin zeigt Peripherin 2TM34 im Gegensatz zu Peripherin 2TM12 ein FRET-Signal. Das heißt, die notwendige Bindungsdomäne liegt in den Transmembraneinheiten drei und vier von Peripherin2. In weiteren Versuchen wurde die Domäne auf die vierte Transmembraneinheit eingegrenzt, da auch die Domänen eins bis drei von Peripherin2 (Peripherin 2TM13) zusammen mit Rhodopsin kein FRET Ratio deutlich größer als 1 zeigten. Also reichte es aus, die vierte Transmembrandomäne von Peripherin2 zu entfernen um die Bindung an Rhodopsin zu verhindern.

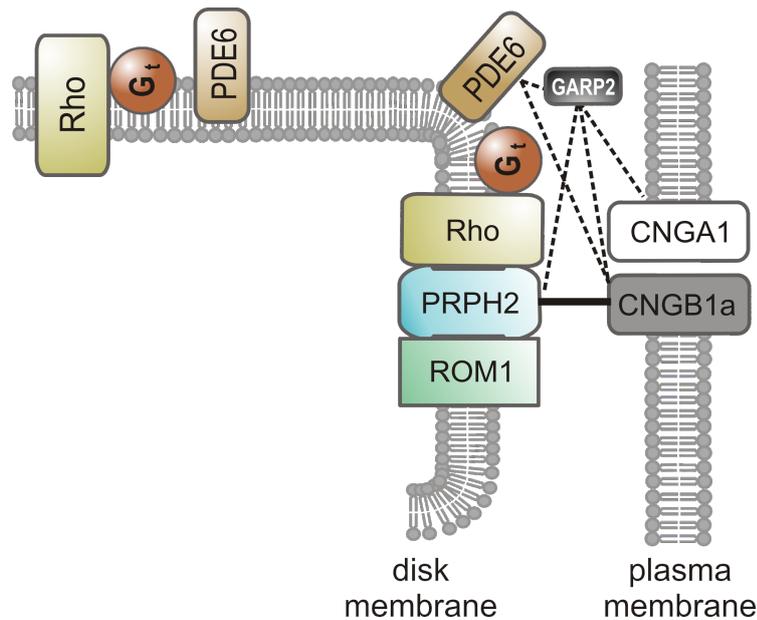


Abb. 4-2: Peripherin2 verbindet Rhodopsin mit dem CNG-Kanal und ROM1. Vereinfachte Abbildung der Protein-Protein-Wechselwirkungen in den Disk-Rim-Regionen von Stäbchenaußensegmenten. Peripherin2 bindet gleichzeitig an ROM1, an CNGB1a und an Rhodopsin. Das lösliche GARP2 interagiert mehrfach mit CNGB1a, mit CNGA1, mit der Phosphodiesterase 6 und Peripherin2 (gestrichelte Linie). Die Phosphodiesterase 6 (PDE6) dient dem Abbau des gebildeten cGMP.

Andere Arbeiten haben sogar gezeigt, dass die Mutation einer einzigen Aminosäure in der vierten Transmembrandomäne von Peripherin2 die Bindung an Rhodopsin verhindert (Sohocki, Daiger et al. 2001). Das bedeutet, die vierte Transmembrandomäne spielt eine Schlüsselrolle für die Interaktion mit Rhodopsin. Arbeiten mit Hilfe der Immunelektronenmikroskopie haben gezeigt, dass Rhodopsin in Stäbchen-Außensegmenten in unmittelbarer Umgebung von CNGB1a lokalisiert ist (Becirovic, Nguyen et al. 2014). Das unterstützt das hier vorgestellte Modell, in dem Peripherin2 als Verbindungsstück zwischen dem Lichtsensor Rhodopsin und dem molekularen Schalter, dem Stäbchen CNG-Kanal, fungiert. Möglicherweise wird durch Peripherin2 ein eigenes Kompartiment bestehend aus den Disk- Randgebieten und der benachbarten Zellmembran gebildet. Für diese Zellorganisation sind unterschiedliche Szenarien vorstellbar: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass der untersuchte Komplex eine funktionelle Rolle in der Phototransduktion einnimmt. Möglicherweise ermöglicht er durch die Kopplung von Rhodopsin an den Stäbchen CNG-Kanal eine verbesserte Sensitivität der Lichtsignalkaskade. Zum anderen kann ein solcher Komplex ausschlaggebend sein für die stabile Morphologie der Stäbchenaußensegmente. Dafür spricht, dass bekannte Mutationen von Rhodopsin und Peripherin2 zu fehlerhafter Disk-Morphogenese und -Stabilität führen (Sanyal and Jansen 1981, Travis, Sutcliffe et al. 1991, Humphries, Rancourt et al. 1997, Lem, Krasnoperova et al. 1999). Das wiederum hat verkürzte Außensegmente zur Folge. Solche strukturellen Fehlbildungen können auch bei ROM1-Mutationen beobachtet werden (Clarke, Goldberg et al. 2000). ROM1 interagiert mit Peripherin2 und ist ebenso wie Peripherin2 und CNGB1a ein

Photorezeptor-spezifisches Protein. Es ist für eine physiologische Stäbchenmorphologie notwendig. *CNGB1-Knockout*-Mäuse, denen dadurch die GARP-Bindedomäne für Peripherin2 an den Stäbchen CNG-Kanal fehlt, zeigen ebenfalls Defekte der Zellstruktur in den Außensegmenten (Zhang, Molday et al. 2009).

Mutationen in den zugehörigen Genen von Rhodopsin, Peripherin2 und CNGB1 betreffen nicht nur die Stäbchenstruktur, sondern sind zudem mit *Retinitis pigmentosa* (RP) assoziiert. Auch *Knockout*-Mäuse, in denen eines der drei Proteine deaktiviert wurde zeigen einen Phänotyp, der den Symptomen von RP sehr ähnlich ist. Das bedeutet, dass bereits der Funktionsverlust eines dieser drei Proteine zu einem fortschreitenden Sehverlust bis hin zum völligen Erblinden führt. In der Konsequenz heißt das: fällt nur ein essentieller Baustein aus, ist das gesamte Netzwerk der drei Interaktionspartner so geschädigt, dass es nicht mehr funktioniert und zu RP führt. Demnach sind alle drei Proteine entscheidende Faktoren für eine physiologisch funktionsfähige Retina. Fasst man die Ergebnisse zusammen, so konnte gezeigt werden, dass ein intaktes Rhodopsin/Peripherin2/ROM1/CNG-Kanal-Netzwerk essentiell ist, um die Form und Stabilität der Stäbchen-Außensegmente aufrecht zu halten sowie deren physiologische Funktion in der Retina zu gewährleisten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der hier vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten aufgezeigt, wie die Methode FRET zur Untersuchung von retinalen Ionenkanälen herangezogen werden kann. Zur Auswertung der erhaltenen Daten wurde die sogenannte *three cube* FRET Methode verwendet. Dafür wurden einerseits trunkierte Peptide, wie im Falle des Cav1.4 benutzt sowie andererseits vollständige Kanaluntereinheiten wie CNGB1a. Zusätzlich zu den HEK-Zellversuchen wurde mit Hilfe von viraler Transduktion FRET in Außensegmenten von Stäbchenphotorezeptoren erfolgreich untersucht.

Im Rahmen der Untersuchungen des L-Typ Calciumkanals Cav1.4 wurde das notwendige Interaktionsmotiv für den bekannten Modulator CaBP4 identifiziert und humanpathogene Mutationen untersucht. Durch stetiges Verkürzen des C-Terminus des Kationenkanals konnte die Interaktionsdomäne eingeschränkt werden. Dabei stellte sich heraus, dass es sich wie beim CaM um das IQ-Motiv im proximalen Bereich des C-Terminus handelt. Sobald diese in ihrer Aminosäuresequenz mutiert (5A-Mutante) oder nicht vorhanden war, zeigte das FRET-Pärchen keine Bindung mehr. Interessanterweise interagieren auch bekannte pathologische Mutationen von CaBP4 weiterhin mit dem Cav1.4 und verdrängen im FRET-Experiment die ICDI ähnlich wie das funktionelle *wildtyp* Protein. Die Ergebnisse dieser Arbeit stützen funktionelle Daten aus anderen Arbeiten und leisten einen Beitrag zum weiteren Verständnis über erbliche Erkrankungen des Sehens, die ihren Ausgangspunkt beim Cav1.4 haben.

CNG-Kanäle stehen am Anfang der komplexen Signalkaskade des Sehvorgangs und sind ein möglicher Ausgangspunkt für schwere degenerative Erkrankungen der Netzhaut wie Retinitis Pigmentosa. Interaktionspartner der Kanaluntereinheiten können daher sowohl bei physiologischen als auch bei pathophysiologischen Vorgängen eine wichtige Rolle spielen. Ausgangspunkt dieser Arbeit waren dabei die bekannten Proteine Rhodopsin und Peripherin2. Sie befinden sich in räumlicher Nähe zum Stäbchen CNG-Kanal. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CNGB1a, Peripherin2 und Rhodopsin zu einem Komplex verbunden sind, wobei Peripherin2 das Bindeglied welches Rhodopsin und CNG-Kanal aneinander koppelt. Da die Peripherin2 Wechselwirkung mit Rhodopsin bisher unbekannt war wurde die Interaktionsdomäne von Peripherin2 durch trunkierte Varianten untersucht und diese auf die letzte Transmembraneinheit eingeschränkt. Schließlich wurde in dieser Arbeit die Grundlage geschaffen in FRET aus nativen Stäbchen-Photorezeptoren zu zeigen. Die zuvor in HEK-Zellen gezeigte Homomultimerisierung von Rhodopsin konnte

ebenso unter viraler Transduktion in nativen Außensegmenten der murinen Retina bestätigt werden.

Somit stützen die Daten dieser Arbeit Ergebnisse zur Funktion von retinalen Ionenkanälen. Für die Interaktion von Cav1.4 mit CaBP4 konnte ein Modell entwickelt werden, welches die Regulation des Kanals durch CaBP4, aber auch die weiterhin bestehende Wechselwirkung pathologischer Varianten erklärt. Die Daten zeigen auch eine mögliche Anwendung der 3³-FRET Methode unabhängig von direkten funktionellen Daten wie die Untersuchung zu CNGB1a/Prph2/Rho zeigt.

6. ANHANG

Sequenzen Calcium bindender Proteine

hCaBP1		0
hCaBP2		0
hCaBP3		0
hCaBP4	MTTEQARGQQGNLAIGRQKPPAGVVTPKSDAEEPPLTRK	40
hCaBP5		0
hCaBP7		0
hCaBP8		0
hCaM		0

hCaBP1	MGNCVKYPLRNLSRKMCQEEQTSYMVVQTSEEG	33
hCaBP2	MGNCAKRPWRRGPKDPLQWLGSPPRGSCPSRSS	33
hCaBP3		0
hCaBP4	RSKKERGLRGSRKRTGSSGEQTGPEAPGSSNNPPSTGEGP	80
hCaBP5		0
hCaBP7		0
hCaBP8		0
hCaM		0

hCaBP1	LAADAELPGPLLMLAQNCAVMHNLGGPACIFLRKGF AENR	73
hCaBP2	SPKEQGDPA PG.VQG..YSVLNSLVGPACIFLRPSIAATQ	70
hCaBP3	MLP...AALQSHLVVFPVAVSQQCLSS	25
hCaBP4	AGAPPASPGPASSRQSHRHRPDSLHDAAQRTYGPLLNRVF	120
hCaBP5	MQFPMGPACIFLRKGFIAEKQ	20
hCaBP7	MPFHPVTAALMYRGIYTVPNLLS...E	24
hCaBP8	MPFHHVTAGLLYKGNLNRSL SAGSDS	27
hCaM		0

EF-1

hCaBP1	QPDRSLRPEEIEELREAFREFFDKDKDGYINCRD LGN....	109
hCaBP2	L.DREL RPEEIEELQVAFQEFDRDRDGYIGCRELGA....	105
hCaBP3	R.RCRRGPWGTAWRGGVELAGHQSDG PSSLLELVGAQPPY	64
hCaBP4	GKDRELGP EELDELQA AFEFFDTDRDGYISHRELGD....	156
hCaBP5	R.ERPLGQDEIEELREAFLEFFDKDRDGFISCKDLGN....	55
hCaBP7	QRPVDIPEDELEEIREFKVFDRDGN GFISKQELGT....	60
hCaBP8	EQLANISVEELDEIREFRVLDRDGN GFISKQELGM....	63
hCaM	MADQLTEEQIAEFKEAFSLFFDKDGDGTTITKELGT....	35

EF-2

hCaBP1	.CMRTMG.....YMPTEMELIELSQQINMNLG GHVD	139
hCaBP2	.CMRTL G.....YMPTEMELIEISQQIS...GKVD	132
hCaBP3	LLQHSFATSSCLSWLLLRSRCLRAVTAGLEIRMN LGGRVD	104
hCaBP4	.CMRTL G.....YMPTEMELLEVSQH IKMRMGGRVD	186
hCaBP5	.LMRTMG.....YMPTEMELIELGQQIRMN LGGRVD	85
hCaBP7	.AMRSLG.....YMPNEVELEVI IQRIDMDGDGQVD	90
hCaBP8	.AMRSLG.....YMPSEVELAIIMQRI DMDGDGQVD	93
hCaM	.VMRSLG.....QNPTEAELQDMINEVDADGN GTID	65

	...EF-2	EF-3	
hCaBP1	FDDFVELMGPKLLAETAD.MIGVKELRDAFREH	DTNGDGE	178
hCaBP2	FEDFVELMGPKLLAETAD.MIGVRELRDAFREH	DTNGDGR	171
hCaBP3	FDDFVELMTPKLLAETAG.MIGVQEMRDAFKEH	DTNGDGE	143
hCaBP4	FEFVELIGPKLREETAH.MLGVRELRIAFREH	DRDRDGR	225
hCaBP5	FDDFVELMTPKLLAETAG.MIGVQEMRDAFKEH	DTNGDGE	124
hCaBP7	FEFVFTLLGPKLSTSGIPEKFGHTDFDTVFWKQ	DMQK...	127
hCaBP8	FDEFMTILGPKLVSSEGRDGF LGNTIDSI	FWQDMQR...	130
hCaM	FPEFLTMMARKMKDTS.....EEEIREAFRVE	DKDGNQY	100

	...EF-3	EF-4	
hCaBP1	ISTSEELREAMRKL LGHQVGH RDIEE IIRVD	D.....LNGD	213
hCaBP2	ISVGEELRAALKALLGERLSQREVDEILQVD	D.....LNGD	206
hCaBP3	ITLAEELQQAMQRL LGERLTPREISEVVREA	D.....VNGD	178
hCaBP4	ITVAELREAVPALLGEPLAGPELDEMLREV	D.....LNGD	260
hCaBP5	ITLVELQQAMQRL LGERLTPREISEVVREA	D.....VNGD	159
hCaBP7	LTVDELKRLLYDTFCEHLSMKDIENIIMTE	EESHLGTAE	167
hCaBP8	ITLEELKHILYHAFRDHLTMKDIENIINE	EESLNETSGN	170
hCaM	ISAAELRHVMTN.LGKELTDEEVDEMIREA	D.....IDGD	134

	...EF-4	
hCaBP1	GRVDFEEFVRMMSR	227
hCaBP2	GLVDFEEFVRMMSR	220
hCaBP3	GTVDFEEFVKMMSR	192
hCaBP4	GTVDFDEFVMMLSRH	275
hCaBP5	GTVDFEEFVKMMSR	173
hCaBP7	CPVDVETCSNQ.QIRQTCVRKSLICAFIAFIISVMLIAA	206
hCaBP8	CQTEFEGVHSQKQNRQTCVRKSLICAFAMAFIISVMLIAA	210
hCaM	GQVNYEEFVQMTAK	149

hCaBP1		
hCaBP2		
hCaBP3		
hCaBP4		
hCaBP5		
hCaBP7	NQVLRSGM	214
hCaBP8	NQILRSGM	218
hCaM		

Sequenz Cabp4, E267fs und R216X

CaBP4_WT	MATEHNVQLVPGSQKIPKGVVSPRSAAEGPALTRRRSKKE	40
CaBP4_E267fs	MATEHNVQLVPGSQKIPKGVVSPRSAAEGPALTRRRSKKE	40
CaBP4_R216X	MATEHNVQLVPGSQKIPKGVVSPRSAAEGPALTRRRSKKE	40
Consensus	matehmvqlvpgsqkipkgvvsprsaaegpaltrrrskke	
CaBP4_WT	SWHPGSQKASSGDQSSSQGSEASGSSKHPPRTKVGQEEPS	80
CaBP4_E267fs	SWHPGSQKASSGDQSSSQGSEASGSSKHPPRTKVGQEEPS	80
CaBP4_R216X	SWHPGSQKASSGDQSSSQGSEASGSSKHPPRTKVGQEEPS	80
Consensus	swhpgsqkassgdqsssqqseasgsskhpprtkvgqeeps	
CaBP4_WT	SAPARPASHRHSRHRSDPQQDAAQRTYGPLLNRMFGKDR	120
CaBP4_E267fs	SAPARPASHRHSRHRSDPQQDAAQRTYGPLLNRMFGKDR	120
CaBP4_R216X	SAPARPASHRHSRHRSDPQQDAAQRTYGPLLNRMFGKDR	120
Consensus	saparpashrhshrhrsdpqddaaqrtygpllrmfkgkdr	
CaBP4_WT	ELGPEELEELQAAFEFDTDQDGYIGYRELGDGMRTLGYM	160
CaBP4_E267fs	ELGPEELEELQAAFEFDTDQDGYIGYRELGDGMRTLGYM	160

CaBP4_R216X Consensus	ELGPEELEELQAAFEFFDQDGYIGYRELGDCMRTLGYM elgpeeelqaafeefdtqdggyigylgdcmrtygm	160
CaBP4_WT CaBP4_E267fs CaBP4_R216X Consensus	PTEMELLEVSQHVKMRMGGFVDFEEFVELISPKLREETAH PTEMELLEVSQHVKMRMGGFVDFEEFVELISPKLREETAH PTEMELLEVSQHVKMRMGGFVDFEEFVELISPKLREETAH ptemellevsqhvkmrmggfvdfefvelispklreetah	200 200 200
CaBP4_WT CaBP4_E267fs CaBP4_R216X Consensus	MLGVRELRIAFREFDKDRDGRITVAELRQAAPALLGEPLE MLGVRELRIAFREFDKDRDGRITVAELRQAAPALLGEPLE MLGVRELRIAF mlgvrelriafrefdkdrdgritvaelrqaapallgeple	240 240 211
CaBP4_WT CaBP4_E267fs Consensus	GTELDEMLREMDLNGDGTIDFDEFVMMMLSTG GTELDEMLREMDLNGDGTIDFvcndaiyrlrhlqgqptg gteldemlremdlngdgtidfd	271 280
CaBP4_E267fs	pggqdtshrqtttpfsmekspfpqagspphhtqlqslpv	320
CaBP4_E267fs	lsspipklwrekkn	334

FR Werte

Abb 3-2		FR	RSD
	1.4	1,44	0,067
	Δ ICDI	1,74	0,12
	EF	0,97	0,035
	NT	1,02	0,024
	EF-IQ	1,37	0,12
	5A	1,083	0,043

Abb 3-3		FR	RSD
Δ ICDI + ICDI	HEK293	2,67346	0,12457
	CaBP4	1,63858	0,0631
	R216X	2,02993	0,0537
	E267fs	1,62615	0,08313
DL	HEK293	2,91334	0,10262
	CaBP4	2,14298	0,05337
	R216X	1,7339	0,03477
	E267fs	1,64119	0,03377

Abb 3-5		FR	RSD
	1.4 + WT	1,44	0,067
	1.4 + 216X	1,86	0,12
	1.4 + E267fs	1,94	0,13
	1.4 + NT	1,05	0,047

Abb 3-7	Rho + Rho	3,37676	0,3696
	Rho + prph2	2,53686	0,15132
	Rho + B1a	1,21369	0,10967
	B1a + prph2	2,29671	0,32885

Abb 3-8		FR	RSD
	Rho + Prph2	2,53686	0,15132
	Rho + Prph2m34	1,70624	0,14812
	Rho + Prph2NT	0,95851	0,02472
	Rho + Prph2t12	1,21211	0,08649
	Rho + Prph2t13+	1,22783	0,10316

Abb 3-9			
	rhocit + prph2tm12	0,945	0,03301
	Rhocit + Rhocer	2,14381	0,08504

7. LITERATURVERZEICHNIS

Bech-Hansen, N. T., M. J. Naylor, T. A. Maybaum, W. G. Pearce, B. Koop, G. A. Fishman, M. Mets, M. A. Musarella and K. M. Boycott (1998). "Loss-of-function mutations in a calcium-channel $\alpha 1$ -subunit gene in Xp11.23 cause incomplete X-linked congenital stationary night blindness." Nat Genet **19**(3): 264-267.

Becirovic, E., O. N. Nguyen, C. Pappas, E. S. Butz, G. Stern-Schneider, U. Wolfrum, S. M. Hauck, M. Ueffing, C. Wahl-Schott, S. Michalakis and M. Biel (2014). "Peripherin-2 couples rhodopsin to the CNG channel in outer segments of rod photoreceptors." Hum Mol Genet **23**(22): 5989-5997.

Boesze-Battaglia, K. and A. F. Goldberg (2002). "Photoreceptor renewal: a role for peripherin/rds." Int Rev Cytol **217**: 183-225.
Catterall, W. A. (2000). "Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 521-555.

Clarke, G., A. F. Goldberg, D. Vidgen, L. Collins, L. Ploder, L. Schwarz, L. L. Molday, J. Rossant, A. Szekely, R. S. Molday, D. G. Birch and R. R. McInnes (2000). "Rom-1 is required for rod photoreceptor viability and the regulation of disk morphogenesis." Nat Genet **25**(1): 67-73.

Conley, S. M., M. W. Stuck and M. I. Naash (2012). "Structural and functional relationships between photoreceptor tetraspanins and other superfamily members." Cell Mol Life Sci **69**(7): 1035-1047.

Cook, N. J., L. L. Molday, D. Reid, U. B. Kaupp and R. S. Molday (1989). "The cGMP-gated channel of bovine rod photoreceptors is localized exclusively in the plasma membrane." J Biol Chem **264**(12): 6996-6999.

Corey, D. P., J. M. Dubinsky and E. A. Schwartz (1984). "The calcium current in inner segments of rods from the salamander (*Ambystoma tigrinum*) retina." J Physiol **354**: 557-575.
Dolmetsch, R. E., U. Pajvani, K. Fife, J. M. Spotts and M. E. Greenberg (2001). "Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway." Science **294**(5541): 333-339.

Dyer, M. A. and C. L. Cepko (2001). "Regulating proliferation during retinal development." Nat Rev Neurosci **2**(5): 333-342.

Fotiadis, D., Y. Liang, S. Filipek, D. A. Saperstein, A. Engel and K. Palczewski (2003). "Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes." Nature **421**(6919): 127-128.

Gomez-Ospina, N., F. Tsuruta, O. Barreto-Chang, L. Hu and R. Dolmetsch (2006). "The C terminus of the L-type voltage-gated calcium channel $\text{Ca}_v1.2$ encodes a transcription factor." Cell **127**(3): 591-606.

Griessmeier, K., H. Cuny, K. Rotzer, O. Griesbeck, H. Harz, M. Biel and C. Wahl-Schott (2009). "Calmodulin is a functional regulator of $\text{Ca}_v1.4$ L-type Ca^{2+} channels." J Biol Chem **284**(43): 29809-29816.

- Haeseleer, F., Y. Imanishi, T. Maeda, D. E. Possin, A. Maeda, A. Lee, F. Rieke and K. Palczewski (2004). "Essential role of Ca²⁺-binding protein 4, a Cav1.4 channel regulator, in photoreceptor synaptic function." *Nat Neurosci* **7**(10): 1079-1087.
- Hankins, M. W., S. N. Peirson and R. G. Foster (2008). "Melanopsin: an exciting photopigment." *Trends Neurosci* **31**(1): 27-36.
- Humphries, M. M., D. Rancourt, G. J. Farrar, P. Kenna, M. Hazel, R. A. Bush, P. A. Sieving, D. M. Sheils, N. McNally, P. Creighton, A. Erven, A. Boros, K. Gulya, M. R. Capecchi and P. Humphries (1997). "Retinopathy induced in mice by targeted disruption of the rhodopsin gene." *Nat Genet* **15**(2): 216-219.
- Knepp, A. M., X. Periole, S. J. Marrink, T. P. Sakmar and T. Huber (2012). "Rhodopsin forms a dimer with cytoplasmic helix 8 contacts in native membranes." *Biochemistry* **51**(9): 1819-1821.
- Lem, J., N. V. Krasnoperova, P. D. Calvert, B. Kosaras, D. A. Cameron, M. Nicolo, C. L. Makino and R. L. Sidman (1999). "Morphological, physiological, and biochemical changes in rhodopsin knockout mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(2): 736-741.
- Littink, K. W., M. M. van Genderen, R. W. Collin, S. Roosing, A. P. de Brouwer, F. C. Riemsdag, H. Venselaar, A. A. Thiadens, C. B. Hoyng, K. Rohrschneider, A. I. den Hollander, F. P. Cremers and L. I. van den Born (2009). "A novel homozygous nonsense mutation in CABP4 causes congenital cone-rod synaptic disorder." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(5): 2344-2350.
- Moriondo, A., B. Pelucchi and G. Rispoli (2001). "Calcium-activated potassium current clamps the dark potential of vertebrate rods." *Eur J Neurosci* **14**(1): 19-26.
- Oz, S., V. Tsemakhovich, C. J. Christel, A. Lee and N. Dascal (2011). "CaBP1 regulates voltage-dependent inactivation and activation of Ca(V)1.2 (L-type) calcium channels." *J Biol Chem* **286**(16): 13945-13953.
- Poetsch, A., L. L. Molday and R. S. Molday (2001). "The cGMP-gated channel and related glutamic acid-rich proteins interact with peripherin-2 at the rim region of rod photoreceptor disc membranes." *J Biol Chem* **276**(51): 48009-48016.
- Ritter, L. M., N. Khattree, B. Tam, O. L. Moritz, F. Schmitz and A. F. Goldberg (2011). "In situ visualization of protein interactions in sensory neurons: glutamic acid-rich proteins (GARPs) play differential roles for photoreceptor outer segment scaffolding." *J Neurosci* **31**(31): 11231-11243.
- Sanyal, S. and H. G. Jansen (1981). "Absence of receptor outer segments in the retina of rds mutant mice." *Neurosci Lett* **21**(1): 23-26.
- Schneeweis, D. M. and J. L. Schnapf (2000). "Noise and light adaptation in rods of the macaque monkey." *Vis Neurosci* **17**(5): 659-666.
- Shaltiel, L., C. Pappas, S. Fenske, S. Hassan, C. Gruner, K. Rotzer, M. Biel and C. A. Wahl-Schott (2012). "Complex regulation of voltage-dependent activation and inactivation properties of retinal voltage-gated Cav1.4 L-type Ca²⁺ channels by Ca²⁺-binding protein 4 (CaBP4)." *J Biol Chem* **287**(43): 36312-36321.

Sohocki, M. M., S. P. Daiger, S. J. Bowne, J. A. Rodriguez, H. Northrup, J. R. Heckenlively, D. G. Birch, H. Mintz-Hittner, R. S. Ruiz, R. A. Lewis, D. A. Saperstein and L. S. Sullivan (2001). "Prevalence of mutations causing retinitis pigmentosa and other inherited retinopathies." Hum Mutat **17**(1): 42-51.

Strom, T. M., G. Nyakatura, E. Apfelstedt-Sylla, H. Hellebrand, B. Lorenz, B. H. Weber, K. Wutz, N. Gutwillinger, K. Ruther, B. Drescher, C. Sauer, E. Zrenner, T. Meitinger, A. Rosenthal and A. Meindl (1998). "An L-type calcium-channel gene mutated in incomplete X-linked congenital stationary night blindness." Nat Genet **19**(3): 260-263.

Suda, K., S. Filipek, K. Palczewski, A. Engel and D. Fotiadis (2004). "The supramolecular structure of the GPCR rhodopsin in solution and native disc membranes." Mol Membr Biol **21**(6): 435-446.

Thoreson, W. B., K. Rabl, E. Townes-Anderson and R. Heidelberger (2004). "A highly Ca²⁺-sensitive pool of vesicles contributes to linearity at the rod photoreceptor ribbon synapse." Neuron **42**(4): 595-605.

Travis, G. H., J. G. Sutcliffe and D. Bok (1991). "The retinal degeneration slow (rds) gene product is a photoreceptor disc membrane-associated glycoprotein." Neuron **6**(1): 61-70.

Van Petegem, F. and D. L. Minor, Jr. (2006). "The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation." Biochem Soc Trans **34**(Pt 5): 887-893.

Wahl-Schott, C., L. Baumann, H. Cuny, C. Eckert, K. Griessmeier and M. Biel (2006). "Switching off calcium-dependent inactivation in L-type calcium channels by an autoinhibitory domain." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(42): 15657-15662.

Witkovsky, P., Y. Schmitz, A. Akopian, D. Krizaj and D. Tranchina (1997). "Gain of rod to horizontal cell synaptic transfer: relation to glutamate release and a dihydropyridine-sensitive calcium current." J Neurosci **17**(19): 7297-7306.

Wright, A. F., C. F. Chakarova, M. M. Abd El-Aziz and S. S. Bhattacharya (2010). "Photoreceptor degeneration: genetic and mechanistic dissection of a complex trait." Nat Rev Genet **11**(4): 273-284.

Zeitze, C., B. Kloeckener-Gruissem, U. Forster, S. Kohl, I. Magyar, B. Wissinger, G. Matyas, F. X. Borruat, D. F. Schorderet, E. Zrenner, F. L. Munier and W. Berger (2006). "Mutations in CABP4, the gene encoding the Ca²⁺-binding protein 4, cause autosomal recessive night blindness." Am J Hum Genet **79**(4): 657-667.

Zhang, Y., L. L. Molday, R. S. Molday, S. S. Sarfare, M. L. Woodruff, G. L. Fain, T. W. Kraft and S. J. Pittler (2009). "Knockout of GARPs and the beta-subunit of the rod cGMP-gated channel disrupts disk morphogenesis and rod outer segment structural integrity." J Cell Sci **122**(Pt 8): 1192-1200.

8. PUBLIKATIONEN

“Peripherin-2 couples rhodopsin to the CNG channel in outer segments of rod photoreceptors” E. Becirovic, P. Nguyen, C. Papanicolaou et al Hum Mol Genet. 2014 Jun 24. pii: ddu323. [Epub ahead of print]

“Sick sinus syndrome in HCN1 – deficient mice” S. Fenske et al Circulation. 2013 Dec 17;128(24):2585-94

“Complex regulation of voltage-dependent activation and inactivation properties of retinal voltage-gated Cav1.4 L-type Ca²⁺ channels by Ca²⁺-binding protein 4 (CaBP4).” L. Shaltiel, C. Papanicolaou et al Journal Biological Chemistry 2012 Oct 19; 287(43):36312-21

“HCN3 contributes to the ventricular action potential waveform in the murine heart” S. Fenske, R. Mader, A. Scharr, C. Papanicolaou et al Circulation Research 2011 Oct 14; 109(9):1015-23

9. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Martin Biel und Prof. Dr. Christian Wahl-Schott für die Aufnahme in den Arbeitskreis, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die allzeit sehr gute und freundliche Betreuung.

Frau Dr. Stefanie Fenske und Frau Dr. Kristina Grießmeier danke ich für die Einarbeitung in alle Themen der pharmakologischen Forschung und des Förster Resonanz Energietransfers. Herrn Dr. Christian Gruner gilt mein Dank wegen seines allzeit offenen Ohres bei allen Fragen der Molekularbiologie und darüber hinaus.

Mein Dank gilt weiterhin Dr. Stylianos Michalakis und Dr. Elvir Becirovic, die mich stets sehr ausführlich und kompetent in allen Fragestellungen zum Thema CNG-Kanäle und AAV beraten haben.

Ein Dankeschön geht an alle meine Kooperationspartner: Dr. Elvir Becirovic, Dr. Stefanie Fenske und Dr. Lior Shaltiel. Vielen Dank für die interessanten Diskussionen und die sehr erfolgreiche Zusammenarbeit!

Auch ein großes Dankeschön geht an alle Mitglieder und Ehemalige des Arbeitskreises. Ihr habt hier stets für eine tolle Stimmung und Atmosphäre gesorgt und tut das zum Teil noch immer. Das unterstützt, baut wieder auf nach Rückschlägen und hat mir immer bei der Lösung von Problemen geholfen. Ich werde mich gerne vor allem an die lustigen Stunden erinnern. Ein paar Kollegen seien hier ganz besonders hervorgehoben: Dr. Elvir Becirovic, Dr. Stefanie Fenske, Dr. Kristina Grießmeier, Dr. Christian Gruner, Dr. Verena Hammelmann, Dr. Sami Hassan, Dr. Mirja Koch, Dr. Susanne Koch, Dr. Stefanie Krause, Katrin Rötzer, Dr. Andreas Scharr, Dr. Michael Schieder, Dr. Lior Shaltiel und Dr. Saskia Spahn. Es war eine einfach super Zeit mit euch.

Auch Danke ich all meinen Freunden die mich auf diesem Weg begleitet haben, die ein offenes Ohr hatten, mitgefiebert haben und sich über Erfolge gefreut haben.

Und natürlich geht ein ganz großes Dankeschön an meine Frau Kathrin und unseren lieben Sohn Luis, meine Eltern sowie an meine ganze Familie ohne deren Liebe und allzeit große Unterstützung diese Arbeit sicherlich so nicht möglich gewesen wäre.