

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik
im Dr. von Haunerschen Kinderspital
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Dr. Christoph Klein

Über den Einfluss von Mutationen des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASp) auf die Interaktion von WASp und dem WASp-Interaktionsprotein (WIP) und dem klinischen Phänotyp des Wiskott-Aldrich-Syndroms.

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Gabriel Eberhard Zorn

aus

München

Jahr

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Søren W. Gersting - PD Dr. Anton Eberharter
Mitberichterstatter:	PD Dr. Dejana Mokranjac
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Prof. Dr. med. Ania Muntau
Dekan:	Prof. Dr. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	09.03.2023

Inhaltsverzeichnis

1	Wiskott-Aldrich-Syndrom	1
1.1	Klinik	2
1.1.1	Das Wiskott-Aldrich-Syndrom und die Symptome aus dessen Spektrum	2
1.1.2	X-chromosomale Thrombozytopenie (XLT)	3
1.1.3	X-chromosomale Neutropenie (XLN)	3
1.1.4	WAS-Score-System	3
1.2	Diagnostik	5
1.3	Therapie	7
1.4	Prognose	8
2	Molekulare Grundlagen	9
2.1	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen und Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein	9
2.1.1	Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen (WAS-Gen)	9
2.1.2	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASp)	11
2.2	<i>WIPF1</i> -Gen und WASp-Interacting-Protein (WIP)	15
2.3	Physiologie	17
2.3.1	WASp-WIP-Komplex	18
2.4	WASp-Homöostase	18
2.4.1	WASp-Aktivierung durch intrazelluläre Signalwege	20
2.5	Pathophysiologie und -genese	20
2.5.1	Die Pathophysiologie auf intrazellulärer Ebene	21
2.5.2	Die Pathophysiologie auf interzellulärer Ebene und der immunologischen Synapse	22
2.6	Aktuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelation	23
3	Fragestellung	26
4	Material und Methoden	27
4.1	Material und Geräte	27
4.1.1	Chemikalien	27
4.1.2	Zweifachdestilliertes Wasser (Aqua bidest.)	27
4.1.3	E. Coli-Stämme	27
4.1.4	Anzuchtmedien und Reagenzien für Prokaryoten	27
4.1.5	Eukaryotische Zelllinie	28

4.1.6	Anzuchtmedien für eukaryotische Zelllinie und Zellkulturbedarf.....	28
4.1.7	Plasmide und Vektoren.....	29
4.1.8	Reagenzien für Klonierung.....	29
4.1.9	Reagenzien und Materialien für Plasmidpräparation.....	30
4.1.10	Reagenzien für die horizontale gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	30
4.1.11	Geräte, Reagenzien, Material und primäre sowie sekundäre Antikörper für Western Blot.....	30
4.1.12	Geräte und Reagenzien zur BRET-Detektion.....	33
4.1.13	Geräte, Reagenzien und Material zur Nucleofection.....	33
4.1.14	Software.....	34
4.2	Methoden.....	34
4.2.1	Die cDNS von WASp und WIP.....	34
4.2.2	Primerdesign für das Gateway-Verfahren und das SDM-Verfahren.....	35
4.2.3	<i>in vitro</i> DNS-Amplifikation.....	35
4.2.4	Horizontale Gel-Elektrophorese.....	36
4.2.5	Site Directed Mutagenesis (SDM)-Verfahren.....	36
4.2.6	Sequenzanalyse.....	37
4.2.7	Kontrolle von Klonierungen mittels Sal I-Restriktionsenzymverdaus.....	37
4.2.8	Kultivierung von E. Coli-Stämmen.....	37
4.2.9	Glycerinstocks.....	38
4.2.10	Transformation chemisch-kompetenter Zellen.....	38
4.2.11	Plasmidpräparation.....	38
4.2.12	Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration.....	38
4.2.13	Gateway® Cloning.....	39
4.2.14	Arbeitsschritte im Rahmen der BRET-Messung.....	42
4.2.15	Zellkultur zur Vorbereitung der Western Blot-Experimente.....	44
4.2.16	Lyse der Zellen und Herstellung von Elektrophoreseproben.....	46
4.2.17	Vertikale Gel-Elektrophorese und Western Blot.....	47
4.2.18	Immunodetektion der Banden.....	47
4.2.19	Quantifizierung der Bandenintensität.....	48
5	Ergebnisse.....	49
5.1	Wahl der Mutationen - Literatur- und Datenbankrecherche.....	49
5.1.1	Mutationen innerhalb der WH1-Domäne.....	52

5.2	Abhängigkeit der WASp-Menge von WIP-Menge.....	53
5.2.1	Die Menge des WASp Wildtyps ist abhängig von der WIP-Menge.....	53
5.2.2	Die Menge des WASp WT's und der Varianten ist abhängig von der WIP-Menge.....	55
5.3	Beeinflussung der relative Bindungsaffinität von WASp zu WIP.....	59
5.3.1	Die Bindungsaffinität von WASp zu WIP wird durch Mutation reduziert.....	59
5.3.2	Der BRET-50-Wert von A134V im Vergleich zu den Werten aus der Datenbankrecherche.....	59
5.3.3	Die Bindungsaffinität von WASp zu WIP wird nicht durch die WIP-Isoform beeinflusst.....	61
5.4	Korrelation zwischen Bindungsaffinität und WAS-Score.....	62
6	Diskussion.....	64
6.1	Auswahl der Mutationen.....	64
6.2	Western Blots.....	66
6.2.1	Das Western-Blot-Verfahren in dieser Arbeit.....	66
6.2.2	Western-Blot-Analyse des WASp Wildtyps und seiner Varianten.....	67
6.3	BRET-Experimente.....	71
6.3.1	Die BRET-50-Werte der einzelnen Mutationen.....	73
6.4	Korrelation.....	77
7	Konklusion.....	79
8	Zusammenfassung.....	80
9	Abbildungsverzeichnis.....	82
10	Tabellenverzeichnis.....	84
11	Abkürzungsverzeichnis.....	85
12	Literaturverzeichnis.....	87
13	Anhang.....	101
14	Danksagung.....	102
15	Eidesstattliche Versicherung.....	103
16	Lebenslauf.....	104
17	Publikationsliste.....	105

1 Wiskott-Aldrich-Syndrom

Das Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) wurde 1936 von Alfred Wiskott mit einer Symptomtrias aus Immundefekt, Ekzem und Thrombozytopenie beschrieben (Wiskott, 1937). Er berichtete von drei Brüdern mit diesen Symptomen, eine Schwester allerdings war gesund. 1954 und somit achtzehn Jahre später veröffentlichte Robert Anderson Aldrich seine Studien zu US-amerikanischen Familien, in denen er von einem „eczema-thrombocytopenia-immunodeficiency syndrome“ sprach und erstmals eine hereditäre Genese des Krankheitsbildes über einen X-chromosomalen Erbgang vermutete. (Aldrich et al., 1954). Dies vermutete wohl auch A. Wiskott, wurde aber von ihm geheim gehalten, da er die Familie vor Verfolgung im Rahmen des Euthanasieprogrammes der NS-Diktatur schützen wollte (Binder, 2007).

Schließlich wurde das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen (WAS-Gen) 1994 durch *Kwan et al.* (*S. P. Kwan et al., 1991*) auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert, durch *Derry et al.* isoliert und sein Translationsprodukt - das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASp) - in Lymphozyten, Milz und Thymus nachgewiesen (Derry et al., 1994). Auch beschrieben *Derry et al.* Mutationen in diesem als ursächlich für WAS (Derry et al., 1994).

1996 beschrieben *de Saint Basile et al.*, dass auch die X-chromosomale Thrombozytopenie durch Mutationen in diesem Gen verursacht wird (de Saint Basile et al., 1996).

Ein Jahr später beschrieben *Ramesh et al.* das WASp-interacting-protein (WIP) als einen Interaktionspartner von WASp (Ramesh et al., 1997). Im weiteren Verlauf zeigte sich WIP als bedeutsames Chaperone von WASp (de la Fuente et al., 2007).

Das nach den beiden Erstbeschreibern benannte Wiskott-Aldrich-Syndrom ist somit eine X-chromosomale Erkrankung mit einer Inzidenz von etwa 2 bis 4 zu 1.000.000 Lebendgeburten (Ochs, 2007).

Im Vollbild der Erkrankung präsentieren sich die Patienten bereits in früher Kindheit mit Ekzemen, rezidivierenden Infektionen sowie hämorrhagischen Diathesen und tragen ein sehr hohes Risiko im Verlauf an Autoimmunerkrankungen oder Lymphomen zu erkranken (Ochs, 2007, 2019). Daneben präsentieren sich Mutationen im WAS-Gen phänotypisch auch als X-chromosomale Thrombozytopenie (XLT) mit milder Thrombozytopenie und als X-chromosomale Neutropenie (XLN).

1.1 Klinik

Das klinische Bild des Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS) umfasst ein Spektrum aus drei Phänotypen: dem klassischen Wiskott-Aldrich-Syndrom, der X-chromosomalen Thrombozytopenie (XLT) und der X-chromosomalen Neutropenie. Zur genaueren und standardisierten Zuordnung der Patienten zu diesen Phänotypen wurde das WAS-Score-System eingeführt.

1.1.1 Das Wiskott-Aldrich-Syndrom und die Symptome aus dessen Spektrum

Das klassische WAS ist gekennzeichnet durch verschiedenste Symptome, die zum Teil bereits kurz nach der Geburt ein heterogenes Krankheitsbild präsentieren.

Hierzu zählen fünf Klassen, welche auch jeweils Kategorien des WAS-Score-Systems sind:

- **Infektionen**

Das klinische Bild prägen rezidivierende Infektionen diverser Organe durch ein breites Erregerspektrum, wie *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* und *Haemophilus influenzae*, aber auch durch opportunistische Keime wie *Molluscum contagiosum* sowie diverser Viren (Sullivan et al., 1994). Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz an Infektionen, wie z.B. Otitiden, Pneumonien oder Meningitiden. (Sullivan et al., 1994).

- **Ekzeme**

Innerhalb des ersten Lebensjahres entwickeln Patienten Ekzeme, die sich wie Windeldermatitiden oder nicht selten im Bild einer atopischen Dermatitis präsentieren und häufig superinfiziert werden (Albert et al., 2011; Loyola Presa et al., 2013).

- **Blutungsneigung**

Die durch die Thrombozytopenie hervorgerufene Blutungsneigung präsentiert sich oftmals bereits nach der Geburt durch Petechien und verlängerte Blutung des Nabelstumpfs (Ochs, 2019). Auch vermehrt auftretende Hämatome, Nasenbluten, blutige Stühle bis hin zu lebensbedrohlichen intrakraniellen und gastrointestinalen Blutungen wurden beschrieben (Mahlaoui et al., 2013).

- **Autoimmunerkrankungen**

Bei WAS-Patienten wurde über diverse Autoimmunerkrankungen berichtet, darunter fanden sich Vaskulitiden, entzündliche Darmerkrankungen, hämolytische Anämien und Nierenerkrankungen (Chen et al., 2015; Dupuis-Girod et al., 2003).

- **Maligne Neoplasien**

B-Zell-Lymphome und Leukämien treten bei Patienten mit klassischem WAS vermehrt auf (Ochs, 2019).

1.1.2 X-chromosomale Thrombozytopenie (XLT)

Die X-chromosomale Thrombozytopenie ist eine Variante des klassischen WAS mit insgesamt milderem Verlauf. So treten Ekzeme seltener und in schwächerer Ausprägung auf. Auch die Thrombozytopenie variiert in ihrer Schwere (Notarangelo et al., 2002). Allerdings bleibt die Gefahr schwerer hämorrhagischer Diathesen, Lymphome und Autoimmunerkrankungen auch bei diesen Patienten erhöht (Albert et al., 2010).

XLT tritt auch in Schüben, gefolgt von symptomfreien Episoden auf. Diese Form wird als intermittierende XLT (iXLT) bezeichnet.

1.1.3 X-chromosomale Neutropenie (XLN)

Die X-chromosomale Neutropenie ist eine Entität des WAS-Spektrums, welche sich initial als angeborene Neutropenie präsentiert (Devriendt et al., 2001). Die Patienten fallen klinisch durch Infektionen auf, wie sie üblicherweise bei Neutropenien zu finden sind. Allerdings zeigen sie auch vermehrt Infektionen, die durch lymphozytäre Dysfunktion zu erklären sind, und sie haben ein erhöhtes Risiko an Myelodysplasie zu erkranken (Ancliff et al., 2006; Beel et al., 2009). Dieses Risiko ist bei den beiden anderen WAS-Entitäten nicht erhöht.

1.1.4 WAS-Score-System

Die Zuordnung der Patienten zu den drei Phänotypen gelingt durch klinische Untersuchung und entsprechender Gewichtung von 6 Kriterien, welche gemäß des WAS-Score-Systems (Tabelle 1) ausgewertet werden (Ochs, 2007, 2019). Dafür werden die Patienten auf Thrombozytopenie, Mikrothrombozyten, Ekzeme, Immundefekt, rezidivierende Infektionen und Autoimmunerkrankungen respektive maligne Neoplasien untersucht und die Befunde je nach Kategorie gewichtet. So werden die Kategorien Thrombozytopenie und Mikrothrombozyten nur in vorhanden oder nicht-vorhanden

eingeteilt. Bei den Kategorien Ekzeme, Immundefekt und Infektionen hingegen unterscheidet man nicht-vorhandene, milde, moderate oder starke Ausprägung. Die Kategorie Autoimmunerkrankungen oder maligne Neoplasie wird wiederum nur in nicht-vorhanden oder vorhanden eingeteilt. Die Werte für die jeweiligen Kategorien werden mit Hilfe der Diagnosetabelle (vgl. Tabelle 1) gewichtet und dem Patienten so der entsprechende WAS-Score-Wert zugewiesen.

Ein WAS-Score-Wert von 1 und 2 wird dem Phänotyp XLT, ein WAS-Score-Wert von 3 oder 4 dem klassischen WAS zugewiesen. Patienten die eine Autoimmunerkrankungen oder eine maligne Neoplasie entwickeln, erhalten unabhängig von ihrem vorherigen Wert einen Wert von 5 zugewiesen. Der Phänotyp intermittierende XLT (iXLT) erhält den Wert <1 und der Phänotyp XLN den Wert 0.

Da sich das Vollbild der Erkrankung erst im Laufe des Lebens entwickelt, ist dieses Score-System bei Kindern, insbesondere Kleinkindern, nur eingeschränkt anwendbar (Jin et al., 2004; Ochs, 2019). Zur Verlaufskontrolle nach Stammzelltransplantation hingegen scheint es nützlich (Albert et al., 2011).

Allgemein ist zu erwähnen, dass der WAS-Score ordinal skaliert ist und die einzelnen Werte somit nur eine Reihenfolge darstellen. Das klinische Bild bei einem Wert von 4 ist somit schwerer als bei einem von 2, allerdings lässt sich nicht sagen, dass es doppelt so schwer ist.

Tabelle 1: WAS-Score-Diagnosetabelle nach Ochs, 2007, 2015.

Erkrankung	XLN	iXLT	XLT		Klassisches WAS		
			1	2	3	4	5
Thrombozytopenie	-	-/+	+	+	+	+	
Mikrothrombozyten	-	+	+	+	+	+	
Ekzeme	-	-	-	(+)	+	++	
Immundefekt	-(+)	-	-(+)	(+)	+	+	
Infektionen	-(+)	-	-	(+)	+	+ / ++	
Autoimmunerkrankungen/ maligne Neoplasien	-	-	-	-	-	-	+
Angeborene Neutropenie	+	-	-	-	-	-	-
Myelodysplasie	-/+	-	-	-	-	-	-

1.2 Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose Wiskott-Aldrich-Syndrom kann bei Jungen erwogen werden, die unter häufigen Blutergüssen und Petechien leiden. Wird von rezidivierenden Infekten und Infektionen diverser Organsysteme und Ekzemen berichtet und ergeben Blutuntersuchungen eine Thrombozytopenie oder Mikrothrombozyten, so sollte weiterführende Diagnostik auf Wiskott-Aldrich-Syndrom erfolgen. Am einfachsten und sichersten erscheint hier eine Sequenzierungsanalyse des *WAS*-Gens. Die Diagnose *WAS* gilt dann gemäß den Kriterien in Tabelle 2 als gesichert, wenn eine Mutation im *WAS*-Gen vorliegt und eine Thrombozytopenie von weniger als 70 000 Thrombozyten/mm³ sowie Mikrothrombozyten nachgewiesen werden (Conley et al., 1999). Alternativ zum Mutationsnachweis des *WAS*-Gens können auch Mikrothrombozytopenie und Mikrothrombozyten bei Cousins, Onkeln oder Neffen mütterlicherseits oder fehlende Nachweisbarkeit des *WASp* oder seiner RNS in Lymphozyten dienen (Conley et al., 1999). Allerdings reicht aber eine fehlende Nachweisbarkeit von *WASp* alleine nach aktuellem Kenntnisstand nicht mehr zur Diagnosesicherung aus, da auch von Fällen eines *WAS*-Phänotyps bei Patienten berichtet wurde, die keine Mutation im *WAS*-Gen aufwiesen, sondern in dem für *WIP* (Lanzi et al., 2012). Aufgrund der abbauhemmenden Rolle von *WIP* für *WASp* ist auch hier kein *WASp* nachweisbar, wenn kein funktionsfähiges *WIP* vorliegt (näheres unter Kapitel 2.3). Daher sollte in unklaren Fällen eine Sequenzierungsanalyse des *WAS*-Gens und des *WIP*-Gens erfolgen. Diese sollte ebenfalls bei schwerer kongenitaler Neutropenie erfolgen.

Bei gesicherter Diagnose sollte sich in der Regel weitere Diagnostik innerhalb der Familie anschließen. Insbesondere auf der mütterlichen Seite muss bei der männlichen Verwandtschaft eine Ausschlussdiagnostik erfolgen. Auch der Trägerstatus von weiblichen Familienmitgliedern (Mutter, Schwestern, Tanten) sollte zur Familienplanung erhoben werden.

Ferner wurde von seltenen Fällen berichtet, bei denen Frauen betroffen waren. In der Regel lagen hier neben einer Mutation im *WAS*-Gen, weitere X-chromosomale Erkrankungen vor, welche zu einer Inaktivierung des X-Chromosoms ohne *WAS*-Mutation und so letztlich zu einem *WAS*- oder *XLT*-Phänotyp führten (Boonyawat et al., 2013; Inoue et al., 2002; Lutskiy et al., 2002; Parolini et al., 1998; Zhu et al., 2002). Auch der oben erwähnte Phänotyp, bei dem eine Mutation im *WIP*-Gen vorlag, wurde bei einer Patientin diagnostiziert (Lanzi et al., 2012).

Tabelle 2: Diagnosekriterien für das Wiskott-Aldrich-Syndrom nach Conley et al., 1999.

<p>Diagnose gesichert</p> <p>Männlicher Patient mit angeborener Thrombozytopenie (< 70 000 Thrombozyten/mm³), Mikrothrombozytopenie und mindestens einer der folgenden Punkte:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Gesicherte Mutation im WAS-Gen.2. Keine WAS messenger RNS in der Analyse von Lymphozyten mittels Northern Blot nachweisbar.3. Kein WAS-Protein (WASp) in Lymphozyten nachweisbar.4. Mikrothrombozytopenie und Thrombozytopenie bei Cousins, Onkeln oder Neffen mütterlicherseits.
<p>Diagnose wahrscheinlich</p> <p>Männlicher Patient mit angeborener Thrombozytopenie (< 70 000 Thrombozyten/mm³), Mikrothrombozytopenie und mindestens einer der folgenden Punkte:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Ekzeme.2. Pathologische Antikörperantwort auf Polysaccharidantigen.3. Rezidivierende bakterielle oder virale Infektionen.4. Autoimmunerkrankungen.5. Lymphome, Leukämien oder andere maligne Neoplasien.
<p>Diagnose wahrscheinlich</p> <p>Männlicher Patient mit angeborener Thrombozytopenie (< 70 000 Thrombozyten/mm³) und Mikrothrombozytopenie oder männliche Patienten nach Splenektomie bei Thrombozytopenie, auf die mindestens einer der folgenden Punkte zutrifft:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Ekzeme.2. Pathologische Antikörperantwort auf Polysaccharidantigen.3. Rezidivierende bakterielle oder virale Infektionen.4. Autoimmunerkrankungen.5. Lymphome, Leukämien oder andere maligne Neoplasien.

1.3 Therapie

- **Konservative Therapie**

Zur Prävention von Infektionen sollten möglichst frühzeitig Impfungen gegen Pneumokokken, Meningokokken und Haemophilus influenzae erfolgen (Klein, 2006; Schuster et al., 2004). Hierbei sind Totimpfstoffe zu bevorzugen (Ochs, 2007). Des Weiteren konnten mit regelmäßigen prophylaktischen intravenösen Immunglobulingaben, die in schweren Fällen um Antibiotikatherapie ergänzt wurden, gute Erfahrungen gemacht werden (Ochs, 2007). Die Therapie von Infektionen erfolgt ebenfalls durch dieses Regime und wird durch symptomatische Therapie sowie ggf. durch spezifische antivirale Therapie (z.B. Aciclovir bei Windpocken) erweitert (Ochs, 2007).

Zur Therapie der Thrombozytopenie und der damit verbundenen Blutungsneigung ist im Falle einer massiven Blutung die Transfusion von Thrombozytenkonzentraten angezeigt (Ochs, 2019). Eine Splenektomie kann bei ausgewählten Patienten mit den Phänotypen WAS und XLT erwogen werden, sollte aber bei angestrebter Knochenmarktransplantation unterbleiben, da hierdurch die Gefahr postoperativer Sepsisrisiko steigt (Ochs, 2019; Oshima et al., 2015). Nach Splenektomie wurde eine Abschwächung der Thrombozytopenie und Blutungsneigung beschrieben, jedoch erhöhte sich das Sepsisrisiko, was gegebenenfalls wiederum eine lebenslange antibiotische Abdeckung nötig machte (Litzman et al., 1996; Mullen et al., 1993). Ekzeme sollten zum einen durch gründliche Hautpflege, zum andern aber auch durch topische, ggf. systemische, Steroide oder sogar Ciclosporine behandelt werden (Klein, 2006). Sollte es im Verlauf zu Autoimmunerkrankungen kommen, sind Therapien mit Steroiden, hoch dosierten Immunglobulinen und Immunsuppressiva indiziert (Ochs, 2019; Schuster et al., 2004). Auch eine Therapie mit monoklonalen Antikörpern gegen CD20-Antigen, wie Rituximab, kann erwogen werden (Ochs, 2019).

- **Interventionelle Therapie**

Der derzeit einzige kurative Ansatz in der klinischen Routine ist die allogene Knochenmarktransplantation, die möglichst frühzeitig erfolgen sollte, um die Gefahr von Autoimmunerkrankungen und malignen Neoplasien sowie opportunistischen Erkrankungen zu reduzieren (Schuster et al., 2004). Sie sollte deshalb innerhalb der

ersten 2 Lebensjahre erfolgen. Das Outcome für Patienten, für die ein HLA-identischer Spender gefunden wurde, ist gut (Filipovich et al., 2001; Friedrich et al., 2009; Kobayashi et al., 2006; Ozsahin et al., 2008; Pai et al., 2006; Shin et al., 2012). Aber auch bei schlechterer HLA-Übereinstimmung hat sich das Outcome verbessert (Moratto et al., 2011; Shin et al., 2012). Bei Patienten mit WAS und einem Score zwischen 3 und 5 sollte eine Transplantation vorrangig als therapeutisches Ziel betrachtet werden (Ochs, 2019). Bei Patienten, die an XLT leiden, ist grundsätzlich mit einem milderem Verlauf der Erkrankung zu rechnen, insbesondere unter gründlicher konservativer Therapie. Allerdings ist auch hier eine Knochenmarktransplantation mit einem besseren Outcome verbunden (Oshima et al., 2015).

Des Weiteren wurde vor einigen Jahren im Rahmen spezifischer Studien ein gentherapeutisches Verfahren durchgeführt (Aiuti et al., 2013; Boztug et al., 2010; Braun et al., 2014). Hier wurde mittels retro- oder lentiviraler Vektoren eine gesunde Kopie des WAS-Gens in hämatopoetische Stammzellen eingeschleust und diese dann den Patienten transplantiert. Bei diesen Studien zeigten sich die klassischen Symptome wie Ekzeme, Immunschwäche, Thrombozytopenie und Autoimmunerkrankungen rückläufig (Ochs, 2019).

Auch wenn Gentherapie in Zukunft die Behandlungsmethode der Wahl werden kann, birgt sie zum jetzigen Zeitpunkt noch viele Unwägbarkeiten, wie z.B. Neoplasien somit ist die Gentherapie in der klinischen Routine noch nicht verfügbar.

1.4 Prognose

Das unbehandelte WAS führt in der Regel innerhalb des ersten Lebensjahrzehnts zum Tod. Haupttodesursache sind schwere Blutungen, daneben sind maligne Neoplasien bei WAS-Patienten mit einer schlechten Prognose assoziiert (Sullivan et al., 1994). Auch ist mit Todesfällen durch Infektionen zu rechnen. XLT und XLN gehen mit einer deutlich besseren Prognose einher. Patienten haben hier eine kaum eingeschränkte Lebenserwartung (Albert et al., 2010).

2 Molekulare Grundlagen

2.1 Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen und Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein

2.1.1 Das Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen (WAS-Gen)

Das WAS-Gen kodiert für WASp und liegt auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp11.22-p11.23) (Derry et al., 1994). Es besteht insgesamt aus 12 Exons mit einer Gesamtlänge von 1820 bp, die eine cDNS von 1509 bp umfassen (Derry et al., 1994). Ursächlich für das Syndrom sind Mutationen innerhalb dieses Gens. Sequenzierungsanalysen ergaben hierbei das gesamte Spektrum an Mutationen. So wurden Missense-, Nonsense- und Spleißmutationen, ebenso wie Insertionen und Deletionen nachgewiesen (Ochs, 2019; Ochs et al., 2009). Eine Analyse von *Jin et al.* aus dem Jahr 2004 von 227 nicht-verwandten Patienten ergab, dass mit 35,3 Prozent Missensemutationen am verbreitetsten sind, gefolgt von Spleißmutationen mit 19,4 Prozent sowie kurzer Deletionen unterhalb von 10 bp mit 17,6 Prozent und Nonsensemutationen mit 15,4 Prozent (Jin et al., 2004; Ochs, 2019). Insertionen mit 7,9 Prozent und komplexe Mutationen mit 4,4 Prozent waren somit weitaus seltener (Jin et al., 2004; Ochs, 2019).

Tabelle 3: Übersicht über die Verteilung der 5 häufigsten Mutationen im WAS-Gen. Nach *Jin et al., 2004*; AS=Aminosäure, FS=Frameshift

Mutation		Prozentsatz	Vorherrschender Phänotyp
NM_000377.3(WAS):c.134C>T	Thr45Met	3.1 %	XLT
NM_000377.3(WAS):c.256G>A/G/T NM_000377.3(WAS):c.257G>A/T	Arg86Ser/Gly/Cys Arg86His/Leu	7.5 %	XLT
NM_000377.3(WAS):c.559+5G>A	Stopp durch FS an AS 190/normal	2.6 %	XLT
NM_000377.3(WAS):c.631C>T	Arg211Ter	4.4 %	WAS
NM_000377.3(WAS):c.777+1G>A	Stopp durch FS an AS 246	4.4 %	WAS
Insgesamt		22.0 %	

Im Rahmen dieser Analyse konnten auch fünf Hotspots für Mutationen entdeckt werden (vgl. Tabelle 3), die als ursächlich für WAS oder XLT diagnostiziert wurden und dreimal zu einem vorzeitigen Stoppcodon sowie zweimal zu Missensemutationen führen. Am häufigsten war die Aminosäure Arginin 86 (Arg86) betroffen. Für diese Aminosäure kodiert

das Triplett CGC (nt: 256-258). An Position C256 wurden Nucleotidwechsel sowohl zu A, G oder T beschrieben, welche im exprimierten Protein zu den Mutationen Arg86 Ser, Gly, Cys führen und an Nucleotidposition G257 Wechsel zu A und T mit dem Aminosäurewechsel His respektive Leu. Die Stoppmutation C631T/Arg211Ter und die Spleißmutation 777+G>A, die zu einem Stoppcodon bei Aminosäure 246 führen, sind mit WAS assoziiert und rangierten gemeinsam an zweiter Stelle. An dritter Stelle kam die Mutation C134T/Thr45Met. Am seltenstes innerhalb dieser Studie kam die Spleißmutation 559+5G>A vor, die durch einen Frameshift zu einem Stoppcodon an Aminosäure 190 führt. Insgesamt machten diese Mutationen knapp ein Viertel der hier untersuchten Kohorte aus und wurden noch in einer weiteren Arbeit als Hotspots bestätigt (Jin et al., 2004). In zwei Metaanalysen zeigten *Ochs et al.* 2007 und 2016, dass Missensemutationen vor allem in den Exons 1 bis 4 vorkommen (vgl. Abbildung 1) (Ochs, 2007, 2019). Deletionen und Insertionen waren entlang des gesamten Gens verteilt und Spleißmutationen vor allem in den Exons 6, 8, 9, und 10 zu finden. Insgesamt sind die Exons 1 bis 4 am häufigsten von Mutationen, insbesondere Missensemutationen, betroffen. Dies ist zu betonen, da sie für

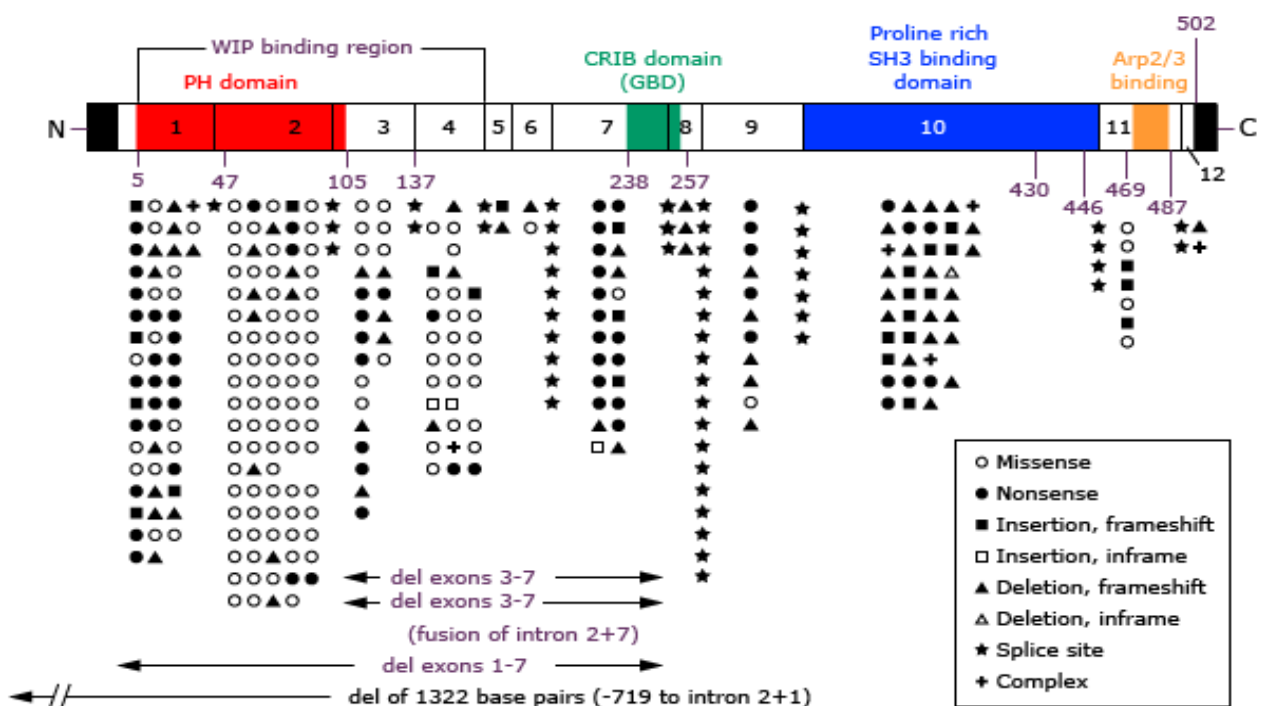


Abbildung 1: Verteilung von Mutationen, die WAS und XLT verursachen, entlang des WAS-Gens. Aus Ochs, 2019.

die WH1-Domäne kodieren, welche für die Interaktion zwischen WASp und WIP zuständig und somit für die WASp-Homöostase wichtig ist (s. hierzu Kapitel 2.4).

2.1.2 Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein (WASp)

Das WASp ist ein Protein von 502 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von etwa 53 kDa. Es wird exklusiv, dort aber konstitutiv, in Zellen der hämatopoetischen Linien exprimiert (Blundell et al., 2010; Derry et al., 1994). Das Protein gliedert sich in mehrere Domänen, von denen vier funktionell besonders hervorstechen (vgl. Abbildung 2). Am N-Terminus liegt die WASp-Homology-Domain 1 (WH1-Domäne). Ihr folgen die GTPase Binding Domain (GBD) und die Proline-Rich-Region (PPP) (Massaad et al., 2013). C-Terminus schließt sich noch ein Domänenkomplex an, der aus der Verprolin-Homology-Domäne (V), der Cofilin-Homology-Domäne (C) und der Acidic-Domäne (A) besteht (Massaad et al., 2013). Dieser Komplex wird zusammenfassend als VCA-Domäne bezeichnet. WASp ist ein autoinhibierendes Protein, welches in den zwei Zuständen aktiv und inaktiv vorliegen kann. Im inaktiven oder autoinhibierten Zustand geht die VCA-Domäne eine Bindung mit der GBD-Domäne ein, wobei im Bereich der PPP-Domäne eine Schleife gebildet wird (Kim et al., 2000). WASp ist ein zytoplasmatisches Protein, mit einer hohen Konzentration an der Zellmembran (Rivero-Lezcano et al., 1995). Die in Kapitel 2.1.1 beschriebenen Mutationen resultieren in einer signifikant unterschiedlichen Nachweisbarkeit des Proteins im Patientenblut (Jin et al., 2004). Missensemutationen führen in der Regel zu deutlich erhöht nachweisbarem Protein, Spleiß- und Nonsensemutationen sowie Insertion und Deletionen hingegen führen zu einer deutlich reduzierten Nachweisbarkeit des Proteins (Jin et al., 2004).

- **WH1-Domäne**

Die N-terminal gelegene WH1-Domäne ist ein Vertreter der in einigen Proteinen wiederkehrenden Ena/Vasp Homology domain 1 (EVH1) und wird von den Exons 1 bis 4 kodiert. Sie erstreckt sich von den Aminosäuren 39 bis 148 und ist für die Vermittlung der Interaktion mit dem WASp-Interacting-Protein (WIP) zuständig (Ramesh et al., 1997). Unmittelbar wird diese Interaktion durch eine hydrophobe Tasche von WASp etabliert. Im Jahr 2007 veröffentlichten *Peterson et al.* ein 3D-Modell der WH1-Domäne, welches mit Hilfe der Magnetresonanzspektroskopie erstellt worden war (Peterson et al., 2007). Dieses zeigt die Aminosäuren 26-147 des N-WASp von *rattus norvegicus* in Komplex mit dem WASp-Bindemotiv (AS 451-485) des menschlichen WIPs (Peterson et al., 2007). Eine Analyse der

Aminosäuresequenzen der humanen und der WH1-Domäne der Ratte mittels einer Genomdatenbank für Nucleotidvergleiche (NCBI Blast blastn suite (*Nucleotide BLAST*, 2017)) ergab, dass diese zu 53 % übereinstimmen und die Aminosäuren zu 74 % chemisch verwandt sind (vgl. Abbildung 3). Aufgrund der Ähnlichkeit von 74 % in dieser funktionellen Domänen und, wie von *Volkman et al.* gezeigt, einer hohen strukturelle Ähnlichkeit zwischen bekannter EVH1-Domänen diverser Proteine und

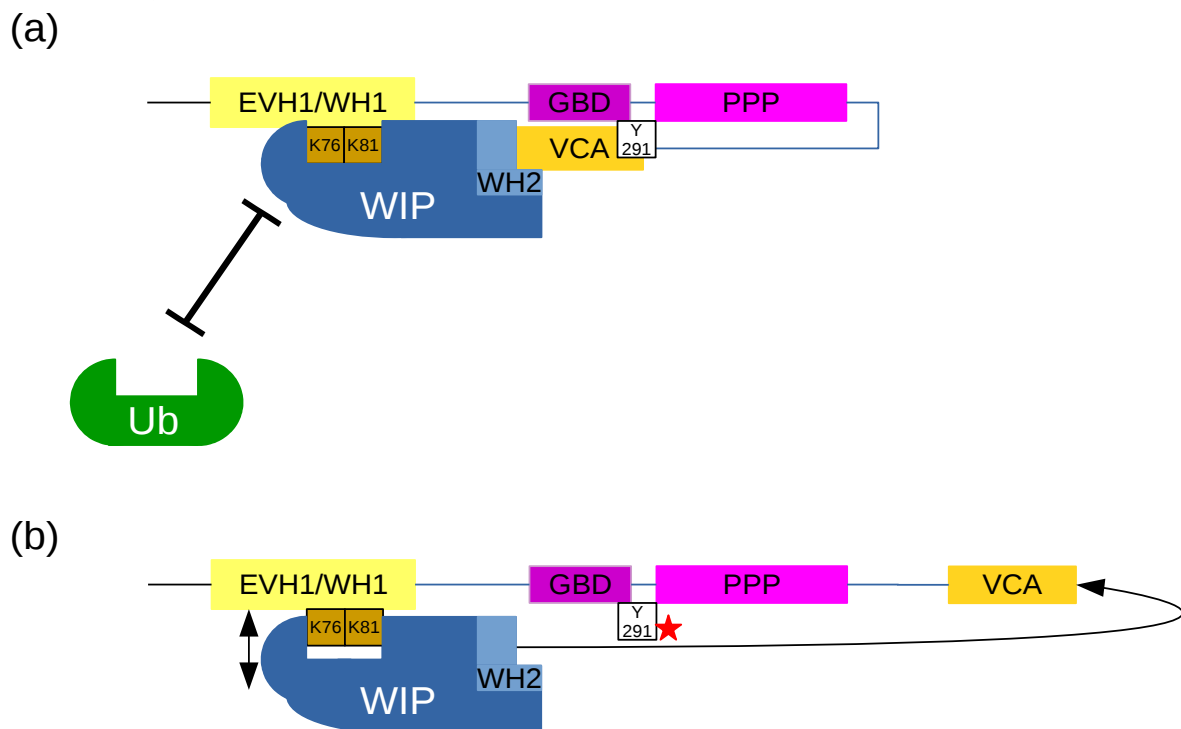


Abbildung 2: Modell des WASp in Interaktion mit WIP. Es sind die einzelnen Domänen farblich abgesetzt. An der WH1-Domäne sind durch die Quadrate K76 und K81 die Ubiquitylierungsdomänen, an der GBD-Domäne durch Quadrat Y291 die Phosphorylierungsstelle dargestellt. In (a) liegt das inaktive WASp im Komplex mit WIP vor. Dieser Komplex schirmt die Ubiquitylierungsdomäne von Ubiquitin (Ub) ab und wird durch die Bindung zwischen der WH2-Domäne des WIP und der VCA-Domäne des WASp stabilisiert. In (b) ist Y291 phosphoryliert (roter Stern) die VCA-Domäne interagiert nicht mehr mit der WH2-Domäne und somit bindet WIP schwächer an WASp;(eigene Grafik).

EVH1/WH1: WH1-Domäne; GBD: GBD-Domäne; PPP: PPP-Domäne; VCA: VCA-Domäne; K76,K81: Ubiquitylierungsdomäne des WASp; Y291: Phosphorylierungsstelle des WASp; WIP: WASp-Interacting-Protein; WH2: WH2-Domäne des WIP; Ub: Ubiquitin; roter Stern: zeigt Phosphorylierung von Y291 an.

der EVH1-Domäne WH1 des N-WASps der Ratte soll dieses 3D-Modell hier orientierend für das humane WASp herangezogen werden (Volkman et al., 2002). Die WH1-Domäne ist gekennzeichnet durch eine hydrophobe Tasche, die auf der einen Seite durch ein C-förmiges β -Faltblatt, auf der anderen Seite durch eine random-coil-Struktur und eine α -Helix gebildet wird (vgl. Abbildung 4). Über diese Domäne wird die Interaktion mit WIP vermittelt, was in der ruhenden Zelle zur Ausbildung des WASp-WIP-Komplexes führt.

Dieser ist zum einen wichtig für die WASp-Homöostase, da WIP die Ubiquitylierungsdomäne von WASp an K76 und 81 verdeckt. Zum anderen stabilisiert sie die inaktive Form von WASp (Kim et al., 2000; Massaad et al., 2013). Ferner ist die WASp-WIP-Interaktion für die Aktinpolymerisation bedeutsam, da WASp und WIP bei dieser gleichermaßen beteiligt sind (näheres hierzu unter Kapitel 2.3).

identische AS	ähnliche AS	Lücken	
58/110 (53%)	82/110 (74%)	2/110 (1%)	
rattus norvegicus	1	LGKKCVTMSSAVVQLYAA--DRNCMWSKKKCSGVAQLVKDNPQRSYFLRIFDIKDGKLLWE	58
		LG+KC+T+++AVVQLY A W+K+ G C VKDNPQ+SYF+R++ ++ G+LLWE	
homo sapiens	1	LGRKCLTLATAVVQLYLALPPGAEHWTKEHCGAVCFVKDNPQKSYFIRLYGLQAGRLLWE	60
rattus norvegicus	59	QELYNNFVYNsprgyfhtfagdtcQVALNFANEEAAKFRKAVTDLLGRR	108
		QELY+ VY++P +FHTFAGD CQ LNFA+E+EA+ FR V + + +R	
homo sapiens	61	QELYSQLVYSTPTPFHTFAGDDCQAGLNFADDEAQAQAFRALVQEKIQKR	110

Abbildung 3: Alignment der Proteinsequenz der WH1-Domänen von N-WASp Ratti norvegici und WASp Hominis sapientis. In der mittleren Spur ist ein Consensus aufgetragen, wobei Buchstaben eine Übereinstimmung in den Sequenzen widerspiegeln. Ein Pluszeichen (+) zeigt einen Austausch in Aminosäuren mit chemisch ähnlicher Eigenschaft an. Insgesamt sind die Aminosäuren in beiden Sequenzen hochkonserviert. Software-Alignment-Analyse nach Blast-Suite des NCBI's (Nucleotide BLAST, 2017)

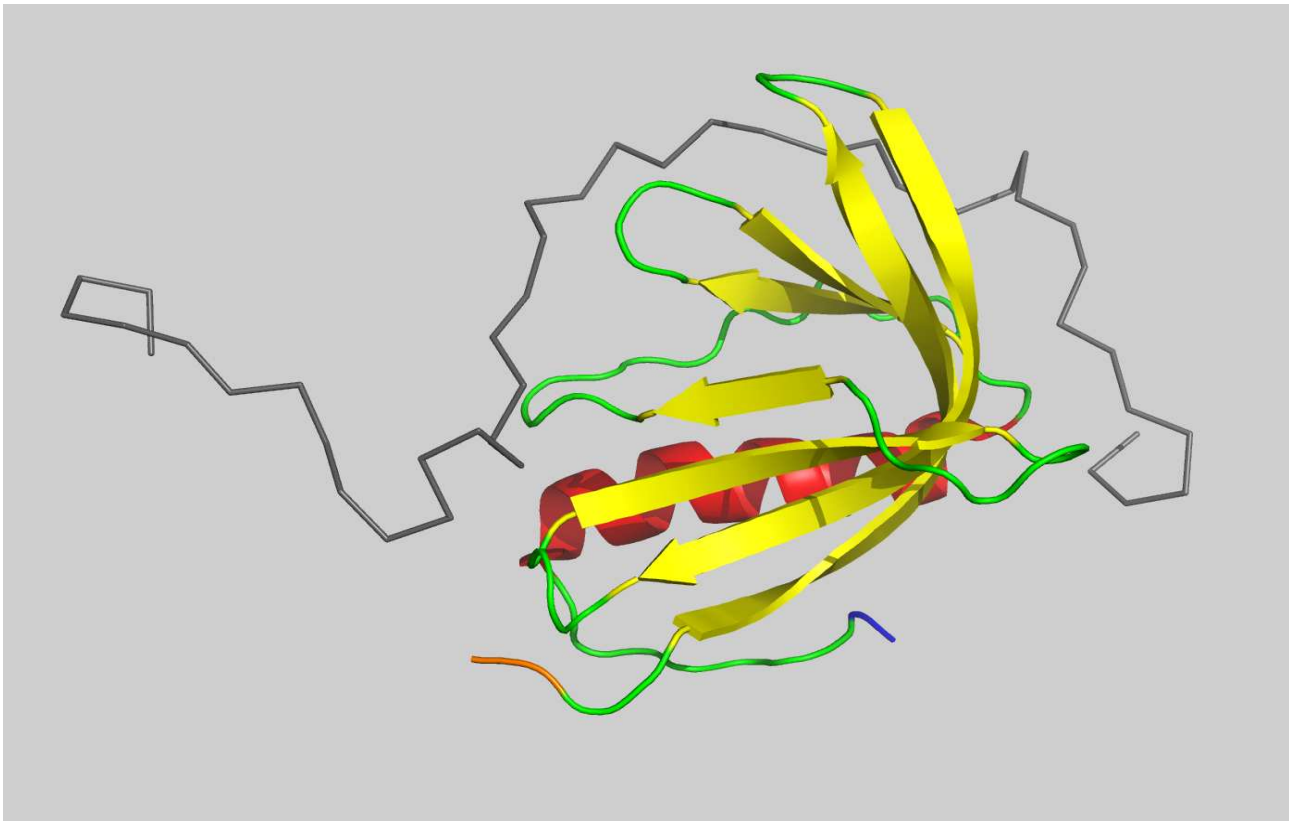


Abbildung 4: Sekundärstruktur der WH1-Domäne des N-WASp (*Rattus norvegicus*) und des WAS-Bindemotiv des WIP (*Homo sapiens*). β -Faltblatt: gelb; α -Helix: rot; N-Terminus: orange; C-Terminus: blau; WAS-Bindemotiv des WIP: anthrazit. Eigenes Bild erstellt mit der Software Pymol aus dem *3D-Modell* nach Peterson et al., 2007.

- **GBD-Domäne**

Die genetische Information der GBD-Domäne liegt auf den Exons 7 und 8, die Domäne selbst erstreckt sich von Aminosäure 236 bis 253 (Massaad et al., 2013). Sie besteht aus vier α -Helices sowie einer kleinen β -Faltblatt-Struktur, die C-terminal liegt.

Sowohl im aktiven als auch im inaktiven WASp nimmt die GBD-Domäne eine wichtige Rolle ein. Beim inaktiven WASp bindet sie an die VCA-Domäne, wobei die PPP-Domäne eine Schleife bildet (näheres hierzu unter Kapitel 2.3.1) (Kim et al., 2000). Nach Aktivierung eines T-Zellrezeptors und anschließender Signaltransduktion bindet als finaler Effektor die aktivierte GTPase CDC42 an dieser Domäne und verdrängt die VCA-Domäne, welche nun ins Zytosol reicht. In der GBD-Domäne findet sich auch die Phosphorylierungsstelle Y291. Ebenso liegen hier die Mutationen, die zum Phänotyp XLN führen und das Binden der VCA-Domäne an GBD-Domäne verhindern (Devriendt et al., 2001).

- **PPP-Domäne**

Die PPP-Domäne wird von Exon 10 kodiert und umfasst somit Aminosäuren 310 bis 446. Namensgebend ist der hohe Anteil der Aminosäure Prolin von knapp 42 Prozent. Sie trägt das SH3-Bindemotiv PLPPXP, welches die Interaktion mit einer Vielzahl an Signal- und Adaptorproteinen wie Grb2, Fyn, Src, BTK, ITK und PSTPIP1 ermöglicht (Massaad et al., 2013). Die Anzahl an Interaktionspartnern dieser Domäne lässt eine bedeutende Rolle von WASp innerhalb der zytoplasmatischen Signalkaskade vermuten (Imai et al., 2004).

- **VCA-Domäne**

Die als VCA-Domäne bezeichnete Region ist nicht klar umschrieben und setzt sich wiederum aus der Verprolin-Homology-Domäne (V), der Cofilin-Homology-Domäne (C) und der Acidic-Domäne (A) zusammen und wird durch die Exons 11 und 12 kodiert (Massaad et al., 2013). Sie enthält die für die Aktinpolymerisation wichtige Arp 2/3-Komplex-Bindedomäne, welche den Arp 2/3-Komplex synergistisch mit dem Partnerprotein Cortactin aktiviert (Weaver et al., 2003). Daneben verfügt sie selbst auch über die WH2-Domäne, welche sich von Aminosäuren 430 bis 447 erstreckt, mit WIP interagiert, dadurch die WASp-WIP-Bindung verstärkt und die inaktive Form von WASp stabilisiert (Fried et al., 2014; Kim et al., 2000).

2.2 WIPF1-Gen und WASp-Interacting-Protein (WIP)

Das WASp-Interacting-Protein (WIP) wurde erstmals 1997 von *Ramesh et al.* als Interaktionspartner von WASp beschrieben (Ramesh et al., 1997). Das dazu gehörige Gen *WIPF1* liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 2 an Position Xp11.22–Xp11.23 und umfasst 10 Exons (NCBI Gene - *WIPF1*, 2016; Ramesh et al., 1997). Seine cDNS hat eine Gesamtlänge von 1512 bp, die ein Transkript von 503 Aminosäuren mit etwa 51 kDa ergeben (NCBI Gene - *WIPF1*, 2016; *Uniprot: WIPF1*, 2016). WIP ist das namensgebende Protein für eine Familie von Proteinen, zu der neben WIP, auch WICH/WIRE, CR16 und mini-WIP gehören (Fried et al., 2014). Alle Mitglieder dieser Familie tragen N-terminal die sogenannte V-Domäne (Fried et al., 2014). Diese Domäne ist ein Komplex aus aktinbindenden Motiven und WASp-Homology-2 (WH2)-Domänen, deren Funktion die Zellorientierung und Aktinpolymerisation ist. Eine weitere wichtige Funktion der WH2-Domänen ist die Interaktion mit der VCA-Domäne von WASp, welche zum einen die inaktive Form von WASp stabilisiert und zum anderen die Bindungsaffinität zwischen WIP und WASp stärkt (Fried et al., 2014). Des Weiteren trägt WIP noch einige Motive, die an

der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind (Antón et al., 1998; Donnelly et al., 2013; Sasahara et al., 2002).

Für die WASp-Homöostase ist das WASp-Bindemotiv besonders zu betonen, welches sich von Aminosäure 451 bis 485 erstreckt (Peterson et al., 2007; Volkman et al., 2002). Durch die Bindung wird die Ubiquitylierungsdomäne von WASp maskiert und der schnelle WASp-Abbau verhindert.

Dies zeigt sich an der bislang einzigen Mutation von *WIPF1*, die zu einem WAS-Phänotyp führt, bei der gerade dieses Bindemotiv fehlt (Lanzi et al., 2012). Bei diesem Phänotyp, der auch als Wiskott-Aldrich-Syndrom 2 bezeichnet wurde, kommt es durch die Mutation NM_001375834.1(*WIPF1*):c.1301C>G (p.Ser434Ter) zu einem Stoppcodon, welche zu einem Syntheseabbruch des Proteins kurz vor der Interaktionsdomäne mit WASp führt (Lanzi et al., 2012). Hierdurch erklärt sich der gleiche Phänotyp wie bei WASp, da die Maskierung der Ubiquitylierungsdomäne entfällt und WASp somit verstärkt abgebaut wird.

Als Biosyntheseprodukt des *WIP*-Gens sind 4 Isoformen bekannt, wobei die Konsensussequenz der Isoform 1 entspricht und das oben beschriebene Protein von 503 Aminosäuren und einem Gewicht von 51 kDa ergibt (*Uniprot: WIPF1*, 2016). Isoform 2 trägt ab Aminosäure 487 die Aminosäuresequenz GluTyrPheCysGlnGlyPhe und ist somit 10 Aminosäuren kürzer als Isoform 1 und mit etwa 50 kDa auch etwas leichter (*Uniprot: WIPF1*, 2016). Isoform 3 hingegen wird durch die Aminosäuresequenz ProProLysGlnAlaAlaGlu nach Position 503 verlängert und ist daher mit knapp 52 kDa wiederum etwas schwerer als die Konsensussequenz (*Uniprot: WIPF1*, 2016). Isoform 4 hat eine Deletion zwischen Aminosäuren 220 und 364 und ist folglich mit etwa 36 kDa deutlich leichter (*Uniprot: WIPF1*, 2016). Zu diesen Isoformen sind keine Pathologien beschrieben, was vermutlich an der bei allen vier unveränderten WASp-Bindesequenz, die zwischen Aminosäuren 451 und 485 lokalisiert ist, liegt (Volkman et al., 2002). Des Weiteren gibt es Einzelnukleotid-Polymorphismen (engl. single nucleotide polymorphism, SNP), welche zu natürlichen Varianten des Proteins führen, wie zum Beispiel Asn119Asp, Asp20His oder die Insertion Pro360Val.

Ein recht häufiger SNP mit der Nummer des Reference SNP Cluster Report rs4972450 führt durch einen Nukleotidaustausch von C zu T an Nukleotidposition 512 zu einem Wechsel von Prolin zu Leucin an Aminosäureposition 198 (Yates et al., 2016). Dieser

Polymorphismus ist weltweit verbreitet, allerdings mit deutlich unterschiedlicher Frequenz in verschiedenen Ethnien. So kommt er bei Afrikanern der Subsaharazone und deren Nachfahren in den Vereinigten Staaten mit 19 % am häufigsten vor, gefolgt von Asiaten aus südlichen Ländern wie Pakistan und Bangladesch sowie deren Nachfahren im Vereinigten Königreich und den Vereinigten Staaten mit 13 %. Personen aus Europa (Finnland, Spanien, Italien) und solche aus den Vereinigten Staaten mit europäischen Vorfahren tragen rs4972450 mit einer Wahrscheinlichkeit von 5 %, knapp gefolgt von Lateinamerikanern und den amerikanischen Ureinwohnern mit 3 %. Am seltensten ist er bei Ostasiaten (China, Japan, Vietnam) mit 1 % zu finden (Yates et al., 2016). Dieser ist in der ClinVar Datenbank des NCBI's als benigne eingestuft (NCBI ClinVar - VCV000403608.3, 2021). Diese Einstufung lässt sich bereits anhand der Frequenz vermuten, da diese deutlich über der des Wiskott-Aldrich-Syndroms liegt.

2.3 Physiologie

Zellen der hämatopoetischen Reihen bilden Organsysteme, die sich nicht in einem umschriebenen Raum befinden. Bekanntestes Beispiel sind hier wohl die Erythrozyten, die den größten Anteil des Organsystems Blut ausmachen. Darin enthalten sind allerdings noch weitere Zellen der hämatopoetischen Reihe, wie Thrombozyten und Lymphozyten. Letztere sind in der Lage den Blutstrom zu verlassen und können in das umliegende Gewebe einwandern. Diese Zellmigration folgt inflammatorischen Stimuli entlang eines Gradienten von Cytokinen, sie wird als Chemotaxis bezeichnet und bedarf eines koordinierten Ablaufs. Beginnend mit Adhäsion der Zelle am Blutgefäß, weiter über transendotheliale Migration bis hin zur Phagozytose von Erregern oder Fremdstoffen erfordern diese Schritte eine Änderung der Zellform. Aber auch die Bildung der immunologischen Synapse und Interaktionen von Zellen untereinander sind nur dadurch möglich. Diese Veränderung gelingt durch den Umbau des Cytoskeletts der Zelle, welches zu einem Großteil aus Aktinfilamenten besteht. Dabei kommen WASp und WIP außerordentliche Bedeutung zu:

Zunächst wird WASp durch WIP zum Ort der Aktinpolymerisation geführt (Antón et al., 2007). Die *de novo*-Synthese von Aktinfilamenten (F-Aktin) aus monomerem Aktin (G-Aktin) ist energetisch sehr ungünstig (Frieden, 1983). Um die Polymerisation aus G-Aktin nun energetisch günstiger zu gestalten, dient der Arp 2/3-Komplex als Polymerisationskeim (Machesky et al., 1997; Machesky & Gould, 1999). Dies gelingt, da die zwei Untereinheiten Arp 2 und Arp 3 des Komplexes eine hohe strukturelle Ähnlichkeit

zu Aktin aufweisen und so ein bereits bestehendes Filament nachahmen können (Machesky et al., 1997; Machesky & Gould, 1999). Der Komplex muss allerdings durch Proteine der WASp-Familie aktiviert werden, deren C-terminale VCA-Domäne sowohl G-Aktin als auch den Arp 2/3-Komplex bindet (Higgs et al., 1999). Durch Phosphorylierung der Serinreste 483 und 484, welche in der VCA-Domäne liegen, kann die Affinität dieser zum Arp 2/3-Komplex erhöht und die Aktinpolymerisation verbessert werden (Torres & Rosen, 2003).

2.3.1 WASp-WIP-Komplex

WASp und WIP liegen in ruhenden Lymphozyten bis zu 80 % als Komplex vor (de la Fuente et al., 2007). Diesem Komplex fallen verschiedene Aufgaben zu. So stabilisiert er die inaktive Form von WASp und vermittelt die Lokalisation von WASp in der Nähe der Zellmembran insbesondere an Podosomen (Chou et al., 2006; Kim et al., 2000). Die wichtigste Aufgabe dieses Komplexes jedoch ist die Aufrechterhaltung der WASp-Homöostase. Dies gelingt durch die Maskierung der Ubiquitylierungsdomäne von WASp durch WIP und somit der Reduktion des Abbaus von WASp sowie die bereits erwähnte Stabilisierung der inaktiven Form (Kim et al., 2000; Reicher et al., 2012). Die Hauptinteraktion wird auf Seiten von WASp durch die N-terminale Tasche der WH1-Domäne, die sich von den Aminosäuren 39 bis 148 erstreckt, vermittelt (Ramesh et al., 1997).

Auf Seiten von WIP ist das WASp-Binde-Motiv, welches sich von Aminosäure 451 bis 485 erstreckt, beteiligt (Peterson et al., 2007; Volkman et al., 2002).

Die Tasche der WH1-Domäne besteht in ihrem Zentralbereich an ihrer Oberfläche aus aromatischen, hydrophoben Aminosäureresten, die die Polyprolin-Helix des WIP (AS: 461-468) aufnimmt (Antón et al., 2007; Peterson et al., 2007). Diese hydrophobe Interaktion wird N- und C-terminal durch zwei elektrostatische Interaktionen verstärkt (Antón et al., 2007; Peterson et al., 2007).

Daneben gibt es noch eine weitere, die Bindungsaffinität von WASp und WIP erhöhende, Interaktion zwischen der VCA-Domäne von WASp und der WH2-Domäne von WIP, die auch für die Stabilisierung der inaktiven Form zuständig ist (Fried et al., 2014)

2.4 WASp-Homöostase

Die Homöostase von WASp wird auf der einen Seite durch die Proteinsynthese, auf der anderen Seite sowohl durch das Proteasom als auch Calpain, eine Calcium-abhängige

Cystein-Protease, aufrechterhalten (Blundell et al., 2010; Derry et al., 1995; Fried, et al., 2014). Die Konservierung einer bestimmten Menge WASp in der Zelle ist für die Chemotaxis von elementarer Bedeutung, da die Anzahl der Podosomen in direktem Verhältnis zur Menge an WASp steht (Massaad et al., 2011). So führt ein Mangel zu einer deutlich reduzierten Anzahl an Podosomen und verhindert somit eine erfolgreiche Zellmigration (Blundell et al., 2010; Dovas & Cox, 2010). Ein Überschuss an WASp hingegen würde den zur Migration nötigen Gradienten zwischen an der Podosomenausbildung beteiligten und unbeteiligten Bereichen der Zellmembran stören und sie somit wiederum behindern (Massaad et al., 2011; Worth et al., 2013).

Wie die WASp-Synthese und somit dessen Homöostase reguliert wird, ist derzeit noch unbekannt. Es ist lediglich bekannt, dass ein Mangel an WASp, wie er beim Wiskott-Aldrich-Syndrom auftritt, zu keiner Erhöhung seiner mRNA führt (de la Fuente et al., 2007). Es gibt somit wohl keinen Feedbackmechanismus, der die Produktion auf der Ebene der Genexpression beeinflusst.

Auch wie der Abbau respektive der Proteinumsatz von WASp reguliert wird, unterliegt derzeit noch der Diskussion. So kommen unterschiedliche Autoren einiger Übersichtsarbeiten beim Auswerten der gleichen Studien zu widersprüchlichen Schlussfolgerungen (Blundell et al., 2010; Fried et al., 2014; Massaad et al., 2013). *Fried et al.* postulierten im Jahre 2014, dass sich der WASp-WIP-Komplex nach T-Zell-Rezeptor-Aktivierung (TCR-Aktivierung) und anschließender Phosphorylierung von WIP auflöst und so die Ubiquitylierungsdomäne von WASp freigegeben wird, WASp ubiquityliert und schließlich dem Proteasom zugeführt wird (Fried et al., 2014). *Blundell et al.* hingegen postulierten 2010, dass WASp im Rahmen des regulären Proteinumsatz durch das Proteasom, nach Aktivierung und Phosphorylierung hingegen durch Calpain abgebaut wird (Blundell et al., 2010). Beide Abbauewege wurden nachgewiesen und dürfen somit als gesichert gelten. Der Abbau von WASp durch das Proteasom erfolgt nach Ubiquitylierung des Proteins durch die E3-Ubiquitin-Ligase CBL-B und C-CBL (Reicher et al., 2012). Hierbei bindet die jeweilige Ligase im Bereich der GBD-Domäne und überträgt Ubiquitin auf die Argininreste 76 und 81, welche in der WIP-Bindestelle liegen und im Zustand des WASp-WIP-Komplexes durch WIP maskiert sind (Massaad et al., 2011; Reicher et al., 2012). Voraussetzung für das Binden der Ubiquitinligase ist die Phosphorylierung des Tyrosinrests 291 von WASp, der im Bereich der GBD-Domäne liegt (Reicher et al., 2012). Derzeit sind die Umstände der Phosphorylierung nicht abschließend

geklärt. *Dovas* und *Cox* diskutierten diese und führten Studien an, die sowohl die Phosphorylierung nach TCR-Aktivierung und anschließender Aktivierung von WASp zeigten, als auch als transienten Effekt im Rahmen des Proteinumsatzes (*Dovas & Cox, 2010*).

Ebenfalls sicher beschrieben ist der Abbau von WASp durch die Familie der Calcium-regulierten Protease Calpain (*Blundell et al., 2010; Fried et al., 2014; Massaad et al., 2013*). Im Gegensatz zu den meisten anderen Proteasen schneiden diese nicht an einer durch die Abfolge von Aminosäuren bestimmten Schnittstelle, sondern sie schneidet an durch die Tertiärstruktur bestimmten Stellen (*Cuerrier et al., 2005*). Aktiviert wird diese Familie durch den Anstieg an Calcium im Zytosol (*Khorchid & Ikura, 2002*).

Ein denkbares Szenario beim Calpain-vermittelten Abbau von WASp wäre, dass im Rahmen der TCR-Aktivierung, und der damit verbundenen Ausschüttung von Calcium als *second messenger* sowie der Aktivierung von CDC42, zum einen WASp aktiviert wird und somit die Aktinpolymerisation beginnt und zum anderen, fast simultan, WASp durch Calpain abgebaut wird. Im Rahmen der Chemotaxis ist ein rascher Wechsel im Auf- und Abbau von Podosomen nötig, um die Migration zu ermöglichen.

2.4.1 WASp-Aktivierung durch intrazelluläre Signalwege

WASP liegt innerhalb der Zelle im Komplex mit WIP und in einer autoinhibierten Form vor (vgl. Kapitel 2.3.1). Nach Aktivierung der Zelle wird der WASp-WIP-Komplex durch Bindung von Adapterproteinen an die PPP-Domäne und durch Bindung der Signalproteinen CrKL und Nck an die Zellmembran gelotst (*Antón et al., 1998; Massaad et al., 2013; Sasahara et al., 2002*). Als Zielprotein vieler Signalwege kann WASp durch verschiedene Proteine wie etwa durch das Binden der GTPase CDC42 an die GBD-Domäne, von Phospholipiden aus der PIP2-Familie an die BR-Domäne, der Adapterproteine Toca-1, Nck und Grb2 an die PPP-Domäne aus der autoinhibierten in die aktive Form versetzt werden (*Massaad et al., 2013*). Dies führt zum Ausklappen des VCA-Domänenkomplexes. Nun bindet die V-Domäne G-Aktin und die A-Domäne den Arp 2/3-Komplex (*Massaad et al., 2013*). Das G-Aktin wird durch diesen Komplex in Aktinfilamente verbaut. Durch diese Aktinpolymerisation entstehen Podosomen oder die immunologische Synapse.

2.5 Pathophysiologie und -genese

Die Rolle von WASp bzw. des WASp-WIP-Komplexes bei der Chemotaxis, der Bildung der

immunologischen Synapse, sowie allgemein der Modulation und Reorganisation der Zellmembran, erklären die Wichtigkeit dieses Proteins bei der Immunabwehr.

2.5.1 Die Pathophysiologie auf intrazellulärer Ebene

Die Aktivierung von WASp erfolgt über die Phosphorylierung der Aminosäure Y291 durch die Kinase CDC42, welche an vielen intrazellulären Signalwegen beteiligt ist.

In der aktivierten Form von WASp lösen sich die GDB- und die VCA-Domäne voneinander und letztere bindet Arp 2/3 und beeinflusst so die Aktinpolymerisation, welche Voraussetzung für die Reorganisation des Cytoskeletts und somit z.B. für die Chemotaxis ist.

Ursächlich für das Krankheitsbild von WAS sind die Störungen dieser Funktionen hervorgerufen durch die Mutationen im WAS-Gen und letztlich durch Mangel der VCA-Domäne von WASp (Schuster et al., 2004).

Zu diesem Mangel kann es auf zwei verschiedene Weisen kommen. So führen Spleißmutationen, Insertionen und Deletionen oftmals zu einem Rasterschub, der entweder in einer funktionslosen Kette von Aminosäuren oder in einem Stoppcodon mündet (Albert et al., 2010; Jin et al., 2004; Ochs & Thrasher, 2006). Ebenso gibt es Nonsensemutationen, die zu einem Stoppcodon führen. Gemeinsam haben diese Mutationen, dass durch den Syntheseabbruch oder durch funktionslose Proteinketten die VCA-Domäne und somit deren verstärkende und beschleunigende Wirkung bei der Aktinpolymerisation fehlt.

Auch die Missensemutationen in den Exons 1 bis 4, welche für die WH1-Domäne kodieren, führen zu einem Mangel an WASp (Albert et al., 2010; Jin et al., 2004). Mutationen in diesem Bereich führen zu Varianten des Proteins, welches in der Bindung zu WIP gestört ist (Luthi et al., 2003; Stewart et al., 1999; Worth et al., 2013). Eine Störung der WASp-WIP-Bindung wiederum führt über gesteigerte Ubiquitylierung zu einem vermehrten Abbau von WASp, was letztlich auch in einen Mangel mündet (de la Fuente et al., 2007; Massaad et al., 2011, 2013).

Vereinzelt wurden Missensemutationen beschrieben, die in der Arp 2/3-Bindedomäne liegen (Jin et al., 2004). Hier wird die Pathogenese in einer verminderten oder nicht vorhandenen Bindung von WASp an den Arp 2/3-Komplex vermutet.

Es lässt sich abschließend festhalten, dass der Mangel an der VCA-Domäne und somit

deren elementare Rolle bei der Aktinpolymerisation ursächlich für die Symptomatik des Wiskott-Aldrich-Syndrom ist (Higgs et al., 1999; van der Gucht et al., 2005).

2.5.2 Die Pathophysiologie auf interzellulärer Ebene und der immunologischen Synapse

Die intrazellulären Mechanismen führen in den Zellen der hämatopoetischen Linien zu diversen Defekten, deren Zusammenwirken zum Phänotyp führen (vgl. Abbildung 5).

Eine wichtige Funktion, die durch einen Mangel an WASp gestört wird, ist die Chemotaxis, also die Wanderung von Abwehrzellen entlang eines Cytokingradienten zum Ort einer Infektion. Hierdurch kommt es beispielsweise zu Ekzemen oder Entzündungen an Organsystemen. Das Eindringen auch nur von wenigen Erregern, wie sie bei allen Menschen natürlicherweise vorkommen, führt bei WAS-Patienten leichter zu einer manifesten Infektion (Ochs & Thrasher, 2006).

Als immunologische Synapse bezeichnet man die Schnittstelle zwischen antigenpräsentierenden Zellen und Lymphozyten. Diese Synapse wird durch Umbauten im Aktingerüst gebildet und ermöglicht die Erkennung von Peptiden als körpereigen oder -fremd („*Freund-Feind-Erkennung*“). Es ist leicht ersichtlich, dass Störungen hier zum einen zur Immunschwäche, zum anderen aber auch zu Autoimmunerkrankungen führen können (Ochs, 2019).

Bei Traumata führt der WASp-Mangel in Thrombozyten zu Problemen bei deren Aggregation in Wundgebieten und führt so z.B. zu Petechien.

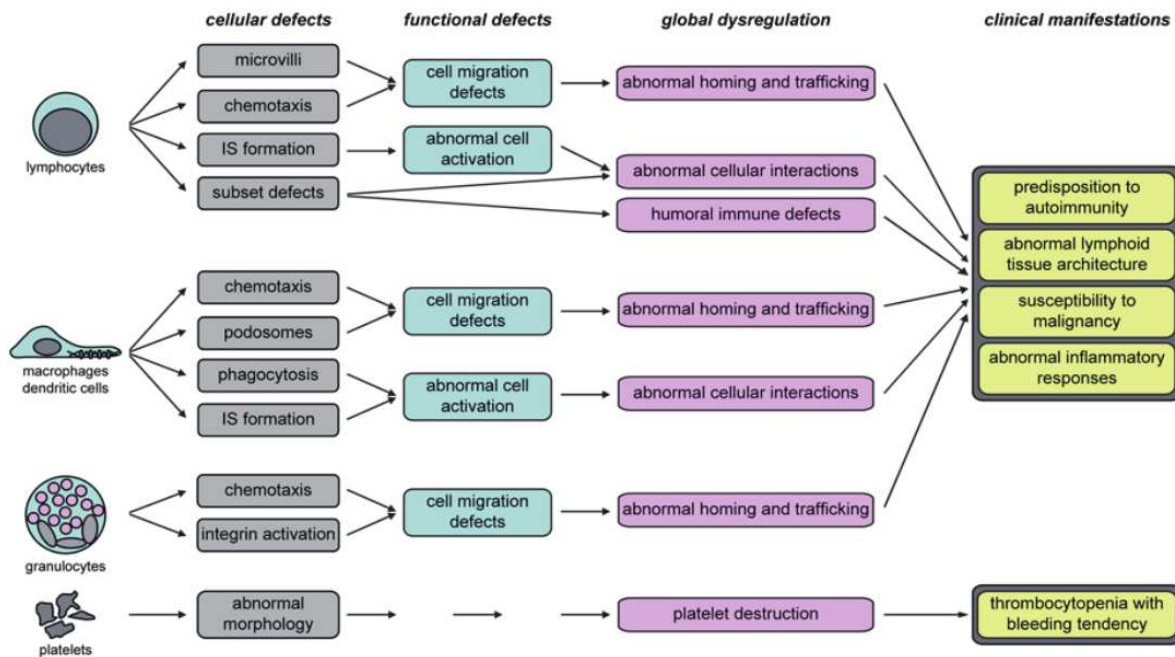


Abbildung 5: der Mangel an WASp führt je nach Zellart, aber auch in einer Zellart zu verschiedenen Defekten, welche zu Problemen in der Chemotaxis und zu abnormer Zellaktivierung führen. Abbildung aus Blundell et al., 2010.

2.6 Aktuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Der Phänotyp einer Erbkrankheit wird sowohl von äußeren Umständen als auch von den ursächlichen genetischen Veränderungen beeinflusst. Ein angeborenes Syndrom kann durch verschiedene Mutationen verursacht werden, die zu Krankheitsbildern führen, die sich ähneln. Um diesbezüglich Vorhersagen machen zu können, verwendet man Genotyp-Phänotyp-Korrelationen.

Im Allgemeinen sind diese Korrelationen ein statistischer Zusammenhang zwischen Genotyp und Phänotyp, die Vorhersagen über physische Eigenschaften respektive Merkmale bei Gesunden oder Missbildungen oder Symptome bei Erkrankten erlauben (Ries & Gal, 2006).

Hierbei bedeutet Korrelation, dass ein Zusammenhang zwischen einer Mutation und einem Symptom oder einer Missbildung nicht allein durch Zufall begründet sein kann (Ries & Gal, 2006).

Ein Beispiel für eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation findet sich bei M. Gaucher, einer

lysosomalen Speicherkrankheit. Ist ein Patient homozygot für die Variante Leu483Pro der β -Glukocerebrosidase, so ist dies mit einem hohen positiv prädiktiven Wert für eine neuropathische Form des M. Gaucher verbunden. Hingegen ist die Variante Asp409Ser mit einem hohen positiv prädiktiven Wert mit einer nicht-neuropathischen Form assoziiert (Ries & Gal, 2006).

Die derzeitige Genotyp-Phänotyp-Korrelation basiert auf der Beobachtung von *Jin et al.* aus dem Jahre 2004, dass der Phänotyp bei XLT und WAS von der WAS-Proteinexpression in Lymphozyten der Patienten abhängt. (Jin et al., 2004). Sie analysierten insgesamt 160 Lymphozyten-Proben von unverwandten XLT/WAS-Patienten und teilten diese in zwei Gruppen. In die eine wurden Patienten mit WASp in Volllänge, in die andere Patienten mit verkürztem beziehungsweise nicht nachweisbarem WASp eingeteilt. Die statistische Auswertung der Proteinmenge gegen den Phänotyp, also WAS oder XLT, ergab, dass nachweisbares WASp-Protein eher mit einem milden Phänotyp (WAS-Score 1 und 2) und nicht nachweisbares Protein oder verkürzt exprimiertes eher mit einem schweren Phänotyp (WAS-Score 3 und 4) hoch signifikant ($P < 0.001$) assoziiert war (Jin et al., 2004). Diese Beobachtungen deckten sich mit denen von *Imai et al.* aus dem gleichen Jahr sowie denen von *Liu et al.* aus dem Jahre 2015 (Imai et al., 2004; Liu et al., 2015). Alle drei Studien zeigten ferner gemeinsam, dass Missense-Mutationen eher mit XLT (WAS-Score 1 und 2), hingegen aber Insertionen, Deletionen, Stopp- und Spleißmutationen eher mit WAS (WAS-Score 3 und 4) assoziiert waren. Bei Spleißmutationen gab es von diesen Mutationen allerdings den größten Anteil mit XLT-Phänotyp bei nachweisbarem WASp. *Jin et al.* erklärten dies mit ihrer Beobachtung, dass es bei Spleißmutationen zu einem gewissen Anteil korrekter mRNS kommt, welche zu funktionsfähigem Protein transkribiert wird (Jin et al., 2004). Die Zuteilung von WAS-Score-Wert 5, also das Auftreten von malignen Neoplasien oder Autoimmunerkrankungen, konnte sowohl bei nachweisbarem sowie nicht-nachweisbarem WASp festgestellt werden, allerdings mit einer höheren Inzidenz bei der Gruppe mit nicht-nachweisbarem Protein (Imai et al., 2004; Jin et al., 2004; Liu et al., 2015).

Ein Nachteil dieses Modells ist die binäre Einteilung in Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein des Proteins. Es ermöglicht außerhalb dieser zwei Werte keine weitere Graduierung der einzelnen Mutationen untereinander. Hier erfolgt lediglich die Einteilung in Vorhanden, eine tendenziell mildere Verlaufsform, und Nicht-Vorhanden, eine tendenziell schwere Verlaufsform.

Des Weiteren lässt die Detektion von im Krankheitsfall reduziertem WASp den molekularen Mechanismus, wie es zu der verringerten Menge kam, außer Acht und ist selbst somit eigentlich schon ein Symptom der Krankheit.

Es wäre somit wünschenswert eine detailliertere Korrelation zu haben, die auf molekularer Ebene ansetzt und einzelne Mutationen untereinander vergleichbarer macht. Auf diese Weise könnte ggf. eine individuelle Prognose für die Patienten zuverlässiger erstellt werden.

3 Fragestellung

Es ist bekannt, dass bei angeborenen Erkrankungen durch Mutation und dem daraus resultierenden veränderten Protein die Protein-Protein-Interaktionen dieses Proteins mit seinen Interaktionspartnern gestört sein kann (Gersting et al., 2008). Für das Verständnis dieser Krankheiten ist es oftmals hilfreich die gestörte Interaktion zu untersuchen und genau zu kennen.

In unserer Arbeitsgruppe wurde mit dem BRET-Verfahren eine Methode etabliert, die die Beobachtungen der Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle und die Messung einer relativen Bindungsaffinität (BRET-50-Wert) ermöglicht (Gersting et al., 2012). Mit dieser Methode wurde eine umfangreiche Interaktionsdatenbank angelegt.

Ziel dieser Arbeit war die Protein-Protein-Interaktion von WASp und WIP, die über die WH1-Domänen etabliert wird, genauer zu untersuchen, da diese Domäne als ein Fokus des WAS bekannt ist (Ochs, 2019).

Hierzu wurden folgende Teilziele verfolgt:

1. Die Veränderung der WASp-Homöostase durch Mutationen des WAS-Gens.
2. Die Analyse dieser Veränderung im Bezug auf die WASp-WIP-Interaktion.
3. Die assoziative und statistische Auswertung der Ergebnisse, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Schwere der Krankheit (Phänotyp) und veränderter WASp-WIP-Interaktion zu untersuchen.

Dies wurde durch folgende experimentelle Schritte verwirklicht:

- a) Die systematische Auswertung entsprechender Literatur und Interaktionsdatenbanken zur Auswahl von Mutationen und Erhebung diesbezüglicher Daten.
- b) Die experimentelle Untersuchung des Einflusses der Mutationen auf die WASp-Menge sowie die Quantifizierung eben dieser.
- c) Die experimentelle Erhebung von Daten zur möglichen Veränderung der WASp-WIP-Interaktion durch Mutation.
- d) Die statistische Auswertung der erhobenen Daten im Allgemeinen und Würdigung sowie Korrelation der experimentellen Daten mit den erhobenen Patientendaten (WAS-Score) im Besonderen.

4 Material und Methoden

4.1 Material und Geräte

4.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden in pro analysi Qualität von den Firmen Bio-Rad Laboratories GmbH (München), Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf), Life Technologies™ GmbH/Invitrogen™/Gibco® (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen bei München) bezogen. Andernfalls ist die Quelle vermerkt.

4.1.2 Zweifachdestilliertes Wasser (Aqua bidest.)

Das zweifachdestillierte Wasser (Aqua bidest.) wurde mittels Umkehrosrose-Gerät Milli-Q® Integral 5 Water Purification System, Merck KGaA, Darmstadt, bei Bedarf hergestellt.

4.1.3 E. Coli-Stämme

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
E. coli DH5- α	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	DH5 α -Zellen
XL1 - Blue Supercompetent Cells	Agilent Technologies /Stratagene (Waldbronn)	XL1 – Blue-Zellen

4.1.4 Anzuchtmedien und Reagenzien für Prokaryoten

LB – Medium:

Hefeextrakt 0,5%, Pepton 1%, NaCl 1%, pH=7,4

In Aqua bidest. hergestellt und danach autoklaviert

Selektive LB – Agarplatten:

LB – Medium gemäß vorherigem Punkt, Agar 2%,

Zugabe des Antibiotikums zu 1000 ml LB – Medium nach Abkühlung des Mediumd auf unter +50°C

Glycerinstocks:

vgl. Kapitel 4.2.9

Reagenzien:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Glycerin 85 %	Apotheke des Klinikums der Universität München	Glycerin 85 %
Ampicillin	SERVA GmbH, Heidelberg	Ampicillin
Kanamycin	SERVA GmbH, Heidelberg	Kanamycin

4.1.5 Eukaryotische Zelllinie

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Menschliche embryonale Nierenzellen (HEK-293-Flp-InTM-293)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	HEK293-Zellen
Jurkat-Cells, immortalisierte menschliche T-Lymphozyten	DSMZ, Braunschweig, Deutschland	Jurkat-Zellen

4.1.6 Anzuchtmedien für eukaryotische Zelllinie und Zellkulturbedarf

Puffer und weitere Lösungen:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Gibco™ DPBS, no calcium, no magnesium	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	PBS
Trypsin (2.5%), no phenol red	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Trypsin

Medien:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Gibco™ DMEM, high glucose, with phenol red	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	DMEM mit Phenolrot
Gibco™ DMEM, high glucose	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	DMEM ohne Phenolrot
Gibco™ RPMI 1640 Medium	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	RPMI-Medium

Zusätze für Medien:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Gibco™ Fetal Bovine Serum	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	FCS
Gibco™ Antibiotic-Antimycotic (100X)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Antibakterieller, antimykotischer Zusatz

4.1.7 Plasmide und Vektoren

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Vivid Colors™ pcDNA™6.2 /N-YFP-DEST Vector	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	YFP-N-DEST-Vektor
Vivid Colors™ pcDNA™6.2 /C-YFP-DEST Vector	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	YFP-C-DEST-Vektor
hRluc in Vivid Colors™ pcDNA™6.2/N-YFP-DEST Vector	In der Arbeitsgruppe selbst kloniert (Schatz, 2014) YFP durch hRluc ersetzt.	hRluc-N-DEST-Vektor
hRluc in Vivid Colors™ pcDNA™6.2/C-YFP-DEST Vector	In der Arbeitsgruppe selbst kloniert (Schatz, 2014) YFP durch hRluc ersetzt.	hRluc-C-DEST-Vektor
Gateway® pEF-DEST51 Vector	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	V5-C-DEST-Vektor
Gateway® pDONR™221 Vector	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	pDonor221-Vektor

4.1.8 Reagenzien für Klonierung

Gateway-Verfahren:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	BP Clonase II Enzyme mix
Gateway® LR Clonase® II Enzyme mix	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	LR Clonase II Enzyme mix
Proteinase K Solution	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Proteinase K
FastDigest Sal I	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Sal I-Enzym
10X FastDigest® Green buffer	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Fast-Digest-Puffer

DNS-Polymerase:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
KAPA HiFi DNA-Polymerase	VWR International GmbH, Darmstadt	DNA-Polymerase

4.1.9 Reagenzien und Materialien für Plasmidpräparation

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD	VWR International GmbH, Darmstadt	Peqleeb-Kit
PureYield™ Plasmid Maxiprep System	Promega GmbH, Mannheim	Promega-Kit

4.1.10 Reagenzien für die horizontale gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf	Agarose
Ethidiumbromid Dropper Bottle 0,625 g/ml	Olerup SSP AB, Stockholm (Schweden)	Ethidiumbromid
Gel Loading Solution (6x)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Loading-Dye
TBE - Puffer (5-fach Konzentrat)	AppliChem GmbH, Darmstadt	TBE-Puffer
1 Kb Plus DNA Ladder	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	DNS-Größenstandard

4.1.11 Geräte, Reagenzien, Material und primäre sowie sekundäre Antikörper für Western Blot

Zellyse:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Proteaseinhibitor

Lysepuffer:

20 mM HEPES, 200 mM NaCl, 1 Tablette cOMplete-Mini, 0,5 % Triton, in Aqua bidest pH 7,0.

Probenaufbereitung:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	LDS-Puffer
NuPAGE® Sample Reducing Agent	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	SRA-Lösung
MixMate®	Eppendorf AG, Hamburg	Schüttelapparatur

Elektrophoreseverfahren:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	MOPS-Puffer
NuPAGE™ Novex™ 10% Bis-Tris Protein Gels	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	10%-Gel
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Proteingrößenstandard
XCell4 SureLock™ Midi-Cell Electrophoresis System	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Vertikale Laufkammer

Western Blot-Verfahren:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Whatman™ 3 mm	GE Healthcare GmbH, Solingen	Filterpapier
Amersham™ Protran™ 0.45 NC	GE Healthcare GmbH, Solingen	Nitrocellulosemembran
Blotting-Grade, pulv., fettarm	Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe	Milchpulver

Towbin Puffer nach Towbin et al., 1979:

25 mM Tris (hydroxymethylaminomethan), 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8,3, in Aqua bidest.

10x TBS-Puffer :

6,05 % (m/v) Tris (hydroxymethylaminomethan), 8,76 % (m/v) NaCl, in Aqua bidest.

1x TBS-Tween:

10 % (v/v) 10x TBS-Puffer, 0,05 % (v/v) Tween, in Aqua bidest pH 7,5.

Blocking-Milch:

Milchpulver 5 % in TBS-Tween-Puffer herstellen

Antikörper:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
V5 Mouse Monoclonal Antibody	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Anti-V5-Antikörper
Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)	Meridian Life Science, Memphis, Tennessee, USA	Anti-GapDH-Antikörper
goat anti-mouse IgG-HRP	Santa Cruz (R) Biotechnologies, Heidelberg	Anti-Maus-HRP-Antikörper

HRP-Substrat:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	ECL-Substrat
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fischer Scientific, Darmstadt	Femto-Substrat

Photometer zur Western-Blot-Analyse:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Diana III	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Staubenhardt	Diana-Photometer

4.1.12 Geräte und Reagenzien zur BRET-Detektion

Reagenzien:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
Coelenterazin	PJK GmbH, Kleinblittersdorf	Coelenterazin

Photometer zur Detektion des BRET-Signals:

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
PHERAstar FS	BMG LABTECH GmbH, Ortenberg	PHERAstar FS

4.1.13 Geräte, Reagenzien und Material zur Nucleofection

Amaya™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System

Lonza, Köln

Corning® Costar® 96 Well Flat Bottom White Polystyrene TC- Treated Microplates

Corning GmbH, Kaiserslautern

Greiner CELLSTAR® 6 Well cell culture plate

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

TC Plate 96 Well, Standard, F

Sarstedt AG & Co, Nümbrecht

Amaya-Puffer:

236,15 M Calciumnitrat, 74,55 M Kaliumchlorid, 246,5 M Magnesiumsulfat, 58,44 M Natriumchlorid, 84,01 M Natriumhydrogencarbonat, 177,99 M Natriumhydrogenphosphat, 180,2 M Glucose, 260,29 M Hepes, 307,33 M Glutathion, pH 7,3 einstellen

1M-Puffer nach Chicaybam et al., 2013:

5mM KCl; 15mM MgCl₂; 120mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH7.2; 50mM Mannitol
in Aqua bidest. hergestellt und steril filtriert bei 0,2 µm Porenweite. (Filtropur S 0.2, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)

4.1.14 Software

Produkt	Hersteller	In dieser Arbeit referenziert als
SerialCloner 2.6.1	Franck Perez, Serial Basics, 2004 -2013, Paris;(Perez, 2013)	SerialCloner
Prism 5.01 for Windows	GraphPad Software, San Diego, USA	Prism
PyMOL The PyMOL Molecular Graphics System Version 1.7.2.1	Schrödinger, LLC, New York, USA	Pymol
ImageJ 1.48k	Wayne Rasband, National Institute of Health, USA; (Rasband, 1997)	ImageJ

4.2 Methoden

4.2.1 Die cDNS von WASp und WIP

Die cDNS von WASp und WIPF1 war in der Arbeitsgruppe bereits verfügbar und wurde vom PlasmID-Dienst der Harvard Medical School bezogen. Der Versand erfolgte in Glycerolstocks.

Gen	PlasmID-Nummer	Bemerkung
WAS	HsCD00076306	pDONR221
WIPF1	HsCD00296919	pDONR221; Isoform 3 N119D, P198L

Von den in dieser Arbeit verwendeten Vektorkonstrukten waren ebenfalls in der Arbeitsgruppe bereits vorhanden: *WAS-WT* im hRluc-C-DEST-Vektor und im V5-C-DEST-Vektor sowie *WIPF1 Isoform 3 N119D, P198L* im pDonor221-Vektor, YFP-C-DEST-Vektor und YFP-N-DEST-Vektor. Des Weiteren lag auch die Phenylalanin-Hydroxylase im YFP-C-DEST-Vektor vor.

Die WAS-Varianten H30del, T45M, V75M, R86C, F114I, E133K, Q185X, R211X, L270P, R321X lagen bereits im V5-DEST-Vektor vor.

Die WAS-Variante A134V im hRluc-C-DEST-Vektor und im V5-C-DEST-Vektor sowie *WIPF1 Isoform 1* im pDonor221-Vektor, YFP-C-DEST-Vektor und V5-C-DEST-Vektor wurden im Rahmen dieser Arbeit, wie in den folgenden Abschnitten beschrieben, erstellt.

4.2.2 Primerdesign für das Gateway-Verfahren und das SDM-Verfahren

Die cDNS von WASp und WIP musste zum einen für das Gateway-Verfahren um die sog. att-Sites ergänzt und zum anderen durch das SDM-Verfahren modifiziert werden, um die zu untersuchenden Mutationen von WAS und die Isoform 1 von WIPF1 zu erhalten.

Die Synthese aller Primer in dieser Arbeit erfolgte durch Eurofins MWG GmbH, Ebersberg. Beim Design wurde auf eine ähnliche Schmelztemperatur insbesondere der korrespondierenden Primer geachtet. Die Temperatur wurde mit dem „Oligonucleotide Properties Calculator“ der Northwestern University Chicago bestimmt.

Tabelle 4: att-Site Primer

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'
WIPF1	WIPF1_wt_fwd	GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTT TAC CAT GCC TGT CCC TCC CCC TCC AGC
WIPF1 Isoform 1	WIPF1_Iso1_dStop_rev	GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTT CCT CGG GAT GGG AGG GAG TGG T

Tabelle 5: SDM-Primer

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'
WAS A134V	WAS_A134V_fwd	CGA GGA CGA GGT CCA GGC CTT CC
WAS A134V	WAS_A134V_rev	GGA AGG CCT GGA CCT CGT CCT CG
WIPF1	WIP D119N fwd	GCC AAC AGG GAT AAT GAT TCT GGA
WIPF1	WIP D119N rev	TCC AGA ATC ATT ATC CCT GTT GGC
WIPF1	WIP L198P fwd	TTC AAT CAA GTC CGC ACA ACC GG GG
WIPF1	WIP L198P rev	CCC CGG TTG TGC GGA CTT GAT T GAA

4.2.3 *in vitro* DNS-Amplifikation

Die DNS-Amplifikation wurde mittels der Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt. Hier kam das Kapa HiFi Hotstart-System zum Einsatz. Von den Reagenzien wurde 1 U DNA-Polymerase, 50 ng Template und 15 pmol der korrespondierenden Primer eingesetzt.

4.2.3.1 PCR zur Fusion mit den att-Sites

Nach einer initialen Denaturierung der DNS bei 95°C über 3 min folgten 30 Zyklen bestehend aus jeweils 20 s Denaturierung bei 98°C, gefolgt von 15 s Annealing bei 68°C und 45 s Elongation bei 72°C. Am Ende folgte eine Elongation bei 72°C für 5 min, um die in vorausgehenden Zyklen nicht komplett synthetisierten DNS-Stränge zu vervollständigen (Protokoll modifiziert nach Schatz, 2014).

4.2.3.2 PCR zur Einbringung von Punktmutationen im Rahmen des SDM- Verfahrens

Nach einer initialen Denaturierung der DNS bei 95°C über 5 min folgten 17 Zyklen bestehend aus jeweils 20 s Denaturierung bei 98°C, gefolgt von 60 s Annealing bei 55 bis 62°C (abhängig von der Primer-Struktur und –Länge) und 8 min Elongation bei 72°C. Am Ende folgte eine Elongation bei 72°C für 5 min, um die in vorausgehenden Zyklen nicht komplett synthetisierten DNS-Stränge zu vervollständigen (Protokoll modifiziert nach Schatz, 2014).

4.2.4 Horizontale Gel-Elektrophorese

Mittels eines elektrischen Felds kann DNS in einem Gel ihrer Größe nach sortiert werden. Hierzu wird ein 1% Agarose-Gel in eine horizontale Laufkammer gelegt und vollständig mit der elektrisch leitfähigen TBE-Puffer-Lösung bedeckt. Weiters werden die Proben, die im Verhältnis 1:20 mit Loading-Dye gemischt wurden, in Aussparungen (Taschen) dieses Gels eingefüllt. Zusätzlich wird noch eine adäquate Menge eines DNS-Größenstandards, sog. DNS-Ladder, das eine Zuordnung von Laufhöhe und Größe ermöglicht, aufgetragen. Anschließend wird eine elektrische Spannung von 120 V für 45 min angelegt.

Da das Gel mit Ethidiumbromid angereichert wurde, welches im Komplex mit DNS unter UV-Licht fluoresziert, konnte das Verteilungsmuster hierrunter abfotografiert und die Größe der PCR-Produkte anhand des DNS-Größenstandards bestimmt werden.

4.2.5 Site Directed Mutagenesis (SDM)-Verfahren

Dieses Verfahren dient der Einbringung von Punktmutationen in eine beliebige DNS-Vorlage. Hierzu werden zunächst Primer erstellt, die etwa 20 bis 25 Basenpaare lang sind und weitgehend identisch mit dem Sequenzabschnitt der DNS-Vorlage sind, der das zu mutierende Codon-Triplett enthält. Dabei wird dieser Abschnitt nach Möglichkeit so bestimmt, dass dieses Triplett in der Mitte des Primers liegt. Nucleotide des Triplett werden so ausgetauscht, dass es nun für die gewünschte Aminosäure kodiert.

Mit diesen Primern wird nun eine PCR gemäß Kapitel 4.2.3.2 durchgeführt, wobei als Template das jeweilige Gen im pDonor221-Vektor vorgelegt wird. Das PCR-Produkt wird nun mit 1 U des methylenempfindlichen Restriktionsenzym DpnI für 1 h bei 37°C verdaut. Dieses Enzym schneidet nur methylierte DNS, wie sie DNS-Amplifikation durch Bakterien entsteht, nicht jedoch durch PCR-Amplifikation. Nach dem Verdau liegt nur noch mutiertes PCR-Produkt vor, welches in XL1-Blue Zellen transformiert wird. Diese Zellen verfügen über eine Ligase, die die losen Enden des PCR-Produkts schließen kann. Hierdurch liegt der Vektor wieder in zirkulärer Form vor.

4.2.6 Sequenzanalyse

Alle hier verwendeten Konstrukte wurden mittels Sequenzanalyse auf ihre Integrität überprüft. Sämtliche Arbeiten hierzu wurden durch Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, durchgeführt. Die Proben wurden entsprechend der Vorgaben des Dienstleisters aufgearbeitet. Die Analyse erfolgte über die Standardprimer für Sequenzierungen des Vektors M13 forward und reverse in der Weise, dass das gesamte Gen lückenlos analysiert werden konnte. Die Auswertung der digital übermittelten Analyseergebnisse erfolgte mit der Software SerialCloner.

4.2.7 Kontrolle von Klonierungen mittels Sal I-Restriktionsenzymverdau

Nach Klonierungen wurde deren Erfolg durch einen Endonukleaserestriktionsverdau überprüft.

Hierzu wurde entsprechend den Herstellerangaben 1 µl Sal I-Enzym, 2 µl Fast-Digest-Puffer, 1 µg Plasmid-DNS und 15 µl nukleasefreies Wasser auf Eis pipettiert und anschließend bei 37°C für 5 min inkubiert. Danach wurden die entstandenen DNS-Fragmente mittels horizontaler Gelelektrophorese nach ihrer Größe sortiert, wobei in diesem Aufbau die Funktion des Loading-Dye durch den Fast-Digest-Puffer ersetzt wurde (vgl. Kapitel 4.2.4). Die Fragmente wurden mit durch die Software SerialCloner errechnete Größen verglichen und so die Integrität des Plasmids validiert.

4.2.8 Kultivierung von E. Coli-Stämmen

Die Anzucht der E. Coli-Kulturen erfolgte bei 37°C zwischen 8 und 16 h. Dies geschah entweder in einem Brutschrank auf LB-Agar-Platten oder in einem Rundschtüttler in Erlenmeyerkolben oder 15 ml-Gefäßen. Entsprechend dem Resistenzgen, über welches

die Kultur verfügte, wurden Antibiotika (Kanamycin oder Ampicillin) in der Menge 50 mg/ml eingesetzt. Die Ernte erfolgte in einer geeigneten Zentrifuge bei 4000-facher Erdbeschleunigung für 10 bis 15 min.

4.2.9 Glycerinstocks

Zur dauerhaften Lagerung und Archivierung der Bakterienkulturen wurden 0,5 ml Bakteriensuspension mit 0,5 ml steriler 85%-tiger Glycerinlösung vermischt und bei -80°C gelagert.

4.2.10 Transformation chemisch-kompetenter Zellen

Die Transformation, also das Einbringen der jeweiligen Plasmid-DNS, erfolgte in DH5 α - oder XL1-Blue-Zellen mittels Hitzeschock. Hierzu wurden 50 μ l der jeweiligen Bakteriensuspension mit 1 bis 5 μ l der DNS-Lösung vermischt und für 20 bis 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90 sec bei DH5 α -Zellen und 45 sec bei XL1-Blue-Zellen. Es schloss sich eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min an. Danach erfolgte die Zugabe von 200 μ l LB-Medium und die Inkubation für mind. 1 h bei 37°C auf einem Rundschtüttler. Im Anschluss wurde das Gemisch auf eine LB-Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen waren nur Zellen wachstumsfähig, die das Plasmid und somit das Resistenzgen aufgenommen hatten.

4.2.11 Plasmidpräparation

Mittels Plasmidpräparation wurde die benötigte Plasmid-DNS aus zuvor angezüchteten Bakterien isoliert. Dies erfolgte im Allgemeinen über die alkalische Lyse der Zellen mit anschließender Neutralisation des Lysats, welche zu Ausfällung der bakteriellen Eiweiße führt. Nach Abzentrifugation dieser wurde die im Überstand gelöste Plasmid-DNS auf Silikatmembranen gebunden und im Anschluss mit nukleasefreiem Wasser eluiert.

Für Präparationen mit geringer DNS-Ausbeute kam das Peqleeb-Kit und für Präparationen mit großer das Promega-Kit zum Einsatz.

4.2.12 Photometrische Bestimmung der DNS-Konzentration

Mittels des NanoDrop von Thermo Fisher Scientific kann die DNS-Konzentration in 1 μ l Probe durch die Extinktion der DNS bei 260 nm bestimmt werden. Hieraus lässt sich auf Basis des Lambert-Beerschen-Gesetz die Konzentration bestimmen.

4.2.13 Gateway® Cloning

Die Clonierungen wurden gemäß der Protokolle für das Gateway® Cloning Gateway Cloning der Invitrogen/Life Technologies GmbH (Darmstadt) durchgeführt.

Dieses System bietet mittels zweier, voneinander unabhängiger Clonierungsschritte eine Möglichkeit ohne die üblicherweise verwendeten Endonukleasen Vektoren zu klonieren.

Es basiert auf Beobachtungen in den Lambda-Bakteriophagen (Landy, 1989). Diese Viren verfügen über zwei Enzyme (BP-Clonase bzw. LR-Clonase), die zum einen die lysogene BP-Reaktion zum anderen die lytische LR-Reaktion ermöglichen. Zum Abschluss dieser Reaktionen wird noch das Enzym Integration-Host-Factor (IHF) des E. Colis benötigt. Der BP und der LR Clonase™ II Enzym Mix enthält neben der entsprechenden Clonase noch den IHF.

In beiden Reaktionen erkennen diese Enzyme spezifische DNS-Sequenzen, die sog. att-Sites, welche die hier zu clonierende DNS flankieren.

In der BP-Reaktion wird das PCR-Produkt, welches aus den att-Sites attB und der zu clonierende DNS besteht, in einen Vektor (hier pDonor221-Vektor) cloniert, welcher die att-Sites attP enthält. Durch die BP-Clonase wird die zu clonierende DNS an die Stelle eingebaut, die durch die beiden attP-Sites flankiert wird (vgl. Abbildung 6). Hierdurch entstehen in diesem Vektor die attL-Sites und man erhält einen sog. Entry-Clone.

Die LR-Reaktion verläuft analog. Hierbei wird durch die LR-Clonase die zu clonierende DNS aus dem pDonor221-Vektor entlang der attL-Sites ausgelöst und im Destination-Vektor (DEST-Vektor) an die Stelle der attR-Sites eingebaut. Im Destination-Vektor entstehen hierdurch attB-Sites (vgl. Abbildung 7) und man erhält einen sog. Expression-Clone.

BP - Reaktion (lysogen)

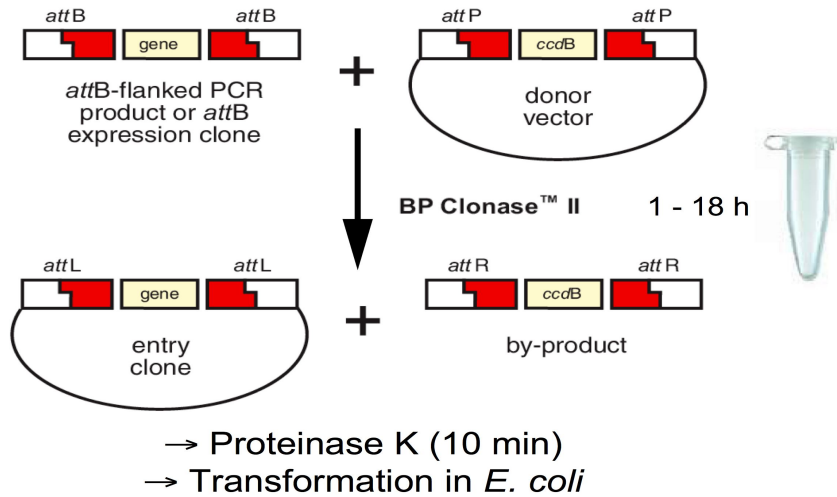


Abbildung 6: BP-Reaktion aus Schatz, 2014, S. 47

LR - Reaktion (lytisch)

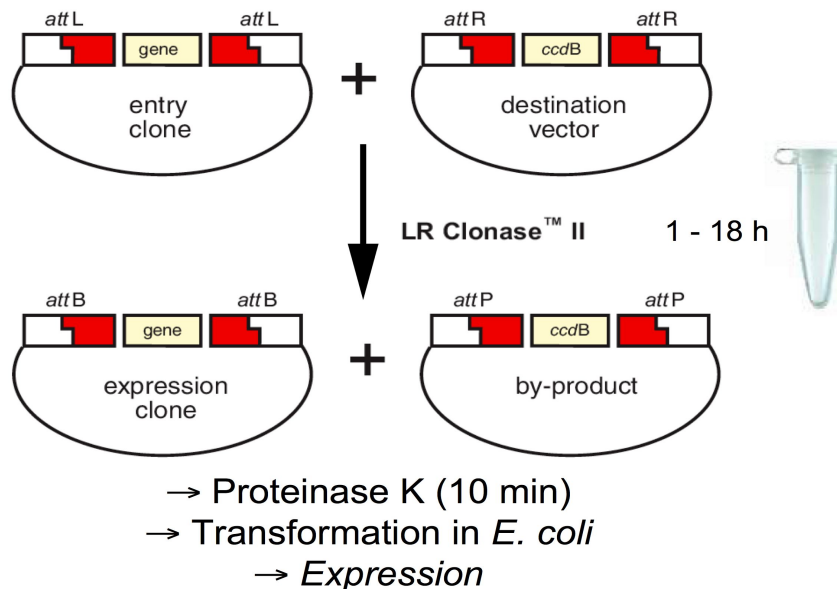


Abbildung 7: LR-Reaktion aus Schatz, 2014, S. 48

4.2.13.1.1 Erstellung der Entry-Clone (BP-Reaktion)

Die Entry-Clone sind Vektoren welche in E. Coli problemlos vermehrt und so in Glycerinstocks archiviert werden können. Sie dienen als Ausgangspunkt für diverse Vektoren, die je nach Fragestellung gewählt werden können. So verfügen sie beispielsweise über YFP- oder V5-Tags und können nach Zielorganismus gewählt werden. Zur Erstellung dieser Clone wird zunächst mittels PCR die zu clonierende DNS mit attB-Sites versehen.

Entsprechend der Herstellerangaben wurden nun 50 fmol des PCR-Produkts gemeinsam mit 150 ng pDonor221-Vektor in 4 µl nukleasefreiem Wasser vermengt. Durch Zugabe von BP Clonase™ II Enzym Mix wurde die Reaktion gestartet und bei 25°C inkubiert. Danach erfolgte die Deaktivierung der BP-Clonase durch Proteinase K bei 37°C, so dann die Transformation des jeweiligen Entry-Clones in DH5α-Zellen.

Zur Ermittlung wie viel DNS in ng 50 fmol entsprechen, wurde folgende Formel gemäß des für das Gateway® Cloning Gateway Cloning der Invitrogen/Life Technologies GmbH (Darmstadt) verwendet:

$$DNS [ng] = Ziel-Menge [fmol] \times Basenlänge \times (660 \text{ fg} / \text{fmol}) \times (1 \text{ ng} / 10^6 \text{ fg})$$

4.2.13.1.2 Erstellung von Expression-Clone (LR-Reaktion)

Wie bereits erwähnt gibt es diverse DEST-Vektoren für unterschiedliche Fragestellungen. Für diese Arbeit wurden die DEST-Vektoren für eukaryote Expression mit V5-, Luciferase oder YFP-Tag verwendet.

Zur Erstellung der Expression-Clone wurde 50 bis 150 ng Entry-Clone zu 150 ng DEST in 4 µl nukleasefreiem Wasser vermengt. Die Reaktion wurde mit 1 µl LR Clonase™ II Enzym Mix gestartet. Erneut erfolgte die Inkubation bei 25°C über Nacht, die Deaktivierung der LR-Clonase mittels 1 µl Proteinase K bei 37°C sowie die Transformation in DH5α-Zellen.

4.2.13.2 Allgemeine Zellkultur

In dieser Arbeit wurden HEK293-Zellen verwendet. Die Anzucht erfolgte in 75 cm² großen Zellkulturflaschen. Zur Ernährung der Zellen wurde DMEM-Medium mit FCS 10% und antibakteriellem sowie antimykotischem Zusatz verwendet. Die Anzucht erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank. Arbeiten an den Zellen wurden unter einer Arbeitsbank mit Laminarströmung erledigt. Alle zwei Tage erfolgte der Wechsel des Mediums.

4.2.13.3 Generationswechsel der Zellen

In der Regel erreichten die Zellen nach zwei Tagen zum Zeitpunkt des Nährstoffwechsel eine Dichte von ca. 80%, die einen Generationswechsel der Zellen nötig machte.

Die adhärent wachsenden Zellen wurden zweimal mit 1 ml und bei 37 °C inkubiertem PBS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsinlösung bei 37 °C für 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Suspension der nun abgelösten Zellen in 8 ml DMEM-Medium. Dies geschah solange bis makroskopisch keine Zellhaufen mehr zu sehen waren. Schließlich erfolgte die Aussaat von 2 ml der Zellsuspension in 8 ml frischem DMEM-Medium und die erneute Inkubation bei 37°C.

4.2.13.4 Vorbereitung der Zellen für die Nukleofektion

Gemäß des Protokolls unserer Arbeitsgruppe für BRET-Experimente wurden für die Transfektion für die BRET-Messungen pro Well einer 96-Well-Platte 400.000 HEK293-Zellen benötigt, somit also 38,4 Millionen für eine gesamte Platte (Schatz, 2014).

Analog zu Kapitel 4.2.13.3 wurde eine Zellsuspension erstellt, diesmal jedoch erst nach Erreichen einer Zelldichte von 85%. Die Zellzahl pro Milliliter wurde nun durch ein Aliquot der Suspension in einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt.

4.2.14 Arbeitsschritte im Rahmen der BRET-Messung

Das in der Arbeitsgruppe verwendete BRET-Verfahren wurde durch S.W. Gersting, A. Lotz, A. Muntau und U. Schatz etabliert und 2012 sowie 2014 publiziert (Gersting et al., 2012; Schatz, 2014).

Da es sich um ein hoch komplexes Verfahren handelt, welches nur geringe Abweichungen zulässt, wurden die Experimente so weit wie möglich nach dem von U. Schatz 2014 veröffentlichtem Protokoll durchgeführt (Schatz, 2014).

4.2.14.1 Hochdurchsatztransfektion am Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System

Die eigentliche Transfektion erfolgte mittels Elektroporation. Spannungspulse machen die Zellmembran permeabel für die zu transfizierende DNS. Hierbei entstehen Poren, welche sich nach einigen Sekunden selbstständig wieder verschließen.

Die Transfektion der HEK293-Zellen erfolgte mit dem Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System.

Wie in Kapitel 4.2.13.3 und 4.2.13.4 wurde nun eine Zellsuspension mit bekannter Zellkonzentration aus HEK293-Zellen hergestellt.

Je 400.000 Zellen pro Well wurden nun mit 20 µl Amaxa-Puffer und 1 µg DNS vermengt. Die DNS bestand aus einer Mischung aus Luciferase-DEST-Vektor und YFP-DEST-Vektor.

Pro Probe wurde auf der Platte immer ein Duplikat aufgetragen.

Das Zell-DNS-Puffer-Gemisch wurde nun im Nucleofector mit dem Programm CM-100 transfiziert. Anschließend wurde diesem phenolrotfreies DMEM-Medium hinzugegeben und 50 µl hiervon auf eine 96-Well-Platte überführt.

Es folgte die Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ für 18 bis 24 h.

4.2.14.2 Hochdurchsatz Detektion des *in vivo* BRET am PHERAstar FS

Von den 96-Well-Platten, die wie unter Kapitel 4.2.14.1 erstellt wurden, wurden nach Inkubation 70 µl des DMEM-Mediums abgenommen.

Die weiteren Schritte erfolgten automatisiert am PHERAstar FS. Es wurde Coelenterazinlösung durch das Gerät in jedes Well injiziert, gefolgt von einer Inkubationsphase. Computergesteuert begann nun die Messung so, dass jedes Well nach der gleichen Inkubationsdauer vermessen wurde.

Dies erfolgte in der Art, dass jeweils das Luciferase-Signal bei 475 nm und das YFP-Signal bei 535 nm gemessen wurde.

Die Messwerte wurden in ein Tabellendokument gespeichert.

4.2.14.3 BRET-Ratio

Wie bereits erwähnt war das Verfahren bereits in der Arbeitsgruppe etabliert. Insbesondere die statistischen und informationstechnologischen Schritte wurden analog der Etablierung bearbeitet (Gersting et al., 2012; Schatz, 2014)

Zur Ermittlung der BRET-Ratio, also dem eigentlichen Indikator einer potentiellen Interaktion, wurden die Messwerte aus der Messung am PHERAstar FS analog der von *Ayoub et al.* vorgeschlagenen Formel berechnet (Ayoub et al., 2002):

$$BRET - Ratio = \frac{535_{Probe}}{475_{Probe}} - \frac{535_{Kontrolle}}{475_{Kontrolle}}$$

Hier steht das Signal 535 für das Luciferasesignal und 475 für das YFP-Signal. „*Probe*“ zeigt an, dass es sich hierbei um die Messung zu untersuchenden Proteine handelt; „*Kontrolle*“ hingegen, dass es sich um die Messung der negativ Kontrolle handelt.

Bei Experimenten dieser Art gilt es zu beachten, dass es auch bei nicht interagierenden Proteinen zufällig zu Energieübertragungen kommt. Dies ist durch die Brownsche Molekularbewegung bedingt. Um diesem Umstand gerecht zu werden, wurde das Signal einer Negativkontrolle vom eigentlichen Meßsignal abgezogen.

Die so erhaltene BRET-Ratio wurde nun noch mit einem im Rahmen der Etablierung des Verfahrens erhobenen internen Schwellenwert abgeglichen. Lag die Ratio darüber, galt die Interaktion als gesichert (Schatz, 2014).

4.2.15 Zellkultur zur Vorbereitung der Western Blot-Experimente

Im Allgemeinen wurde die Zellkultur analog den Schritten unter Arbeitsschritte im Rahmen der BRET-Messung (vgl. Kapiteln 4.2.13.2 und 4.2.13.3) durchgeführt. Insbesondere war dies für die HEK293-Zellen möglich. Die Zellkulturarbeit mit Jurkat-Zellen unterschied sich etwas stärker.

4.2.15.1 Vorgehen bei HEK293-Zellen

Die Schritte erfolgten analog der Punkte in den Kapiteln 4.2.13.2, 4.2.13.3, 4.2.13.4 und 4.2.14.1 für die BRET-Experimente, außer der Inkubationsdauer (hier 48h) und der Zusammensetzung der DNS. In diesem Fall wurden 9 verschiedene Verhältnisse von WASp WT-DNS zu WIP-DNS transfiziert. Hierbei wurde die Summe der transfizierten Gesamtmenge der DNS bei 0,9 µg pro Probe und die transfizierte Menge von WASp WT-DNS konstant bei 0,2 µg pro Probe gehalten. Die Menge von WIP-DNS variierte analog der Tabelle 6, entsprechend wurde auch die Menge von Venus-PAH-V5 angepasst, um die Gesamtmenge zu erreichen. Venus-PAH-V5 wurde gewählt, da es mit einem Molekulargewicht von ca. 51 kDa ähnlich dem von WIP ist.

4.2.15.2 Vorgehen bei Jurkat-Zellen

Im Gegensatz zu HEK293-Zellen sind Jurkat-Zellen Suspensionszellen und somit nicht adhären. Sie wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen in RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % antibakteriellem sowie antimykotischem Zusatz gezogen.

Tabelle 6: Verhältnisse WASp-DNS zu WIP-DNS in den Westerblotexperimenten mit HEK293-Zellen

WASp zu WIP
1:0
1:0,04
1:0,08
1:0,12
1:0,16
1:0,20
1:0,40
1:0,60
1:0,70

4.2.15.2.1 Allgemeine Zellkultur und Generationswechsel

Im Regelunterhalt werden sie alle 7 Tage im Verhältnis 1 zu 10 geteilt. Konkret wurde 1 ml der angezogenen Zellsuspension in 9 ml neuer RPMI-Mediummischung gegeben. Die weitere Anzucht erfolgte analog zu den HEK293-Zellen.

4.2.15.2.2 Vorbereitung der Jurkat-Zellen für die Nukleofektion

200.000 Zellen pro 96-Well bzw. 19,2 Mio. Zellen wurden für eine ganze 96-Well-Platte benötigt. Die Zellsuspension wurde in der 75 cm²-Zellkulturflasche resuspendiert und anschließend wie unter 4.2.13.4 gezählt.

4.2.15.2.3 Transfektion der Jurkat-Zellen am Amaxa™ Nucleofector™ 96-well Shuttle™ System

24 h vor der Transfektion wurden die Jurkat-Zellen im Verhältnis 1 zu 2, wie unter 4.2.15.2.1 beschrieben, geteilt. Am Tag der Transfektion wurden 200.000 Zellen pro Well geerntet und in 20 µl 1M-Puffer resuspendiert. Wegen der schlechteren Transfektionseffizienz der Jurkat-Zellen im Vergleich zu HEK293-Zellen wurde hier eine Gesamtmenge von 6 µg transfiziert. Die eigentliche Transfektion erfolgte analog zu 4.2.14.1 mit Programm CM-100. Danach wurden 80 µl RPMI-Medium in jedes Well gegeben und resuspendiert. Im Anschluss wurden 83,3 µl der Suspension pro Well mit je 6 weiteren Wells in einem Well einer 6-Well-Platte derart zusammengeführt, dass pro 6-Well 1 Mio. Zellen vorlagen.

In jedes der 6-Well wurde im Vorfeld 1,5 ml RPMI-Medium eingefüllt, so dass letztlich 2 ml Medium pro 6-Well enthalten war. Im Anschluß erfolgte die Inkubation für 48 h bei 37°C und 5% CO₂.

Die DNS wurde in den Mischungsverhältnissen WASp-DNS zu WIP-DNS 1 : 0,4 und 1 : 2,5 transfiziert.

Pro WASp-Variante wurden pro Experiment 2 Mio. Jurkat-Zellen in 3 unabhängigen Experimenten transfiziert.

4.2.16 Lyse der Zellen und Herstellung von Elektrophoreseproben

4.2.16.1 Lyse der Jurkatzellen

Die Jurkat-Zellen, welche mit einer Variante transfiziert und entsprechend inkubiert wurden, wurden danach in Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitor resuspendiert und im Anschluss drei Zyklen bestehend aus Einfrieren bei -80°C für 15 min und Auftauen bei 37°C für 90 sec lysiert. Im Anschluss wurden die Zellüberreste mittels Zentrifugation bei 20,000-facher Erdbeschleunigung für 20 min vom löslichen Anteil getrennt. Der Überstand wurde entsprechend Kapitel 4.2.16.3 weiterverarbeitet.

4.2.16.2 Lyse der HEK293-Zellen

Das Medium der Wells wurde vollständig abgenommen, anschließend wurde Lyse-Puffer mit Protease-Inhibitor auf die entsprechenden Wells gegeben und dieser resuspendiert. Um die adhärennten Zellen im Verlauf weiter zu mobilisieren, wurde die 96-Well-Platte auf einer Schüttelapparatur für 15 sec bei 2,500 rpm rotierend geschüttelt. Einer 30-minütigen Inkubation bei 4°C schloss sich ein weiterer dieser Durchmischungsschritte auf der Schüttelapparatur an. Letztlich wurden die 96-Well-Platten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entsprechend Kapitel 4.2.16.3 weiterverarbeitet.

4.2.16.3 Herstellung der Elektrophoreseproben

Der Überstand wurde mit LDS-Puffer und SRA-Lösung entsprechend Herstellerangaben so vermischt, dass sich ein Mischungsverhältnis von Überstand zu LDS-Puffer zu SRA-Lösung von 13 : 5 : 2 ergab. Im Anschluss erfolgte eine thermische Denaturierung bei 95°C für 10 min.

4.2.17 Vertikale Gel-Elektrophorese und Western Blot

Mittels eines elektrischen Felds können Proteine in einem Gel ihrer Größe nach sortiert werden. Hierzu wurde das 10%-Gel in eine vertikale Laufkammer gespannt und vollständig mit elektrisch leitfähigem MOPS-Puffer bedeckt. Weiters wurden die Proben, welche chemisch und thermisch denaturiert und reduziert waren, in Aussparungen (Taschen) dieses Gels eingefüllt. Zusätzlich wurde noch eine adäquate Menge eines Proteingrößenstandards, welcher durch gefärbte Proteine bekannter Größe ein charakteristisches Muster auf dem Gel hinterlässt und damit eine Zuordnung der Laufhöhe zur Größe ermöglicht, aufgetragen. Anschließend wurde eine elektrische Spannung von 200 V für 1,5 h angelegt.

Danach erfolgt das Western Blotting. Hierzu wird das Gel mit den nun nach Größe aufgetrennten Proteinen auf drei Blatt Filterpapier und eine Nitrocellulosemembran gelegt. Auf das Gel kommen nochmals drei Blatt Filterpapier. Alle Bestandteile wurden zuvor in Towbin-Puffer äquilibriert. Nun werden die Proteine im Gel mit 1,5 Ampere pro cm^2 1,5 h auf die Nitrocellulosemembran transferiert.

4.2.18 Immunodetektion der Banden

Nach Transfer der Proteine auf die Nitrocellulosemembran wurde diese in 5 % Blocking-Milch für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schüttelbrett geblockt.

Im Anschluss folgte die Inkubation mit Anti-V5-Antikörper mit einem Mischungsverhältnis von 1 : 1000 und Anti-GapDH-Antikörper Anti-V5-Antikörper in 5 % Blocking-Milch für 16 h. Nach dreimaliger Waschung der Membran in TBS-Puffer für 10 min erfolgte weiters die Inkubation mit Anti-Maus-HRP-Antikörper im Verhältnis 1 : 10 000 für 1 h. Nach erneuter Waschung (s.o.) wurden die V5-Banden und die GapDH-Banden mittels Diana-Photometer vermessen. Als HRP-Substrat kam für die GapDH-Banden ECL-Substrat und für die V5-Banden Femto-Substrat zum Einsatz. Die Detektionszeit betrug für die GapDH-Banden 30 sec., für die V5-Banden zwischen 1 und 3,5 min je nach Signalstärke.

Zuletzt wurde noch eine Aufnahme des Größenstandards bei gedämmtem Raumlicht gemacht.

4.2.19 Quantifizierung der Bandenintensität

Die Intensität oder auch relative Dichte der Banden wurde mittels der Densitometrie-Funktion der Software ImageJ gemäß Entwicklerangaben analysiert.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es ein erweitertes Verständnis über die Auswirkungen der durch Mutationen hervorgerufenen Veränderungen im WAS-Protein auf die WASp-WIP-Interaktion einerseits und daraus resultierenden Auswirkungen auf den Phänotyp andererseits zu erhalten.

Ausgehend von dieser Fragestellung ergab sich die Überlegung, dass nur Mutationen innerhalb der WH1-Domäne einen direkten Einfluss auf die WASp-WIP-Interaktion haben dürften.

Folglich war es nötig zum einen Mutationen dieser Domäne zu untersuchen, da sich hier der vermutete Pathomechanismus zeigen müsste, zum anderen aber auch, Mutationen die nicht in diesem Bereich lagen, um den Gegenbeweis führen zu können.

Daher wurden zunächst Mutationen anhand von Literatur- und Datenbankrecherche ausgewählt und zwar in der Weise, dass sowohl Mutationen innerhalb als auch außerhalb der WH1-Domäne vorhanden waren (Bourne , 2004; de Saint Basile et al., 1996; J. Derry et al., 1995; El-Hakeh et al., 2002; Fillat et al., 2001; Greer et al., 1996; Ho et al., 2001; Imai et al., 2004; Jin et al., 2004; Jo et al., 2003; Kolluri et al., 1995; S. Kwan et al., 1995, 1995; Lemahieu et al., 1999; Proust et al., 2007; Sasahara et al., 2000; Schindelhauer et al., 1996; Thompson et al., 1999; Wengler et al., 1995; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2002). Als Repräsentant des Phänotyps einer Mutation wurden hierbei die jeweiligen WAS-Score-Werte ermittelt.

5.1 Wahl der Mutationen - Literatur- und Datenbankrecherche

Im Rahmen von Literatur- und Datenbankrecherchen wurden insgesamt 12 Mutationen ausgewählt (vgl. Tabelle 7) (Bourne et al., 2004; de Saint Basile et al., 1996; J. Derry et al., 1995; El-Hakeh et al., 2002; Fillat et al., 2001; Greer et al., 1996; Ho et al., 2001; Imai et al., 2004; Jin et al., 2004; Jo et al., 2003; Kolluri et al., 1995; S. Kwan et al., 1995, 1995; Lemahieu et al., 1999; Proust et al., 2007; Sasahara et al., 2000; Schindelhauer et al., 1996; Thompson et al., 1999; Wengler et al., 1995; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 2002).

Hier konnte teilweise auf Vorarbeiten und Daten (BRET-50-Werte) aus der Datenbank der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Die entnommenen Daten wurden im Datensatz Bittner zusammengefasst (vgl. Tabelle A-1).

Insgesamt liegen 7 Mutationen im Genabschnitt, der für die WH1-Domäne codiert. Bei diesen handelt es sich um 6 Missensemutationen (T45M, V75M, R86C, F114I, E133K, A134V) sowie einer Insertion (D121insGD) (Vgl. Abbildung 8).

N-terminal der WH1-Domäne liegt die Deletion H30del und C-terminal davon liegen drei Stoppmutationen (Q185X, R211X, R321X) sowie die Missensemutation L270P. Die meisten Mutationen liegen direkt in der WH1-Domäne (AS 39 bis 148). Die anderen Mutationen verteilen sich über das gesamte Protein.

Von allen WAS-Score-Werten einer Variante wurde jeweils der häufigste mittels der Modus-Funktion ermittelt (vgl. Tabelle 7).

R86C ist mit einem WAS-Score-Wert von 1 und T45M mit einem WAS-Score-Wert von 2 assoziiert. V75M ist mit WAS-Score-Wert von 1 assoziiert, die Spleißmutation D121insGD mit einem WAS-Score von 2. Der WAS-Score-Wert von F114I lag bei 5. Im Weiteren wurde mit E133K eine häufige Mutation mit schwerem Phänotyp (WAS-Score-Wert 3) ausgewählt. Ebenso A134V, diese liegt direkt neben E133K und weist mit einem WAS-Score-Wert von 4 ebenso einen schwereren Phänotyp auf.

N-terminal der WH1-Domäne wurde H30del mit einem WAS-Score von 1 gewählt. Mit laut *Jin et al.* 4,4 Prozent ist R211X die häufigste Stoppmutation, sie ist mit einem WAS-Score-Wert von 4 assoziiert (Jin et al., 2004). Q185X mit einem WAS-Score von 5 endet C-terminal kurz nach der WH1-Domäne, wohingegen R321X mit einem WAS-Score 4 für einen Syntheseabbruch zu Beginn der PPP-Domäne sorgt. Die Mutation L270P verursacht XLN und hat einen WAS-Score von 0 (vgl. Tabelle 7).

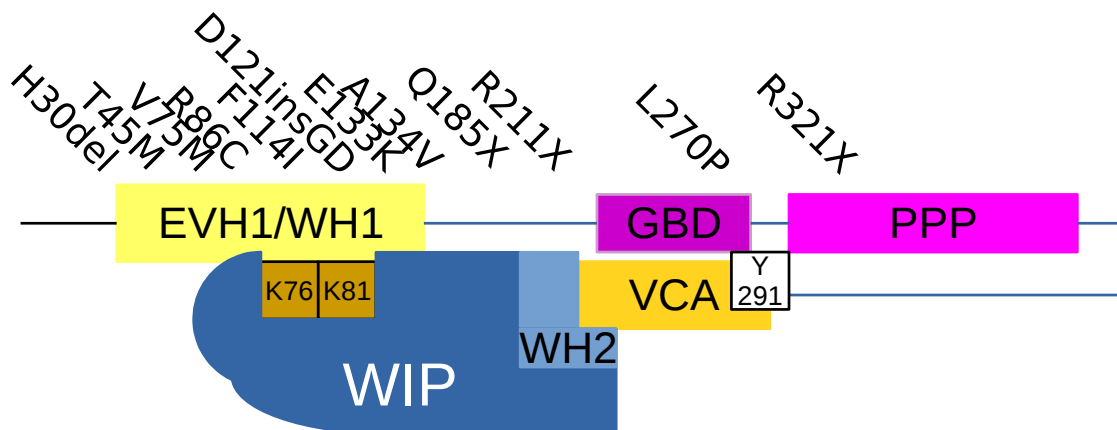


Abbildung 8: Lage der Mutationen im WASp-Modell

EVH1/WH1: WH1-Domäne; GBD: GBD-Domäne; PPP: PPP-Domäne; VCA: VCA-Domäne; K76,K81: Ubiquitinylierungsdomäne des WASp; Y291: Phosphorylierungsstelle des WASp; WIP: WASp-Interacting-Protein; WH2: WH2-Domäne des WIP; (eigene Grafik)

Tabelle 7: Die in dieser Studie verwendeten Varianten von WASp. Von den ausgewählten Varianten sind 5 mit XLT und 6 mit WAS sowie eine mit XLN assoziiert. Unter WAS-Score-Wert ist jeweils der am häufigsten auftretende Wert angeschrieben. Varianten innerhalb der WH1-Domäne sind fett gedruckt.

Varianten in dieser Arbeit	Varianten gemäß der HGVS-Nomenklatur	Phänotyp	WAS-Score- Wert
WT	NM_000377.3(WAS)	-/-	-/-
H30del	NM_000377.3(WAS):c.88_90del (p.His30del)	XLT	1
T45M	NM_000377.3(WAS):c.134C>T (p.Thr45Met)	XLT	2
V75M	NM_000377.3(WAS):c.223G>A (p.Val75Met)	XLT	1
R86C	NM_000377.3(WAS):c.257G>A (p.Arg86His)	XLT	1
F114I	NM_000377.3(WAS):c.340T>A (p.Phe114Ile)	WAS	5
D121insGD	NM_000377.3(WAS):c.361_362insGGAGAT (p.Asp121GlyAsp)	XLT	2
E133K	NM_000377.3(WAS):c.397G>A (p.Glu133Lys)	WAS	3
A134V	NM_000377.3(WAS):c.401C>T (p.Ala133Val)	WAS	4
Q185X	NM_000377.3(WAS):c.553C>T (p.Gln185Ter)	WAS	5
R211X	NM_000377.3(WAS):c.631C>T (p.Arg211Ter)	WAS	4
L270P	NM_000377.3(WAS):c.809T>C (p.Leu270Pro)	XLN	0
R321X	NM_000377.3(WAS):c.961C>T (p.Arg321Ter)	WAS	4

5.1.1 Mutationen innerhalb der WH1-Domäne

Wie unter Kapitel 5.1 beschrieben liegen die meisten der für diese Arbeit ausgewählten Mutationen in der WH1-Domäne, welche für die Physiologie von WASp große Bedeutung hat (vgl. Kapitel 2.3). Daher soll hier nochmals das besondere Augenmerk auf diese Domäne gerichtet werden.

Die Mutationen T45M, V75M, R86C, F114I, D121insGD, E133K und A134V liegen innerhalb der WH1-Domäne, welche WIP bindet.

In Abbildung 9 sind die ursprünglichen Aminosäureresiduen der untersuchten Mutationen rot markiert. F114I und D121insGD liegen direkt in der Bindetasche des WASp-Bindemotivs von WASp. T45M, V75M und R86C liegen benachbart in einem β -Faltblatt, welches an der Bindetasche beteiligt ist, und E133K sowie A134V auf einer α -Helix, welche an diesem Ende nahe der Bindetasche liegt.

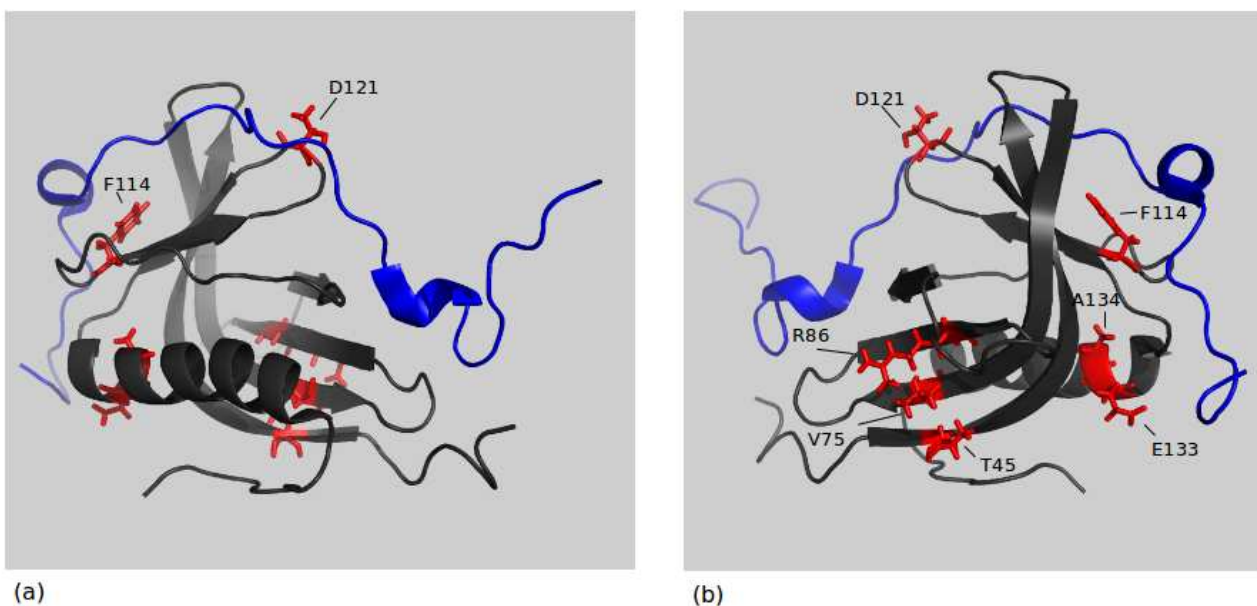


Abbildung 9: WH1-Domäne N-WASp (*Rattus norvegicus*) anthrazit; humanes WASp-Bindemotiv von WIP blau; betroffene Aminosäuren rot. (a) und (b) gleiche Darstellung 180° um die vertikale Achse gedreht. Modell nach Peterson et al., 2007.

5.2 Abhängigkeit der WASp-Menge von WIP-Menge

5.2.1 Die Menge des WASp Wildtyps ist abhängig von der WIP-Menge

Um für die Experimente mit den Mutationen den physiologischen Normalzustand von WASp, in seiner Interaktion zu WIP, näher zu erforschen, wurde zunächst experimentell der Wildtyp in seiner Abhängigkeit von WIP genauer untersucht.

Die Abhängigkeit des WAS-Proteins von WIP ist in der Literatur ausführlich diskutiert worden und darf als gesichert gelten (Blundell et al., 2010; de la Fuente et al., 2007; Massaad et al., 2011; Reicher et al., 2012). Die genaueren Umstände dieser Abhängigkeit, insbesondere inwieweit unterschiedliche Mengen dieser beiden Proteine sich untereinander beeinflussen, sind bislang noch nicht untersucht worden. Daher wurden in dieser Arbeit Zellkulturexperimente durchgeführt, mit denen der Einfluss der Proteinmengen von WASp und WIP zueinander untersucht werden sollte.

Hierzu wurden per Elektroporation HEK293-Zellen mit einer konstanten Menge an WASp-DNS und einer ansteigenden Menge an WIP-DNS in 9 verschiedenen Verhältnissen transfiziert. Um die Gesamtmenge an DNS konstant zu halten und so einen Einfluss unterschiedlicher Menge an DNS auf die Expression zu verhindern, wurde die DNS der Phenylalanin-Hydroxylase (PAH), welche eine ähnliches Molekulargewicht wie WIP hat, in entsprechender Menge ergänzt. HEK293-Zellen wurden gewählt, da sie keine intrinsische Expression von WASp oder WIP aufweisen, welche die Interaktion der beiden Proteine beeinflussen könnte.

Zur Detektion waren beide Proteine mit dem V5-Tag fusioniert und wurden mittels Anti-V5-Antikörper, der gegen das V5-Tag gerichtet ist, detektiert.

Wegen des in etwa gleichen Molekulargewichts der beiden Proteine und somit einer ähnlichen Laufhöhe in der Elektrophorese, wurde WIP N-terminal mit YFP fusioniert. Die nach protokollgemäßer Inkubationszeit durchgeführte Western-Blot-Analyse aus dem Zellysat ergab Banden der markierten Proteine auf den erwarteten Laufhöhen von etwa 55 kDa für WASp-V5 und etwa 80 kDa für YFP-WIP-V5. In insgesamt 3 unabhängigen Experimenten wurden so 24 Datenpaare aus den insgesamt 27 transfizierten Konditionen ermittelt. In den Konditionen ohne WIP-DNS war kein WASp nachweisbar, somit konnte hier kein Verhältnis ermittelt werden.

Es zeigte sich, dass ein Anstieg in der Proteinmenge von YFP-WIP-V5 zu einem Anstieg

der Proteinmenge von WASp-V5 führte (vgl. Abbildung 10). Es ergab sich stets eine zunehmende WASp-Menge mit zunehmender WIP-Menge.

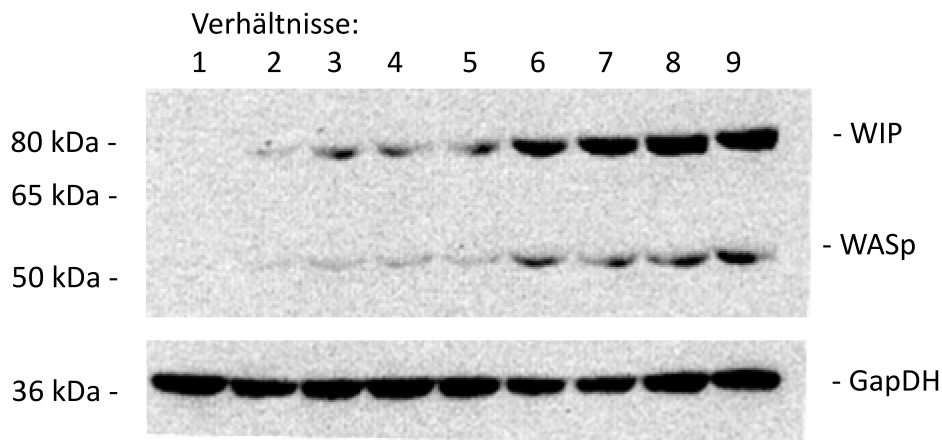


Abbildung 10: Die Western Blot-Analyse zeigt einen Anstieg der WASp-Menge bei einem Anstieg der WIP-Menge. HEK293-Zellen wurden mit einer konstanten Menge WASp WT-DNS und einer ansteigenden Menge WIP-DNS transfiziert, analog der Verhältnisse der Tabelle 6. Die Detektion erfolgte über Anti-V5-Antikörper. Es zeigen sich Banden für YFP-WIP-V5 bei ca. 80 kDa, für WASp-V5 bei 55 kDa. Der Abschnitt mit GapDH wird hier zur besseren Darstellbarkeit geschnitten dargestellt.

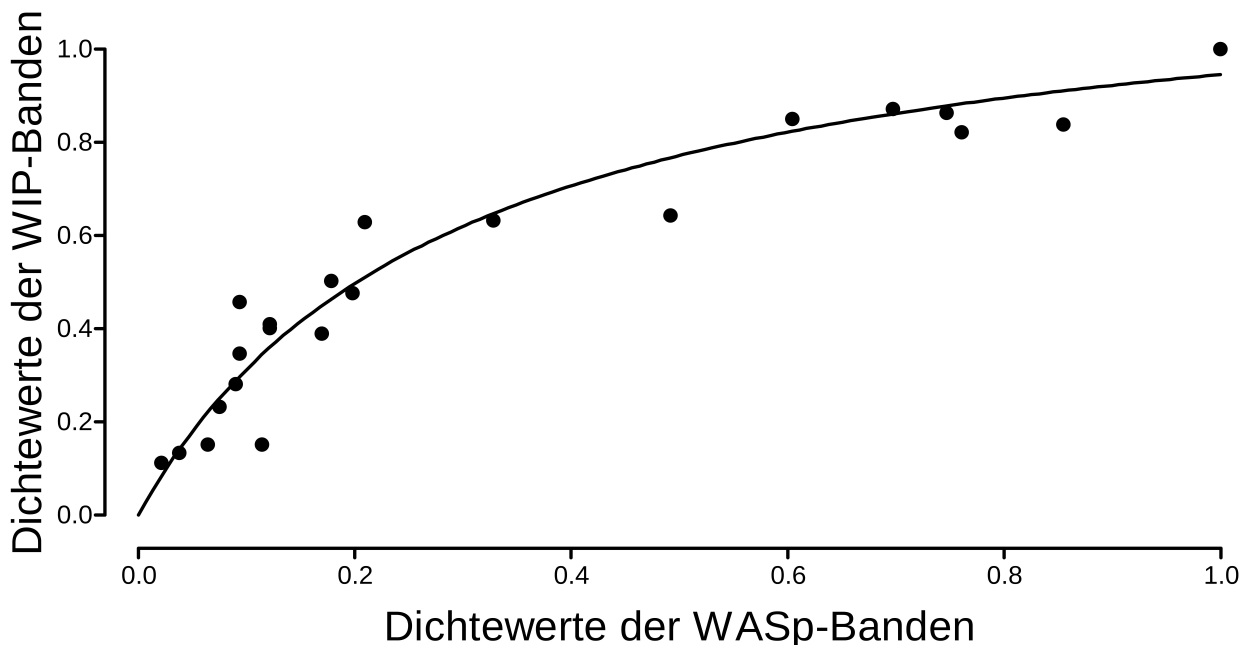


Abbildung 11: Die Dichten der Banden des Western Blots wurden quantifiziert, normiert und statistisch analysiert. Der Anstieg der WASp-Menge zeigte sich gemäß Akaikes Informationskriterium mit 99,96% Wahrscheinlichkeit nicht-linear abhängig von der von WIP.

Im Weiteren wurden die Banden mittels der Software ImageJ densitometrisch analysiert. Die relativen Dichten der WASp- und WIP-Banden wurden jeweils gegeneinander analysiert und in einem Graphen aufgetragen. Dies war möglich, da beide Proteine über den V5-Tag detektiert wurden und so ein Anstieg der jeweiligen Proteinmenge in gleichem Maße auch einen Anstieg der Signalstärke mit sich brachte. Da immer zwei Banden der gleichen Lane verglichen wurden, war eine Normalisierung auf ein zelluläres Markerprotein, wie zum Beispiel GapDH nicht notwendig.

Um die unterschiedlichen Intensitätswerte untereinander vergleichbar zu machen wurden sie jeweils auf den höchsten Wert des jeweiligen Versuchs normiert.

In Abbildung 11 lässt sich ein zu 1 hin hyperboler Kurvenverlauf vermuten. Zur Bestätigung dieser Vermutung wurden nun ein lineares und ein nicht-lineares Modell mit Akaikes Informationskriterium mit der Software Prism verglichen, wobei ein nicht-lineares Modell mit 99,96 % als wahrscheinlicher ermittelt wurde.

Somit ist die Proteinmenge von WASp nicht-linear abhängig von der Menge von WIP, was eine Sättigungskinetik sehr wahrscheinlich macht. Dies erscheint vor dem Hintergrund von Proteinkinetiken plausibel, denn hier erreicht die Komplexbildung einer hyperbolen Kurve folgend ein Plateau.

5.2.2 Die Menge des WASp WT's und der Varianten ist abhängig von der WIP-Menge

Da die Daten des vorherigen Kapitel in HEK293-Zellen, die ihren Ursprung in humanen embryonalen Nierenzellen haben, und nur für den Wildtyp erhoben wurden, schlossen sich Experimente in Jurkat-Zellen, einer humanen Lymphozytenzelllinie, für den Wildtyp und die Varianten an. Hierfür wurden für jede Variante Jurkat-Zellen transient mit einer konstanten Menge an WASp-V5-DNS des Wildtyps und der jeweiligen Variante und zwei verschiedenen Mengen YFP-WIP-V5-DNS transfiziert. Zum einen wurde in Kondition I die 0,4-fache der WASp-DNS an WIP-DNS, zum anderen in Kondition II die 2,5-fache Menge eingesetzt.

Auch hier wurde die Gesamtmenge an DNS pro Probe durch Zugabe von PAH-DNS konstant gehalten. Das Experiment wurde dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die sich anschließende Analyse der Proben im Western Blot über den V5-Tag ergab in jeder Spur Banden mit einer Laufhöhe von etwa 80 kDa, welche YFP-WIP-V5

entsprachen, und in der jeweiligen Spur Banden mit einer Laufhöhe von etwa 55 kDa für Wildtyp und Volllängevarianten, 27 kDa für WASp Q185X, 29 kDa für WASp R211X und 41 kDa für WASp R321X.

Es zeigte sich jeweils ein Anstieg der WIP-Menge im direkten Vergleich der einzelnen Konditionen. Auch in diesem Versuchsaufbau kam es zu einem Anstieg der WASp-Menge durch eine größere WIP-Menge (vgl. Abbildung 12) und zwar für den WT und jede Variante.

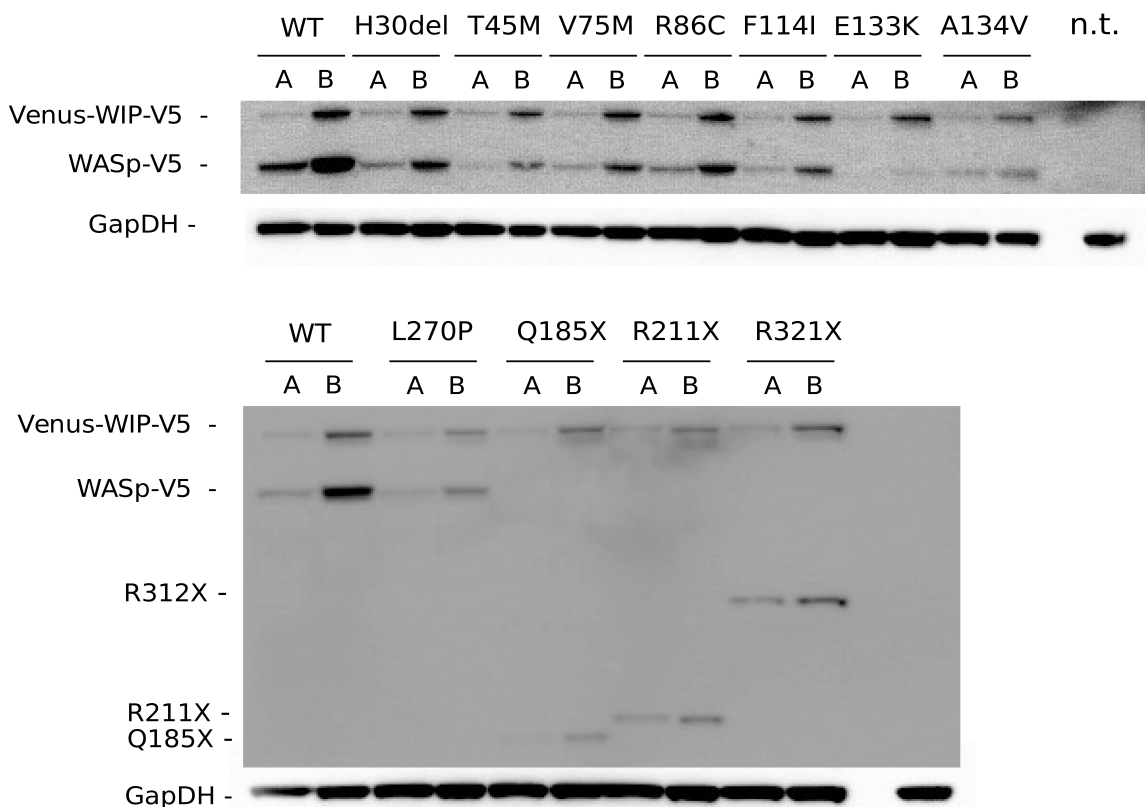


Abbildung 12: Die Western Blot-Analyse zeigt einen Anstieg der WASp-Menge bei einem Anstieg der WIP-Menge. Jurkat-Zellen wurden mit einer konstanten Menge WASp WT-DNS und im Verhältnis dazu einmal mit der 0,4-fachen (A) und einmal mit der 2,5-fachen (B) Menge WIP-DNS transfiziert.

Analog zu den Experimenten aus 5.2.1 erfolgte die densitometrische Analyse mittels der Software ImageJ. Die so ermittelten Dichtewerte der WASp-Varianten der jeweiligen Spur mit höherem WIP-Anteil, also Kondition II, wurden durch den mit niedrigerem Anteil, Kondition I, dividiert, nachdem sämtliche Werte auf den Dichtewert der jeweiligen Banden des konstitutionell exprimierten GapDH normalisiert worden waren.

Hierbei ergab sich für das jeweilige Mengenverhältnis stets ein Wert über 1 und somit eine Zunahme an WASp-Menge (Abbildung 13 und Tabelle 8).

Die drei Mengenverhältnisse des WT's oder einer Variante, die aus unabhängigen Experimenten stammten, zeigten sich in der Regel jeweils untereinander vergleichbar, mit jeweils einer geringen Standardabweichung (vgl. Tabelle 8). Lediglich beim WT und den Varianten T45M, F114I und Q185X war eine höhere Standardabweichung festzustellen. Beim WT und bei T45M zeigte sich insgesamt eine erhöhte Streuung der einzelnen Mengenverhältnisse, bei Q185X lag ein Verhältnis deutlich über den beiden anderen, insbesondere aber die Variante F114I zeigte bei einem Experiment einen Anstieg des Mengenverhältnisses um ca. das 4,8-fache.

Der Vergleich der durchschnittlichen Mengenverhältnisse der einzelnen Varianten untereinander zeigte ein heterogenes Bild. Der WT lag hier bei 2,153. Die höchsten Werte hatten R321X mit einem Verhältnis von 3,015 und F114I 2,252. Der geringste Anstieg der Proteinmenge zeigte sich für E133K mit einem Mengenverhältnis von 1,439. Gefolgt von R86C mit 1,493. Danach kamen V75M mit 1,571, L270P mit 1,614, R211X mit 1,618, Q185X mit 1,654, A134V mit 1,743, T45M mit 1,856 und schließlich H30del 1,959 (vgl. Tabelle 8).

In diesem Bereich ergab sich ein Mittelwert von 1,759. Bei der Berechnung dieses Mittelwerts wurde ein Wert einer Einzelmessung von F114I ausgeschlossen, da dieser einen ungewöhnlich hohen Anstieg aufwies.

Es zeigte sich auch in der Regel eine hohe Korrelation zwischen der WIP-Menge und der WASp-Menge in der mathematischen Auswertung. Einzig die Variante E133K bildete hier eine Ausnahme.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der bereits für den Wildtyp aus HEK-Zellen bekannte Effekt, nämlich eine Proteinmengenerhöhung von WASp durch die von WIP, auch in Lymphozyten gilt und dass auch die Proteinmenge aller Varianten so gesteigert werden kann.

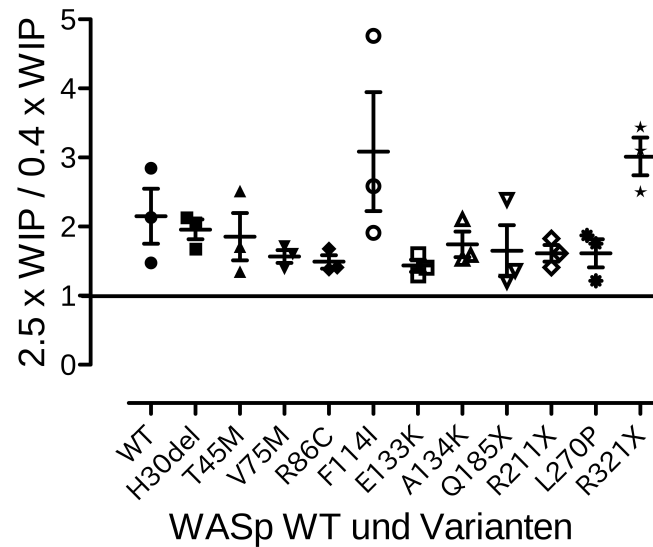


Abbildung 13: Die Dichten der WASp-Banden des Western Blots wurden quantifiziert und der Wert, der Bande mit der 2,5-fachen WIP-Menge, durch den Wert der Bande mit der 0,4-fachen WIP-Menge geteilt. Es ergab sich stets ein Quotient über 1, was einen Anstieg der WASp-Menge anzeigt.

Tabelle 8: Mengenverhältnisse von WASp nach Steigerung der intrazellulären WIP-Menge. In Kondition I wurde die 0,4-fache Menge an WIP-DNS im Vergleich zu WASp-DNS, in Kondition II die 2,5-fache Menge verwendet. Die Messwerte aus Kondition II wurden durch die aus Kondition I geteilt. Schließlich wurde hier der Mittelwert aus den einzelnen Messungen angegeben.

* Es wurde ein Wert von F114I aus der Berechnung ausgeschlossen. Fett gedruckt sind die Varianten innerhalb der WH1-Domäne.

Variante	Durchschnittliches Mengenverhältnis Kondition II zu Kondition I	Standardabweichung	Korrelationskoeffizient n. Pearson
WT	2,153	0,689	0,93
H30del	1,959	0,248	0,90
T45M	1,856	0,595	0,60
V75M	1,571	0,165	0,72
R86C	1,493	0,166	0,82
F114I*	2,252	1,488	0,69
E133K	1,439	0,154	0,47
A134V	1,743	0,319	0,91
Q185X	1,654	0,643	0,67
R211X	1,618	0,206	0,87
L270P	1,614	0,350	0,98
R321X	3,015	0,472	1,00
Durchschnitt WH1-Domäne*	1,759		

5.3 Beeinflussung der relative Bindungsaffinität von WASp zu WIP

5.3.1 Die Bindungsaffinität von WASp zu WIP wird durch Mutation reduziert

Da die meisten bekannten Mutationen des *WAS-Gens* innerhalb der Exons 1 bis 4 liegen, welche für die WH1-Domäne kodieren und diese bekanntlich für die WIP-Interaktion bedeutsam ist, wurde quantitativ der Einfluss dieser Mutationen auf die relative Bindungsaffinität von WASp zu WIP untersucht (Ochs, 2007, 2019).

Dies geschah mittels Bioresonanz-Energie-Transfer-Experimenten (BRET) in HEK293-Zellen. Hiermit ist es möglich Protein-Protein-Interaktionen zu beobachten und in BRET-Sättigungskurven-Experimenten eine relative Bindungsaffinität, den sogenannten BRET50-Wert, zu messen.

Die BRET-Sättigungskurven-Experimente für A134V wurden schließlich gemäß des Protokolls von *Gersting et al.* durchgeführt. Analog dazu waren auch die Experimente zum Datensatz Bittner erhoben worden (vgl. Tabelle A-1).

In drei unabhängigen Experimenten ergab sich ein hyperboler Kurvenverlauf. In Abbildung 14 ist dieser im Vergleich zum WASp WT aufgetragen. Es zeigte sich eine Verschiebung des BRET50-Werts von WASp A134V (1,182) im Vergleich zum WASp WT (0,148) auf der X-Achse nach zu höheren Werten. Dies bedeutet eine geringere Bindungsaffinität.

Der BRET-50-Wert ist zusammen mit denen aus dem Datensatz in Tabelle 9 angeschrieben.

5.3.2 Der BRET-50-Wert von A134V im Vergleich zu den Werten aus der Datenbankrecherche

Die BRET50-Werte der Varianten aus dem Datensatz und den Experimenten erstreckten sich im Verhältnis zum BRET50-Wert des Wildtyps, welcher als Referenz diente, in einem breiten Bereich (vgl. Tabelle 9, Tabelle A-1). So war der Wert von R211X mit 0,146 vergleichbar zum Wildtyp, der Wert von WASp A134V mit 1,182 jedoch mehr als 10-mal so hoch. Die BRET50-Werte benachbarter Mutationen der WH1-Domäne waren vergleichbar, wie etwa WASp V75M und R86C, WASp F114I und D121insGD und WASp E133K und A134V. Interessanterweise waren die Bindungsaffinitäten der Varianten, die nicht in der Lage sind die autoinhibierte Form zu bilden, sei es durch Ermangelung der VCA-Domäne

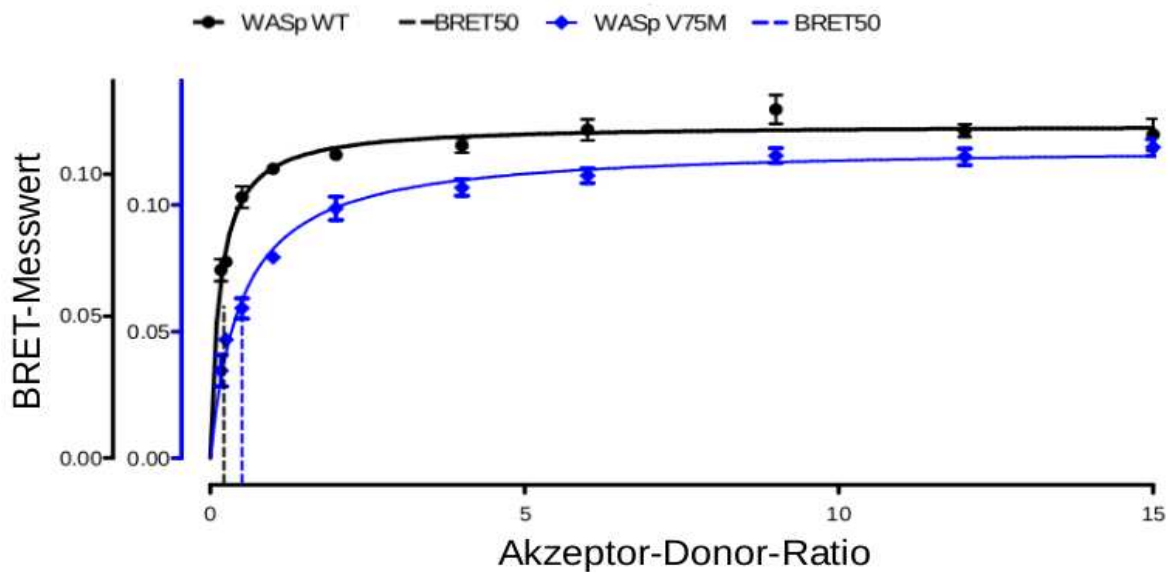


Abbildung 14: Exemplarisch sind hier die Sättigungskurven für WASp WT (schwarz) und WASp A134V (blau) abgebildet. Die Position der halbmaximalen Sättigung auf der X-Achse ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Es besteht eine deutliche Verschiebung der Linie von WASp A134V im Vergleich zur der von WASp WT nach rechts, was eine schwächere Bindung anzeigt.

Tabelle 9: Übersicht über die BRET50-Werte und der dazugehörigen Bestimmtheitsmaße der einzelnen Varianten. Die Varianten innerhalb der WH1-Domäne sind fett gedruckt. * wurde für diese Arbeit experimentell erhoben

Variante	BRET50	Bestimmtheitsmaß
	WIP vs. WASP	
WT	0,148	0,882
H30del	0,568	0,903
T45M	0,241	0,814
V75M	0,493	0,955
R86C	0,587	0,952
F114I	0,697	0,954
D121insGD	0,535	0,904
E133K	0,949	0,863
A134V*	1,182	0,921
Q185X	0,210	0,918
R211X	0,146	0,754
L270P	0,278	0,924
R321X	0,262	0,846

(Q185X, R321X) oder durch Veränderung der GBD-Domäne (L270P), etwas schwächer als die des Wildtyps, obwohl sie in der WH1-Domäne unverändert waren. Einzig R211X zeigte hier einen Wert vergleichbar zum Wildtyp. Es zeigte sich, dass die unterschiedlichen Mutationen die Bindungsaffinität des jeweiligen Proteins zu WIP beeinflussen, auch für solche die in der WH1-Domäne nicht verändert waren.

Es lässt sich somit festhalten, dass die WASp-WIP-Interaktion sehr sensibel auf durch Mutationen bedingte konformationelle Veränderungen innerhalb von WASp reagiert.

5.3.3 Die Bindungsaffinität von WASp zu WIP wird nicht durch die WIP-Isoform beeinflusst

Da vier verschiedene Isoformen und diverse SNPs von WIP bekannt sind, stellte sich die Frage, ob die Bindungsaffinität von der Isoform oder dem Vorhandensein von SNPs beeinflusst wird (NCBI Gene - WIPF1, 2016).

Hierzu wurden exemplarisch WIP Isoform 1 (NM_001077269.1) und WIP Isoform 3 N119D, L198P (NM_001375835.1(WIPF1): p.Asn119Asp+Pro198Leu), analog zu den Experimenten in obigem Teilkapitel, bei denen letztere verwendet wurde, untersucht.

Isoform 1 sowie auch Isoform 3 N119D, L198P hatten eine vergleichbare Bindungsaffinität zu WASp, nämlich von durchschnittlich 0,153 respektive 0,148 (vgl. Abbildung 15). Diese

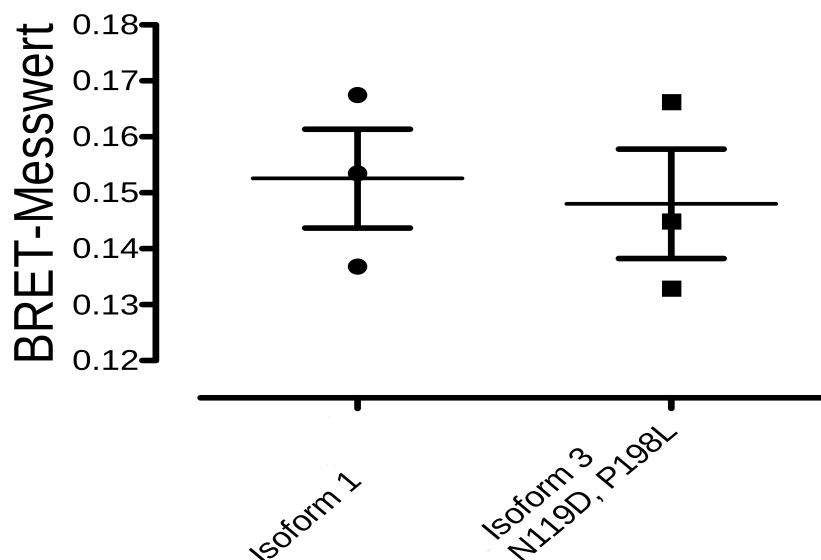


Abbildung 15: Vergleich der Bindungsaffinitäten der WIP Isoform 1 und der Isoform 3 N119D, P198L. Diese in drei unabhängigen Experimenten durchgeführte Studie ergab keinen signifikanten Unterschied in den Affinitäten.

in drei unabhängigen Experimenten durchgeführte Studie ergab in der statistischen Auswertung mit der Software Prism keinen statistisch signifikanten Unterschied im t-Test der Affinitätswerte.

5.4 Korrelation zwischen Bindungsaffinität und WAS-Score

Aus den vorhergegangenen Experimenten ist ersichtlich und aus der Literatur bekannt, dass die Interaktion zwischen WASp und WIP wichtig für die Proteinmenge von WASp ist (de la Fuente et al., 2007; Massaad et al., 2011). Auch ist aus Publikationen von *Jin et al.* und *Imai et al.* bekannt, dass die WASp-Menge wichtig für den Phänotyp ist (Imai et al., 2004; Jin et al., 2004). Daher wurde analysiert, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen den gemessenen relativen Bindungsaffinitäten und dem jeweiligen Phänotyp, hier repräsentiert durch den WAS-Score, besteht.

Da das WAS-Score-System ordinal skaliert ist, musste hier eine Rangkorrelation wie der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet werden. Es erfolgte die Analyse jeweils getrennt für die Varianten innerhalb und außerhalb der WH1-Domäne.

Die statistische Auswertung der 7 Varianten mit Software Prism innerhalb der WH1-Domäne ergab einen Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten von 0,764, was einer positiven Korrelation entspricht, die mit einem P-Wert von 0,048 signifikant ist (vgl. Abbildung 16 (a)). Eine schwächere Bindung geht daher mit einem schweren Phänotyp einher.

Die Analyse der 5 Varianten außerhalb dieser Domäne ergab einen Spearmans Rangkorrelationskoeffizienten von -0,316 und war nicht signifikant (vgl. Abbildung 16 (b)). Hieraus ließ sich somit keine sinnvolle Aussage ableiten.

Bei der Berechnung beider Korrelationskoeffizienten wurden die Varianten F114I und Q185X nicht berücksichtigt, da der WAS-Score-Wert von 5 unabhängig vom Ausgangswert vergeben wird, sobald eine Autoimmunerkrankungen oder maligne Neoplasie vorliegt.

Die statistische Auswertung zeigt eine deutliche Korrelation zwischen Bindestärke von WASp und WIP und Klinik für die Mutationen innerhalb der WH1-Domäne.

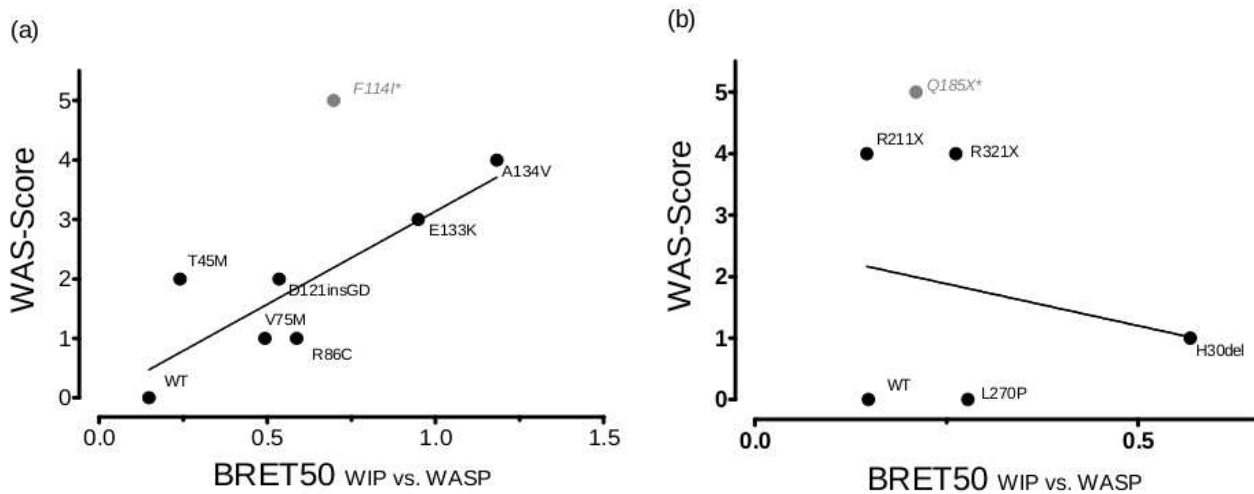


Abbildung 16: Die X-Achse bildet die Bindungsaffinität (BRET50) ab, die Y-Achse den WAS-Score. * F114I und Q185X sind mit einem WAS-Score von 5 assoziiert daher wurden sie bei der Berechnung der Korrelation nicht berücksichtigt. Die Linien sollen nur den Trend verdeutlichen und stellen keine lineare Regression dar. (a) Der Korrelationskoeffizient zwischen den BRET-50-Werten der Mutationen innerhalb der WH1-Domäne und der jeweiligen WAS-Score-Werte betrug 0,764 mit einem P-Wert von 0,048. (b) Der Korrelationskoeffizient für die Varianten außerhalb dieser Domäne war -0,316 und nicht signifikant.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für WASp und 12 seiner Varianten Daten in ihrer Interaktion mit WIP erhoben. Dies gelang über Western-Blot sowie BRET-Experimente. Anschließend wurden die erhobenen Daten mit Daten aus Datenbanken und Literatur in Zusammenhang gesetzt und statistisch ausgewertet.

Es gelang – analog zur Fragestellung – eine Veränderung der WASp-Homöostase durch Mutationen des WAS-Gens (1) festzustellen, diese Veränderung in Bezug auf die WASp-WIP-Interaktion (2) zu analysieren sowie nach assoziativer und statistischer Auswertung der Ergebnisse eine Korrelation zwischen dem Phänotyp und der veränderten WASp-WIP-Interaktion (3) zu zeigen.

Diese zugrundeliegenden Ergebnisse sollen im folgenden Abschnitt diskutiert werden.

6.1 Auswahl der Mutationen

Durch die Sequenzierung des WAS-Gens bei Patienten, bei denen sich der Verdacht auf Wiskott-Aldrich-Syndrom stellt, ist eine Vielzahl von Mutationen und deren Lage im Gen bekannt.

Zur Klärung ob Mutationen, die für die WH1-Domäne codieren, die WASp-WIP-Interaktion verändern, wurden insgesamt 12 Mutationen untersucht, welche sowohl innerhalb als auch außerhalb dieser Domäne liegen.

Unter dieser Prämisse wurde in entsprechender Literatur und in Interaktionsdatenbanken recherchiert. Unsere Arbeitsgruppe verfügt über eine Datenbank mit Interaktionsprofilen diverser Proteine.

Als Ergebnis groß angelegter Interaktionsstudien waren in dieser Datenbank bereits Daten von WASp und sechs seiner Interaktionspartner, wie VASP, TRIP10 sowie WIP, verfügbar.

Diese wurden bezogen auf die Fragestellung dieser Arbeit untersucht und konnten teilweise für diese Arbeit verwendet werden. Sie wurden in einem Datensatz zusammengefasst (vgl. Tabelle A-1).

Hierzu wurden Daten zur WASp-WIP-Interaktion, d.h. BRET-50-Wert, des WASp WT und elf seiner Varianten zu WIP entnommen. Im Rahmen von Recherchen konnte für diese Varianten entsprechende WAS-Score-Werte gefunden und um weitere ergänzt werden (Bourne et al., 2004; de Saint Basile et al., 1996; J. Derry et al., 1995; El-Hakeh et al.,

2002; Fillat et al., 2001; Greer et al., 1996; Ho et al., 2001; Imai et al., 2004; Jin et al., 2004; Jo et al., 2003; Kolluri et al., 1995; S. Kwan et al., 1995, 1995; Lemahieu et al., 1999; Proust et al., 2007; Sasahara et al., 2000; Schindelbauer et al., 1996; Thompson et al., 1999; Wengler et al., 1995; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 1997).

Zur Erstellung der weiteren Varianten von WASp und WIP sowie deren experimentelle Auswertung wurden analog der in der Datenbank gelisteten Experimente verfahren.

Des Weiteren wurden die jeweiligen WAS-Score-Werte zusammengefasst und statistisch mittels der Modus-Funktion ausgewertet. Hierdurch war es möglich immer den WAS-Score-Wert zu ermitteln, der am häufigsten bei den jeweiligen Patienten auftrat. Die Verwendung der Modus-Funktion war nötig, da der WAS-Score ordinal skaliert ist. Hier kann es nur ganze Zahlen geben, Dezimalbrüche wie sie durch die Mittelwertfunktion entstehen würden, sind definitionsgemäß nicht zulässig.

Der ermittelte Modus-Wert der jeweiligen Mutation wird im Folgenden als WAS-Score-Wert der jeweiligen Mutation bezeichnet.

Auch wenn es in dieser Arbeit vorrangig um mögliche Veränderungen in der WASp-WIP-Interaktion, vermittelt durch die WH1-Domäne, ging, sollte den häufigsten Mutationen Rechnung getragen werden. Die Mutation R86C wurde als Vertreter des Mutationslocus R86 ausgewählt, der mit 7,5 Prozent gemäß *Jin et al.* am häufigsten überhaupt betroffen ist (Jin et al., 2004). Im Bereich der WH1-Domäne folgt T45M mit 3,1 Prozent. Da diese beiden mit XLT assoziiert sind, wurden F114I, E133K und A134V, die mit WAS assoziiert sind, ergänzt, um der unterschiedlichen Klinik entsprechend Rechnung zu tragen und diese auf molekularer Ebene zu betrachten. D121insGD sollte als Repräsentant der Insertionen dienen und deren Einfluss abbilden. Die Lage der Mutationen ist in Abbildung 8 aufgeführt.

Um die Veränderung von Varianten, die außerhalb der WH1-Domäne liegen, auf die WASp-WIP-Interaktion zu untersuchen, wurden H30del, Q185X, R211X, L270P und R321X ausgewählt. Die Variante R211X ist laut *Jin et al.* mit 4,4 Prozent aller Mutation die häufigste Mutation, die zu einem Syntheseabbruch führt (Jin et al., 2004).

Es bleibt zu erwähnen, dass die hier analysierten 12 Mutationen der Vielzahl der bekannten WAS-Mutationen nicht gerecht werden und hierdurch Zusammenhänge nicht erschöpfend erfasst werden können. Es wäre wünschenswert, dass die in dieser Arbeit erhobenen Daten in einer größer angelegten Studie vollumfänglicher betrachtet werden.

6.2 Western Blots

Es ist bekannt, dass WASp mit WIP interagiert und dass die Menge des WASp von dessen Interaktion mit WIP abhängt. Letzteres übt eine abbauhemmende Wirkung auf WASp aus, indem es dessen Ubiquitylierungsdomäne maskiert (Reicher et al., 2012). Diese protektive Wirkung wurde mittels Überexpression auch für einige WASp-Varianten gezeigt (Massaad et al., 2011). Die Interaktion führt folglich zu einer erhöhten intrazellulären Menge an WASp.

Diese Bedeutung der WIP-Interaktion für die Menge an WASp ließ einen direkt-quantitativen Zusammenhang zwischen der WASp-Menge und der von WIP vermuten. Dies wurde mittels der Western-Blot-Methode untersucht, die bei der Analyse von Proteinexpression und -menge als Goldstandard gilt.

6.2.1 Das Western-Blot-Verfahren in dieser Arbeit

Für die Experimente wurden transient HEK293- und Jurkat-Zellen mit der jeweiligen DNS transfiziert. Um eine sichere Expression zu gewährleisten wurden die jeweiligen WASp-Varianten in einen DNS-Vektor kloniert, der mit EF1- α einen starken Promoter enthält und schon in früheren Veröffentlichungen zu diesen Proteinen verwendet wurde (Massaad et al., 2011). WIP wurde in einen Vektor mit CMV-Promoter kloniert, der ebenfalls zu einer starken Expression führt. Hieraus resultiert eine Überexpression, die unabhängig von regulierenden intrazellulären Mechanismen für eine große Menge des jeweiligen Proteins sorgt.

Durch die Überexpression ist dieses Vorgehen allerdings weniger geeignet physiologische Prozesse, wie etwa Signalkaskaden, in der Zelle zu untersuchen.

Hier allerdings lag das Augenmerk auf der Interaktion von WASp und WIP sowie insbesondere der damit verbundenen abbauhemmenden Wirkung auf WASp. Dieser Aspekt wird durch Überexpression begünstigt, da eine Interaktion wahrscheinlicher wird.

Um eine hohe Expression zu erreichen ist neben der Wahl eines starken Promoters die Wahl der Transfektionsmethode entscheidend. Daher wurde hier eine Sonderform der Elektroporation, die Nucleofection, gewählt. Diese bietet je nach Zelllinie eine Effizienz von bis zu 90% (Gresch et al., 2004).

Mit der Durchflusszytometrie wurde von *Massaad et al.* eine andere Methode angewandt, die eine Bestimmung der intrazellulären Proteinmenge ermöglicht (Massaad et al., 2011).

In dieser Arbeit konnte eine Erhöhung des intrazellulären WASp durch WIP-Überexpression gezeigt werden. Dies gelang ihm für die Varianten R86H und A134T, also Varianten, deren Loci mit R86C und A134V auch in dieser Arbeit untersucht wurden. Hierbei wurden die Expressionslevel von WASp innerhalb einer Zelle mittels gegen WASp gerichtete mit Fluoreszenzfarbstoff markierte Antikörper durchflusszytometrisch vermessen.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die Menge zweier Proteine untersucht werden. Hier bot die Western-Blot-Methode den Vorteil, dass durch die Größenauffrennung der Proteine während der Elektrophorese, diese beiden, klar voneinander getrennt, analysiert und quantifiziert werden konnten. Im Gegensatz dazu kann es bei der Quantifizierung der Proteinmenge zweier Proteine in der Durchflusszytometrie dazu kommen, dass durch wechselseitige photochemische Anregung der hierbei verwendeten Fluoreszenzmarker die Mengen falsch eingeschätzt werden.

Auch ist es mit der Western-Blot-Methode nicht möglich, einzelne Zellen zu vermessen. In dieser Arbeit sollte jedoch der Einfluss zweier Proteine auf die jeweilige Proteinmenge analysiert werden.

Unter Berücksichtigung der Fragestellung, wie die WIP-Menge die WASp-Menge intrazellulär beeinflusst, erscheint das Western-Blot-Verfahren hier geeignet und die Limitationen durch Überexpression vertretbar zu sein.

6.2.2 Western-Blot-Analyse des WASp Wildtyps und seiner Varianten

In den Western-Blot-Experimenten in HEK293-Zellen wurde ermittelt wie die Menge des WASp Wildtyps von Menge des WIP's abhängt. In einem ähnlichen Versuchsaufbau wie bei den BRET-Sättigungsexperimenten wurden die Verhältnisse von WASp DNS zu WIP-DNS variiert und zwar jeweils so, dass von Probe zu Probe der WIP-Anteil anstieg (vgl. Kapitel 5.3 und Kapitel 6.3, Tabelle 6). In den BRET-Sättigungsexperimenten wurde der Anteil des Akzeptorkonstrukts WIP-YFP, in den Western-Blot-Experimenten der Anteil des YFP-WIP-V5 erhöht. In der Theorie beider Designs soll so eine Sättigungskinetik, vergleichbar einer Michaelis-Menten-Kinetik, nachempfunden werden. Die cytosolische Lokalisation von YFP-WIP konnte durch *Fried et al.* gezeigt werden (Fried et al., 2014).

Um dies zu überprüfen, wurden die aus den Western-Blots ermittelten densitometrischen Messwerte in ein Koordinatensystem übertragen und mathematisch analysiert (vgl. Abbildung 11).

In der Analyse mittels Akaikes Informationskriterium war eine nicht-lineare Abhängigkeit zwischen dem WASp Wildtyp und WIP mit 99,96% wahrscheinlicher als eine lineare. Die nicht-lineare Abhängigkeit spricht für eine Sättigungskinetik der beiden Proteine und zeigt, dass die WASp-Menge direkt von der Interaktion mit WIP abhängig ist.

Diese Experimente wurden in HEK293-Zellen durchgeführt. Hierbei handelt es sich um humanen Nierenzellen, die endogen weder WASp noch WIP exprimieren und ermöglichten es somit, eine weder durch endogenes Protein, noch durch etwaige Feedbackmechanismen beeinflusste Beobachtung des Zusammenspiels von WASp und WIP.

Um Limitationen durch das Fehlen der natürlichen Umgebung der Proteine zu entgegnen, wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau in der Lymphozytenzelllinie Jurkat wiederholt.

Diese Zellen exprimieren allerdings endogen WASp und WIP, welches wiederum auch mit den transient exprimierten Varianten interagiert könnte.

Ein somit möglicher abbauhemmender Einfluss des endogen exprimierten WIP auf die Menge des transfizierten WASp fällt aber wohl nicht ins Gewicht, da die Menge der jeweiligen WASp-DNS in beiden Konditionen konstant gehalten wurde und sich trotzdem ein Anstieg des jeweiligen WASp zeigen ließ. Auch würde diese abbauhemmende Wirkung ebenfalls nur zeigen, dass ein Mehr an WIP ein Mehr an WASp bedeutet, unabhängig von dessen Ursprung.

Lymphozyten allerdings weisen im Allgemeinen eine schlechte Transfektionseffizienz auf. Nach Optimierungsversuchen konnte jedoch ein Setup der Nucleofection gefunden werden, das gute Ergebnisse lieferte. Die Optimierung ergab einen im Vergleich zu HEK293-Zellen deutlich erhöhten Zellbedarf (6 Millionen zu 0,4 Millionen), daher wurden pro Variante und Experiment lediglich zwei Konditionen erstellt. Für die erste Kondition wurde die 0,4-fache Menge WIP-DNS im Vergleich zu WASp-DNS transfiziert, für die zweite Kondition die 2,5-fache Menge. Diese Unterschiede in der WIP-Menge spiegelten sich, analog der Experimente in HEK-Zellen, auch hier in der Menge beider Proteine wieder. Ein Anstieg der WIP-Menge resultierte in einem Anstieg der Menge aller getesteten WASp-Varianten.

Wie bei den Experimenten in HEK-Zellen war es auch hier aus mehreren Gründen nötig die beiden Proteine über den V5-Tag zu detektieren. Zum einen weil ein direkt gegen

WASp oder WIP gerichteter Antikörper auch das endogene WASp angezeigt hätte, zum anderen, weil die Proteinmengen nach densitometrischer Vermessung direkt miteinander verglichen werden sollten. Im ersten Fall wären Mengen überschätzt worden, im zweiten Fall hätten Eigenschaften der spezifischen Antikörper den direkten Vergleich erschwert.

In weiteren Experimenten nach diesem Versuchsaufbau wäre es informativ wie sich die Expression der endogenen Proteine verhält.

Durch den binären Aufbau dieser Experimente konnte zwar keine Interaktionsdynamik beobachtet werden, allerdings wurde für den Wildtyp und jede Variante im Vergleich beider Konditionen ein Anstieg der WASp-Menge festgestellt (vgl. Abbildung 12, Abbildung 13 und Tabelle 8). Dieser Anstieg konnte mittels Korrelationsanalyse nach Pearson bestätigt werden. So zeigte der Korrelationskoeffizient für alle Varianten einen positiven Zusammenhang. Dies relativiert auch die höhere Standardabweichung mancher Varianten, da es in jedem Replikat zu einem Anstieg der Proteinmenge kam und somit die abbauhemmende Wirkung von WIP auf die WASp-Varianten gezeigt werden konnte.

Eine Limitation im Vergleich zu den Experimenten mit dem WASp-Wildtyp in HEK293-Zellen war bei diesem Aufbau, dass es hier nur 2 Messpunkte pro Replikat gab. Diese stellten jeweils nur einen Teilabschnitt der hyperbolen Kurve da.

In diesen Experimenten sollte jedoch nur überprüft werden, ob ein mehr an WIP, ein mehr an WASp mit sich bringt. Daher wurde davon ausgegangen, dass dieser Teilabschnitt annähernd linear verläuft und es wurde auf eine Korrelation mittels Pearsons Korrelationskoeffizient getestet.

Da, wie oben erwähnt, ein quantitativer Zusammenhang zwischen der WASp- und WIP-Menge als gesichert gelten kann, wird dieser beim Versuchsaufbau der Experimente mit den Mutationen durch einen positiven Korrelationskoeffizienten gezeigt.

Beim Wildtyp lag der Durchschnitt der Messwerte bei 2,153. Im Verhältnis dazu lag der durchschnittliche Wert aller Varianten mit veränderter WH1-Domäne bei 1,759. Dies erscheint erklärlich, wenn man berücksichtigt, dass zum einen die Bindungsaffinität des Wildtyps zu WIP am höchsten und somit der Schutz vor Abbau schon bei geringen WIP-Mengen gegeben ist. Zum anderen kann ein Austausch von Aminosäuren zu einer Veränderung in der intrinsischen Stabilität des Proteins an sich führen können, welche bei den Varianten unabhängig von der WASp-WIP-Interaktion zu einer erhöhten Abbaurate führen könnte.

Bei der Berechnung dieses Mittelwerts wurde ein Einzelwert der Variante F114I herausgenommen. Dieser lag mit 4,761 mehr als das Zweifache über dem Mittelwert der restlichen Wert von F114I und war knapp dreimal so groß wie der Mittelwert aller Varianten innerhalb der WH1-Domäne.

Die Limitation durch diesen Extremwert wird durch die Korrelation von 0,69 etwas relativiert. Auch wenn sie keine Erklärung für die Ursache dieses Werts liefert, zeigt sie jedoch, dass ein Anstieg an WIP auch bei dieser Variante für einen Anstieg an WASp führt.

Wie bereits erwähnt lag das durchschnittliche Mengenverhältnis der Varianten mit Veränderungen in der WH1-Domäne, also T45M, V75M, R86C, E133K sowie A134K bei 1,759 und somit unter der des Wildtyps. Auch zeigte sich für diese Varianten eine positive Korrelation. Einzig der Korrelationskoeffizient von E133K lag bei 0,47. Dies zeigt zwar auch einen Anstieg des Proteins, sollte aber auch Grund zur genaueren Untersuchung dieser häufigen Variante geben.

Bei der Variante H30del, die an der WH1-Domäne unverändert ist, erklärt möglicherweise eine sterische Änderung nahe der Domäne, dass der durchschnittliche Wert mit 1,959 leicht unterhalb des Wildtyps liegt.

Die ebenfalls in der WH1-Domäne unveränderten Varianten Q185X, R211X und L270P mit dem jeweiligen Mengenverhältnis 1,654, 1,618 und 1,614 liegen recht nahe am durchschnittlichen Mengenverhältnis. Dies kann zum einen durch den Wegfall des autoinhibierten Zustands erklärt werden, der einen Abbau ebenfalls verhindert und den die Varianten der WH1-Domäne noch ausbilden können (Kim et al., 2000), zum anderen stabilisiert die autoinhibierte Form auch die WASp-WIP-Interaktion (Fried et al., 2014)

Im Gegensatz dazu fällt hier die ebenfalls in der WH1-Domäne unveränderte Variante R321X auf. Sie zeichnet sich durch das insgesamt größte Mengenverhältnis von 3,015 aus. Diese Variante, welche fast der Volllänge entspricht, aber die zur Autoinhibierung nötige Domäne vermissen lässt, muss somit permanent aktiv sein. Eventuell kommt es ab einer gewissen Anzahl an katalytischen Domänen, die normalerweise durch die autoinhibierte Form verborgen liegen, zur Aktivierung von intrazellulären Mechanismen, die einen Abbau verhindern.

Auch für die Varianten außerhalb der WH1-Domäne zeigten die Korrelationskoeffizienten einen Anstieg der WASp-Menge im Verhältnis zu WIP.

Dies unterstützt die Ergebnisse der Experimente in Jurkatzellen und die Beobachtung, dass auch die WASp-Varianten durch die WIP vor dem Abbau geschützt werden.

Es gelang nicht die Variante D121insGD in den V5-Vektor zu klonieren. Wegen des klaren Einflusses von WIP auf alle anderen Varianten in dieser Arbeit und des Ergebnisses der BRET-Sättigungsexperimente (vgl. Kapitel 5.3.1) für diese Variante, welche sich gut in die Werte der anderen einfügt, erschien es vertretbar auf diese in den Western-Blot-Experimenten zu verzichten.

Die Mengenverhältnisse ließen keinen Vergleich zu den WAS-Score-Werten der jeweiligen Variante zu. Dies könnte darin begründet sein, dass es sich um Überexpression handelt und dadurch physiologische Zusammenhänge, die zur Ausprägung des Phänotyps führen, behindert werden.

Um dies genauer zu untersuchen wäre es in zukünftigen Versuchsaufbauten hilfreich zumindest das WASp-Protein unter seinem natürlichen Promoter zu exprimieren.

Abschließend aber lässt sich festhalten, dass die Bindung von WIP an WASp einer Sättigungsinteraktion folgt und dass auch für die in dieser Arbeit untersuchten Varianten ein Mehr an WIP auch zu einem Mehr an WASp führt.

Die Ergebnisse der Veröffentlichung, in der mit einer anderen Methoden gearbeitet wurde, und die Ergebnisse in dieser Arbeit sind miteinander vereinbar (Massaad et al., 2011). Somit erscheint der Anstieg der Proteinmenge der hier untersuchten WASp-Varianten durch den Anstieg an WIP plausibel und es macht eine Oligomerisierungskinetik sehr wahrscheinlich. Zur genaueren Analyse der Kinetik der Varianten mit WIP wurden BRET-Experimente angeschlossen bzw. analysiert.

6.3 BRET-Experimente

Wie im vorherigen Abschnitt experimentell gezeigt und anhand von Literatur erläutert wurde, ist die Bindung von WIP an WASp für die Menge an WASp essentiell (de la Fuente et al., 2007; Massaad et al., 2011; Reicher et al., 2012). Daher wurden Experimente angeschlossen um diese Bindung näher zu untersuchen.

Hierzu kam das Bioresonanz-Energie-Transfer-Verfahren (BRET-Verfahren) zum Einsatz. Dieses ermöglicht die Beobachtung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI). Im Vergleich zu anderen Verfahren, die dies ermöglichen wie etwa Koimmunopräzipitation oder Yeast-2-Hybrid-Verfahren, ist dies in lebenden respektive aus Säugetieren stammenden Zellen

möglich. Auf molekularer Ebene basiert dieses Verfahren auf dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Hierbei wird von einem Donormolekül (Renilla-Luciferase) strahlungsfrei, d.h. ohne Photonen, eine Dipolschwingung in einem Akzeptormolekül (Yellow-Fluorescent-Protein, YFP) übertragen. Dies geschieht allerdings nur dann, wenn sich die beiden Proteine näher als 10 nm kommen (Pfleger & Eidne, 2006). Auch bei normalerweise interagierenden Proteinen kann dies nicht der Fall sein, sollten die angefügten Tags dies sterisch verhindern. Daher waren in der Arbeitsgruppe, analog zu *Gersting et al.*, WASp und WIP sowohl mit YFP als auch hRluc, jeweils N- und C-terminal fusioniert und die so für jedes Protein erhaltenen vier Konstrukte (YFP-Protein-of-Interest (PiO), hRluc-PiO, PiO-YFP, PiO-hRluc) in den acht möglichen Kombinationen vermessen worden (Gersting et al., 2012). Das beste Ergebnis lieferte für WASp und alle Varianten sowie für WIP jeweils die C-terminale Fusion. Klar ist allerdings auch, dass Einflüsse des Fusionsproteins nie komplett zu vermeiden sind.

Experimente sind immer mit der Schaffung von Künstlichkeiten verbunden. Dies gilt auch für die Überexpression der Proteine. Wie unter Kapitel 6.2.1 erwähnt, kann dies immer mit Veränderungen physiologischer Aspekte einher gehen. Wichtig ist hier dann die Reduktion der Beobachtung auf einen bestimmten Aspekt, der mit der Methode beobachtet werden kann.

Im Rahmen der BRET-Experimente war dieser Aspekt, die Bindungsaffinität von WASp zu WIP, zu untersuchen. BRET-Sättigungsexperimente ermöglichen es eine relative Bindungsaffinität zu bestimmen. Hierzu werden verschiedene Verhältnisse von Akzeptor zu Donor transfiziert. Dies geschah, ähnlich zu den Western-Blot-Experimenten in HEK-Zellen, so dass WIP-YFP als Akzeptor im Verhältnis zum Donor WASp-hRluc anstieg (vgl. Kapitel 6.2.2). Bei interagierenden Proteinen ergeben diese Verhältnisse mit den so kontinuierlich ansteigenden BRET-Messwerten in einem Koordinatensystem einen hyperbolen Kurvenverlauf. Aus diesem kann die relative Bindungsaffinität abgelesen werden, indem das Verhältnis von YFP zu Rluc (Akzeptor zu Donor-Ratio) bei halbmaximalem BRET-Messwert mathematisch bestimmt wird (vgl. Abbildung 14). Dieses wird als BRET50-Wert bezeichnet. Die Theorie hinter diesem Verfahren entspricht der des Massenwirkungsgesetzes. Analog zur Dissoziationskonstanten, welche ebenfalls als Wert

bei halbmaximaler Bindung definiert ist, geht eine geringere Bindungsaffinität mit einem höheren Zahlenwert des BRET50-Werts einher.

Er ist anders als die Dissoziationskonstante kein Messwert mit Einheit und unterscheidet sich je nach vermessener Proteinpaarung. Somit sind BRET-50-Werte verschiedener Proteinpaarungen nicht untereinander vergleichbar. In dieser Arbeit allerdings wurden ausschließlich Varianten des WASp mit dem Wildtyp verglichen und die Änderung des BRET-50-Wertes, also die Änderung der relativen Bindungsaffinität, war hier gerade die gewünschte Beobachtung.

Die mathematischen Berechnungen erfolgten mittels der Software Prism.

6.3.1 Die BRET-50-Werte der einzelnen Mutationen

Es wurde der Einfluss der Mutationen auf die relative Bindungsaffinität der jeweiligen Variante analysiert. Dafür wurde diese für alle ausgewählten Varianten ermittelt. Es zeigte sich dass die BRET-50-Werte der Mutationen bis auf die Variante R211X stets zur Abnahme der Bindungsaffinität führten.

Dass diese Variante mit einer Affinität von 0,146 im Bereich des Wildtyps mit 0,148 liegt, erscheint zunächst nicht verwunderlich, da sie in der WH1-Domäne nicht verändert ist.

Im Gegensatz dazu allerdings liegen die Affinitäten der anderen Varianten, die in dieser Domäne nicht verändert sind, nämlich Q185X, L270P und R321X, mit Werten zwischen 0,210 und 0,278 etwas über dem Wert des Wildtyps. Diese Beobachtung deckt sich mit Daten von *Fried et al.*, die eine Abnahme der Affinität an einer künstlich erzeugten Variante ohne VCA-Domäne zeigten (Fried et al., 2014). Sie begründeten dies im Weiteren mit der fehlenden Interaktion der VCA-Domäne mit WIP, welche im autoinhibierten Zustand vorliegt. Somit lässt sich auch die Affinitätsabnahme von L270P begründen, die nicht mehr zur Ausbildung dieser Form in der Lage ist.

Bezüglich der starken Affinität von R211X ist zu überlegen, ob exakt diese Verkürzung etwa eine weitere Protein-Protein-Interaktionen ermöglicht, die stabilisierend wirkt.

Die auch in der WH1-Domäne unveränderte Variante H30del zeigte mit einer Bindungsaffinität von 0,568 eine deutlich geringere Bindung. Gegebenenfalls kommt es durch das Fehlen einer Aminosäure zu sterischen Veränderungen im N-Terminus von WASp, die kurz vor der WH1-Domäne liegen und somit eine Bindung erschweren.

Bei den Varianten innerhalb der WH1-Domäne zeigte sich die geringste Abnahme der Bindungsaffinität für die Variante T45M mit 0,241 im Vergleich zu 0,148 des Wildtyps. Dies scheint plausibel, da die betroffene Mutation auf der Rückseite der Bindedomäne liegt und somit die WASp-WIP-Bindung nicht direkt beeinflusst (vgl. Abbildung 9). Vermutlich führen Konformationsänderungen des β -Faltblatts, auf dem T45M liegt, zur Abnahme der Bindung. Benachbart in diesem Faltblatt aber auf einem anderen Strang liegt die Mutation V75M deren Bindungsaffinität mit 0,493 im Vergleich zum Wildtyp mehr als dreimal so schwach ist. Im direkten Vergleich von T45M und V75M lässt sich dies wohl dadurch erklären, dass auf diesem Faltblatt V75M näher an der tatsächlichen Bindestelle von WIP liegt. Analog zu dieser Beobachtung passt, dass R86C, ein weiterer Nachbar von V75M in der Tertiärstruktur, der noch näher an der Bindestelle liegt, mit 0,587 erneut eine schwächere Affinität aufweist.

Entsprechend dem Modell liegt D121 direkt in der Bindestelle. Der trotz Insertion recht moderate Anstieg der Affinität der Variante D121insGD auf 0,535 könnte darin begründet liegen, dass die elektrostatischen Eigenschaften wegen der noch vorhandenen Asparaginsäure nicht verändert werden und dass das kleine Glycin in der Schleifenregion sterisch nur gering ins Gewicht fällt.

F114I liegt dicht an der unmittelbaren Bindungsstelle, was die verhältnismäßig schwache Affinität von 0,697 erklären könnte. Andererseits wurde hier Phenylalanin mit Isoleucin durch eine andere hydrophobe Aminosäure ersetzt und somit das elektrostatische Umfeld in dieser Region nicht verändert.

Die Varianten E133K und A134V zeigen im Vergleich zu den eben genannten, dass, laut 3D-Modell, trotz einer gewissen Entfernung zur Bindestelle eine erhebliche Abschwächung der Affinität möglich ist, nämlich 0,949 respektive 1,182.

Diese Beobachtungen decken sich mit Erkenntnissen von *Luthi et al.*, *D. Stewart et al.* und *Worth et al.* (Luthi et al., 2003; Stewart et al., 1999; Worth et al., 2013). Die ersten beiden zeigten eine abgeschwächte Bindungsaffinität einiger Mutationen mittels 2-Hybrid, *Worth et al.* mittels Koimmunopräzipitation.

Wie in dieser Arbeit wurde auch in allen drei Studien der Locus A134 untersucht. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit konnte dies aber nicht für A134V sondern für A134T gezeigt werden. Mit R86H untersuchten *Stewart et al.* und *Worth et al.* einen Hotspot an WASp-Mutationen, der neben der hier untersuchten Variante R86C noch zwei weitere

Varianten aufweist. *Worth et al.* untersuchten auch T45M.

In allen Studien konnte eine Abschwächung der jeweiligen Bindungsaffinität nachgewiesen werden. A134V zeigte sich auch dort immer als Variante mit der geringsten Restaffinität. Die Affinität von T45M zeigte sich bei der Studie von *Worth et al.* als die Variante mit der stärksten Restaffinität. R86H lag hier, ebenso wie bei *Stewart et al.* im Mittelfeld der analysierten Varianten. Diese Ergebnisse stimmen mit denen in dieser Arbeit erhobenen Daten überein, auch wenn hier mit R86C und A134V andere Varianten analysiert wurden.

Allerdings weist das in dieser Arbeit verwendete BRET-Verfahren Vorteile gegenüber den Methoden der anderen Autoren auf. Bei den Verfahren der 2-Hybrid-Familie ist es nötig, dass beide zu untersuchende Proteine in den Zellkern migrieren um die Transkription des Reportergens zu aktivieren. Dies stellt für Proteine des Zytosols allerdings einen unnatürlichen Schritt dar, so kann es gegebenenfalls zu einem Ungleichgewicht beider Proteine kommen und somit zu verfälschten Messwerten. Auch herrscht im Zellkern ein anderes Milieu und daher könnte es etwa zu Fehlfaltungen kommen. Die cytosolische Lokalisation von WASp und WIP als Fusionsprotein mit YFP und andern Derivaten des GFP ist aus mehreren Publikationen bekannt (Fried et al., 2014; Massaad et al., 2011). Die Lokalisation der Fusionsproteine mit Luciferase ist wegen der guten Messwerte der BRET-Experimente, die für eine Interaktion sprechen, anzunehmen. Eine weitere Limitation der 2-Hybrid-Methode ist, dass hier häufig Hefezellen, also Zellen eines anderen biologischen Reichs, verwendet werden.

Im Gegensatz dazu wurde von *Worth et al.* mit der U-937-Zelllinie eine menschliche Zelle verwendet. Bei der Koimmunopräzipitation allerdings herrscht durch den physikalischen Prozess, dem die Proteine bei ihrer Aufreinigung ausgesetzt sind, die Gefahr, dass dadurch Protein-Protein-Interaktionen gelöst werden und es bei der anschließenden Quantifizierung zu einer Verfälschung der Ergebnisse kommt.

Das in dieser Arbeit verwendete BRET-Verfahren ermöglichte es erstmalig die Interaktionen in lebenden, menschlichen Zellen zu beobachten, ohne dass es für die WASp-Varianten und WIP nötig war ihr natürliches Milieu zu verlassen. Allerdings gelten natürlich die oben genannten Einschränkungen, die durch Überexpression und die Tags verursacht werden.

Auch konnte durch die konkrete Umsetzung der BRET-Experimente, nämlich die Bestimmung der Sättigungskurven, weitere Genauigkeit eingebracht werden. Für jede

Variante in jedem einzelnen Experiment wurden 12 Wertepaare ermittelt, deren Validität anschließend durch Regressionsanalyse mathematisch ermittelt wurde. Durch dieses Zusammenspiel war es möglich die Validität der ermittelten Daten intrinsisch nochmals zu bestätigen. Für alle Varianten konnte ein Bestimmtheitsmaß bei der Regressionsanalyse von mindestens über 0,75 ermittelt werden (vgl. Tabelle 9).

Dieses mathematische Korrektiv stand den anderen Autoren methodenbedingt nicht zur Verfügung.

Um auch den diversen WIP-Isoformen gerecht zu werden und einen Einfluss dieser auf die Bindungsaffinität auszuschließen, wurde die WIP Isoform 1 mit WIP Isoform 3 N119D, P198L in ihrer Bindungsaffinität zu WASp WT verglichen und es konnte hier kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dies erscheint unter dem Aspekt plausibel, dass Isoformen wie SNP's bislang nicht als pathogen beschrieben wurden. Lediglich das komplette Fehlen der Interaktionsdomäne von WIP wurde als pathogen beschrieben (Lanzi et al., 2012).

Abschließend lässt sich festhalten, dass in dieser Arbeit erstmals Daten eines großangelegten Interaktionsscreenings zwischen WASp und WIP präsentiert wurden, deren Validität durch statistische Verfahren unterstützt wurde.

Es konnte experimentell unterstützt durch Literatur gezeigt werden, dass durch Mutationen eine Abschwächung der Bindungsaffinität zwischen WIP und WASp hervorgerufen wird.

In Kapitel 6.2 wurde ebenfalls experimentell gezeigt, dass es eine quantitative Beziehung zwischen WASp-Menge und WIP-Menge gibt.

Die Western-Blot-Experimente in HEK-Zellen (vgl. Kapitel 6.2.2) und die BRET-Sättigungsexperimente basierend auf der WASp-WIP-Interaktion zeigen verschiedene Aspekte auf: Zum einen die Abhängigkeit der Proteinmenge von WASp und WIP, zum anderen die geschwächte Bindungsaffinität von WASp zu WIP.

In Zusammenschau beider Ergebnisse lässt sich festhalten, dass die WASp-WIP-Interaktion essentiell für die intrazellulären Menge an WASp ist und das eben dies durch Mutationen abgeschwächt wird.

Es lässt sich somit konstatieren, dass eine schwächere Bindung zu einem vermehrten Abbau führt.

6.4 Korrelation

In den beiden vorherigen Kapiteln 6.2 und 6.3 konnte experimentell, unterstützt durch Publikationen, eine Abhängigkeit zwischen der Bindungsaffinität von WASp und WIP und der intrazellulären WASp-Menge herausgearbeitet werden.

Jin et al. und *Imai et al.* haben, indem sie die Proteinmenge in Patientenzellen bestimmt haben, gezeigt, dass der Schweregrad von WAS mit der vorhandenen Proteinmenge korreliert (Imai et al., 2004; Jin et al., 2004)

Daher wurde im Weiteren untersucht, ob ein statistischer Zusammenhang zwischen relativer Bindungsaffinität zwischen WASp und WIP sowie dem Phänotyp besteht.

Ein körperlicher Zustand wie der Phänotyp ist mathematisch nicht abbildbar, weshalb stellvertretend der WAS-Score-Wert verwendet wurde (Ochs, 2007, 2019). Dieses Scoringssystem umfasst acht Kategorien, die den Patienten je nach Ausprägung der Symptome einen Punktwert zuweist (vgl. Tabelle 1). Die Einschätzung der Ausprägung ist jedoch nicht mittels fixer Grenzwerte definiert, sondern wird beispielsweise in mild, moderat oder schwer eingeteilt. Die jeweilige Einteilung unterliegt somit der Subjektivität des Untersuchers, was mit Verfälschungen verbunden sein kann.

Auch ist das Scoringssystem ordinal skaliert, d.h. es ist anhand des WAS-Score-Wertes nicht möglich zu sagen, dass ein Patient der den Wert 4 trägt doppelt so krank ist, wie einer der den Wert 2 trägt. Dies ist auch mit einem Informationsverlust verbunden, denn der Wert bildet sich aus den Werten für die einzelnen Kategorien, gibt aber nicht an, wie stark diese ausgeprägt waren.

Sobald mindestens eine Wertmenge nicht mehr kardinalskaliert ist, kann beispielsweise der Pearsons Korrelationskoeffizient keine Anwendung mehr finden.

Daher muss ein Rangkorrelationkoeffizient wie Spearmans Korrelationskoeffizient verwendet werden. Die Berechnung einer Rangkorrelation ist mit einem Informationsverlust verbunden. Er lässt zum Beispiel keine Aussage über Linearität oder Wahrscheinlichkeiten zu, sondern gibt nur an, ob ein monotoner Zusammenhang zwischen Variablen, die in Rängen sortiert sind, besteht. Dies muss bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

In dieser Arbeit wurde die Bindungsaffinität der einzelnen Mutationen mit dem jeweiligen aus der Literatur bekannten WAS-Scorewert korreliert. Hier wurde aus den veröffentlichten Werten immer der Wert genommen, der jeweils am häufigsten vorkam. Es muss natürlich berücksichtigt werden, dass im Allgemeinen nicht alle WAS-Score-Werte veröffentlicht werden und diese nur eine Momentaufnahme darstellen.

Die Varianten wurden danach unterteilt, ob die Mutation die WH1-Domäne betrifft oder nicht.

Dies geschah deshalb, da nur bei den die Domäne betreffenden Mutationen unmittelbar die Affinität und somit die Proteinmenge beeinflusst waren.

Mit diesem Vorgehen konnte ein signifikanter und starker, positiver Zusammenhang zwischen Affinität und WAS-Score festgestellt werden. Es wurde ein Spearmans Korrelationskoeffizienten von 0,764 ermittelt (vgl. Abbildung 16 (a)).

Für die Varianten außerhalb dieser Domäne war kein solcher Zusammenhang erkennbar. Es ergab sich ein WAS-Score von -0,316, der nicht signifikant war. Der in der Regel bei diesen Varianten schwere Phänotyp ist wohl neben dem Abbau durch erschwerte WIP-Bindung vor allem auf das Fehlen der VCA-Domäne zurückzuführen, welche für die Polymerisation des Aktinfilaments sehr wichtig ist (vgl. Abbildung 16 (b)).

Laut dieser Korrelation ist ein stärker ausgeprägter Phänotyp mit einer geringeren Bindungsaffinität assoziiert.

7 Konklusion

Es gilt also, dass die Interaktion von WASp und WIP

1. direkten Einfluss auf die Menge von WASp hat (vgl. Kapitel 6.2),
2. einer Oligomerisierungskinetik folgt (vgl. Kapitel 6.2 und 6.3),
3. durch Mutationen gestört wird, welche die Bindungsaffinität herabsetzen (vgl. Kapitel 6.3).

Bei Oligomerisierungskinetiken gilt allgemein:

$$K_i = \frac{[A][B]}{[AB]}$$

bezogen auf diese Arbeit:

$$BRET\ 50 = \frac{[WASp - Proteinmenge][WIP - Proteinmenge]}{[Anzahl\ WASp - WIP - Komplexe]}$$

oder

$$[Anzahl\ WASp - WIP - Komplexe] = \frac{[WASp - Proteinmenge][WIP - Proteinmenge]}{BRET\ 50}$$

Aus obigen Ergebnissen lässt sich entsprechend des Massenwirkungsgesetzes ableiten, dass eine geringere Bindungsaffinität, hier repräsentiert durch einen höheren BRET50-Wert, zu einer geringeren Anzahl an WASp-WIP-Komplexen und somit zu einer höheren Anzahl an nicht-komplexiertem WASp respektive WIP führt. WASp allerdings, welches nicht im Komplex mit WIP vorliegt, wird vermehrt abgebaut, somit nimmt die Menge von WASp ab. Eine geringere Menge wiederum ist laut Literatur mit einem schweren Phänotyp assoziiert (Imai et al., 2004; Jin et al., 2004).

Anhand der Ergebnisse der Experimente und deren Interpretation mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes, erscheint abschließend das Ergebnis der Korrelation plausibel und es kann ein Vorschlag für eine neue Genotyp-Phänotyp-Korrelation präsentiert werden.

Dies ermöglicht für neu entdeckte Mutationen frühzeitig eine Prognose und erleichtert die Einordnung der Therapieoptionen und somit die Aufklärung der Eltern.

8 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation war es möglich, experimentell und statistisch tiefere Einblicke in die Interaktion zwischen WASp und WIP und die damit verbundene Pathogenese sowie deren Auswirkungen auf den Phänotypen des Wiskott-Aldrich-Syndroms zu gewinnen.

Insgesamt wurden der Wildtyp und 12 pathogene Varianten des WASp untersucht. Es wurden Mutationen des WAS-Gens anhand von Literatur- und Datenbankrecherchen ausgewählt und die jeweiligen WAS-Score-Werte ermittelt (Bourne et al., 2004; de Saint Basile et al., 1996; Derry et al., 1995; El-Hakeh et al., 2002, S.; Fillat et al., 2001; Greer et al., 1996; Ho et al., 2001; Imai et al., 2004; Jin et al., 2004; Jo et al., 2003; Kolluri et al., 1995; S. Kwan, Hagemann, Blaese, et al., 1995; S. Kwan, Hagemann, Radtke, et al., 1995; Lemahieu et al., 1999; Proust et al., 2007; Sasahara et al., 2000; Schindelhauer et al., 1996; Thompson et al., 1999; Wengler et al., 1995; Zhang et al., 2010; Zhu et al., 1997). Aus dem jeweiligen Pool an WAS-Score-Werten wurde der am häufigsten vertretene Wert mittels der Modus-Operation ausgewählt. Die Auswahl erfolgte, um eine breite Auffächerung an Mutationen zu bekommen. Hierbei lag der Fokus auf der WH1-Domäne, welche insgesamt am häufigsten von Mutationen betroffen ist (Ochs, 2007, 2019).

Zunächst wurde die Expression der WASp-Varianten in verschiedenen Zelllinien studiert und mittels Western-Blots analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des intrazellulären Wildtyps des WASp von der WIP-Menge abhängt und diese Abhängigkeit einer Sättigungskinetik folgt. Auch die pathogenen Varianten des WASp hängen in ihrer intrazellulären Menge von WIP ab.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Veränderungen in der WIP-Bindedomäne von WASp zu Störung dieser Interaktion führen. Die Bindungsaffinität des WASp zu WIP war beim Wildtyp im Vergleich zu fast allen Varianten am stärksten. Die Varianten der WH1-Domäne zeigten ein breites Spektrum an verschiedenen Affinitäten, welches von einer kaum herabgesetzten Affinität (T45M) bis zu einer achtfach schwächeren reicht (A133V).

Alle Varianten außerhalb der WH1-Domäne hatten eine vergleichbare und im Vergleich zum Wildtyp nur leicht herabgesetzte Bindungsaffinität.

In einer statistischen Analyse der in dieser Arbeit erhaltenen Daten mittels Spearmans Korrelationskoeffizienten, konnte eine signifikant positive Korrelation zwischen der Bindungsstärke bei der WASp-WIP-Interaktion und dem klinischen Phänotypen des WAS gezeigt werden.

Somit gilt, je schwächer die Bindung desto schwerer der Phänotyp. Dieser Zusammenhang galt nur für die Mutationen innerhalb der WH1-Domäne.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Verteilung von Mutationen, die WAS und XLT verursachen, entlang des WAS-Gens. Aus Ochs, 2019.....	10
Abbildung 2: Modell des WASp in Interaktion mit WIP. Es sind die einzelnen Domänen farblich abgesetzt. An der WH1-Domäne sind durch die Quadrate K76 und K81 die Ubiquitynylierungsdomänen, an der GBD-Domäne durch Quadrat Y291 die Phosphorylierungsstelle dargestellt. In (a) liegt das inaktive WASp im Komplex mit WIP vor. Dieser Komplex schirmt die Ubiquitynylierungsdomäne von Ubiquitin (Ub) ab und wird durch die Bindung zwischen der WH2-Domäne des WIP und der VCA-Domäne des WASp stabilisiert. In (b) ist Y291 phosphoryliert (roter Stern) die VCA-Domäne interagiert nicht mehr mit der WH2-Domäne und somit bindet WIP schwächer an WASp;(eigene Grafik).....	12
Abbildung 3: Alignment der Proteinsequenz der WH1-Domänen von N-WASp Ratti norvegici und WASp Hominis sapientis. In der mittleren Spur ist ein Consensus aufgetragen, wobei Buchstaben eine Übereinstimmung in den Sequenzen widerspiegeln. Ein Pluszeichen (+) zeigt einen Austausch in Aminosäuren mit chemisch ähnlicher Eigenschaft an. Insgesamt sind die Aminosäuren in beiden Sequenzen hochkonserviert. Software-Alignment-Analyse nach Blast-Suite des NCBI's (Nucleotide BLAST, 2017).....	13
Abbildung 4: Sekundärstruktur der WH1-Domäne des N-WASp (Rattus norvegicus) und des WAS-Bindemotiv des WIP (Homo sapiens). β -Faltblatt: gelb; α -Helix: rot; N-Terminus: orange; C-Terminus: blau; WAS-Bindemotiv des WIP: anthrazit. Eigenes Bild erstellt mit der Software Pymol aus dem 3D-Modell nach Peterson et al., 2007.....	14
Abbildung 5: der Mangel an WASp führt je nach Zellart, aber auch in einer Zellart zu verschiedenen Defekten, welche zu Problemen in der Chemotaxis und zu abnormer Zellaktivierung führen. Abbildung aus Blundell et al., 2010.....	23
Abbildung 6: BP-Reaktion aus Schatz, 2014, S. 47.....	40
Abbildung 7: LR-Reaktion aus Schatz, 2014, S. 48.....	40
Abbildung 8: Lage der Mutationen im WASp-Modell.....	51
Abbildung 9: WH1-Domäne N-WASp (Rattus norvegicus) anthrazit; humanes WASp-Bindemotiv von WIP blau; betroffene Aminosäuren rot. (a) und (b) gleiche Darstellung 180° um die vertikale Achse gedreht. Modell nach Peterson et al., 2007.....	52
Abbildung 10: Die Western Blot-Analyse zeigt einen Anstieg der WASp-Menge bei einem Anstieg der WIP-Menge. HEK293-Zellen wurden mit einer konstanten Menge WASp WT-DNS und einer ansteigenden Menge WIP-DNS transfiziert, analog der Verhältnisse der Tabelle 6. Die Detektion	

erfolgte über Anti-V5-Antikörper. Es zeigen sich Banden für YFP-WIP-V5 bei ca. 80 kDa, für WASp-V5 bei 55 kDa. Der Abschnitt mit GapDH wird hier zur besseren Darstellbarkeit geschnitten dargestellt..... 54

Abbildung 11: Die Dichten der Banden des Western Blots wurden quantifiziert, normiert und statistisch analysiert. Der Anstieg der WASp-Menge zeigte sich gemäß Akaikes Informationskriterium mit 99,96% Wahrscheinlichkeit nicht-linear abhängig von der von WIP.....54

Abbildung 12: Die Western Blot-Analyse zeigt einen Anstieg der WASp-Menge bei einem Anstieg der WIP-Menge. Jurkat-Zellen wurden mit einer konstanten Menge WASp WT-DNS und im Verhältnis dazu einmal mit der 0,4-fachen (A) und einmal mit der 2,5-fachen (B) Menge WIP-DNS transfiziert..... 56

Abbildung 13: Die Dichten der WASp-Banden des Western Blots wurden quantifiziert und der Wert, der Bande mit der 2,5-fachen WIP-Menge, durch den Wert der Bande mit der 0,4-facher WIP-Menge geteilt. Es ergab sich stets ein Quotient über 1, was einen Anstieg der WASp-Menge anzeigt..... 58

Abbildung 14: Exemplarisch sind hier die Sättigungskurven für WASp WT (schwarz) und WASp A134V (blau) abgebildet. Die Position der halbmaximalen Sättigung auf der X-Achse ist durch eine gestrichelte Linie markiert. Es besteht eine deutliche Verschiebung der Linie von WASp A134V im Vergleich zur der von WASp WT nach rechts, was eine schwächere Bindung anzeigt.....60

Abbildung 15: Vergleich der Bindungsaffinitäten der WIP Isoform 1 und der Isoform 3 N119D, P198L. Diese in drei unabhängigen Experimenten durchgeführte Studie ergab keinen signifikanten Unterschied in den Affinitäten.....61

Abbildung 16: Die X-Achse bildet die Bindungsaffinität (BRET50) ab, die Y-Achse den WAS-Score. * F114I und Q185X sind mit einem WAS-Score von 5 assoziiert daher wurden sie bei der Berechnung der Korrelation nicht berücksichtigt. Die Linien sollen nur den Trend verdeutlichen und stellen keine lineare Regression dar. (a) Der Korrelationskoeffizient zwischen den BRET-50-Werten der Mutationen innerhalb der WH1-Domäne und der jeweiligen WAS-Score-Werte betrug 0,764 mit einem P-Wert von 0,048. (b) Der Korrelationskoeffizient für die Varianten außerhalb dieser Domäne war -0,316 und nicht signifikant.....63

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: WAS-Score-Diagnosetabelle nach Ochs, 2007, 2015.....	4
Tabelle 2: Diagnosekriterien für das Wiskott-Aldrich-Syndrom nach Conley et al., 1999.....	6
Tabelle 3: Übersicht über die Verteilung der 5 häufigsten Mutationen im WAS-Gen. Nach Jin et al., 2004; AS=Aminosäure, FS=Frameshift.....	9
Tabelle 4: att-Site Primer.....	35
Tabelle 5: SDM-Primer.....	35
Tabelle 6: Verhältnisse WASp-DNS zu WIP-DNS in den Westerblotexperimenten mit HEK293-Zellen.....	45
Tabelle 7: Die in dieser Studie verwendeten Varianten von WASp. Von den ausgewählten Varianten sind 5 mit XLT und 6 mit WAS sowie eine mit XLN assoziiert. Unter WAS-Score-Wert ist jeweils der am häufigsten auftretende Wert angeschrieben. Varianten innerhalb der WH1-Domäne sind fett gedruckt.....	51
Tabelle 8: Mengenverhältnisse von WASp nach Steigerung der intrazellulären WIP-Menge. In Kondition I wurde die 0,4-fache Menge an WIP-DNS im Vergleich zu WASp-DNS, in Kondition II die 2,5-fache Menge verwendet. Die Messwerte aus Kondition II wurden durch die aus Kondition I geteilt. Schließlich wurde hier der Mittelwert aus den einzelnen Messungen angegeben.....	58
Tabelle 9: Übersicht über die BRET50-Werte und der dazugehörigen Bestimmtheitsmaße der einzelnen Varianten. Die Varianten innerhalb der WH1-Domäne sind fett gedruckt. * wurde für diese Arbeit experimentell erhoben.....	60
Tabell A-1: Datensatz Bittner.....	101

11 Abkürzungsverzeichnis

att-site	Attachment site
Aqua bidest.	Bidestilliertes Wasser
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszenzresonanzenergietransfer
cDNA	komplementäre DNS
cDNS	komplementäre DNS
CMV	Cytomegalie Virus
CTZ	Colenterazin
DEST	Destination
DH5 α	Douglas Hanahan-5- α
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNS	Desoxyribonucleinsäure
DONR	Donor
E. coli	Escherichia coli
EF1	Elongation Factor 1
EV1	WH1-Domäne
FCS	Fetal calf serum
FRET	Fluoreszenz Resonanzenergietransfer
FWHM	full width at half maximum
GapDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GBD	GTPase Binding Domain
GFP	Green fluorescent protein
HEK	Human Embryonic Kidney
HLA	Humanes Lymphozytenantigen
hRluc	Humanisierte Renilla Luziferase
iXLT	intermittierende X-chromosomale Thrombozytopenie
kb	Kilo-Basenpaare
kDa	Kilo-Dalton
LB	lysogeny broth
min	Minuten
mRNA	messenger RNS
mRNS	messenger RNS
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PAH	Phenylalanin-Hydroxylase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction
PiO	Protein Of Interest
PPI	Protein-Protein-Interaktion
PPP	Proline-Rich-Region
Rluc	Renilla Luziferase
RNS	Ribonucleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
SDM	Side Directed Mutagenesis
sec	Sekunden
Ser	Serin
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
sog.	sogenannt
TBE	TRIS-Borat-EDT
TCR	T-Zell-Rezeptor
VCA-	Verprolin-Homology-Cofilin-Homology-Acidic-Domäne

vgl.	vergleiche
WAS	Wiskott-Aldrich-Syndrom/Gen
WAS-Gen	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Gen
WASp	Wiskott-Aldrich-Syndrom-Protein
WH1	WASp Homology Domain 1
WH2	WASp Homology Domain 2
WIP	WASp-interacting-protein
WIPF1	<i>WIP</i> -Gen
WT	Wildtyp
XLN	X-chromosomale Neutropenie
XLT	X-chromosomale Thrombozytopenie
YFP	Yellow fluorescent protein

12 Literaturverzeichnis

- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M. P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M. C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., ... Naldini, L. (2013). Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science (New York, N.Y.)*, *341*(6148), 1233151. <https://doi.org/10.1126/science.1233151>
- Albert, M. H., Bittner, T. C., Nonoyama, S., Notarangelo, L. D., Burns, S., Imai, K., Espanol, T., Fath, A., Pellier, I., Strauss, G., Morio, T., Gathmann, B., Noordzij, J. G., Fillat, C., Hoenig, M., Nathrath, M., Meindl, A., Pagel, P., Wintergerst, U., ... Ochs, H. D. (2010). X-linked thrombocytopenia (XLT) due to WAS mutations: Clinical characteristics, long-term outcome, and treatment options. *Blood*, *115*(16), 3231–3238. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-09-239087>
- Albert, M. H., Notarangelo, L. D., & Ochs, H. D. (2011). Clinical spectrum, pathophysiology and treatment of the Wiskott-Aldrich syndrome. *Current Opinion in Hematology*, *18*(1), 42–48. <https://doi.org/10.1097/MOH.0b013e32834114bc>
- Aldrich, R. A., Steinberg, A. G., & Campbell, D. C. (1954). Pedigree demonstrating a sex-linked recessive condition characterized by draining ears, eczematoid dermatitis and bloody diarrhea. *Pediatrics*, *13*(2), 133–139.
- Ancliff, P. J., Blundell, M. P., Cory, G. O., Calle, Y., Worth, A., Kempinski, H., Burns, S., Jones, G. E., Sinclair, J., Kinnon, C., Hann, I. M., Gale, R. E., Linch, D. C., & Thrasher, A. J. (2006). Two novel activating mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein result in congenital neutropenia. *Blood*, *108*(7), 2182–2189. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-01-010249>
- Antón, I. M., Jones, G. E., Wandosell, F., Geha, R., & Ramesh, N. (2007). WASP-interacting protein (WIP): Working in polymerisation and much more. *Trends in Cell Biology*, *17*(11), 555–562. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2007.08.005>
- Antón, I. M., Lu, W., Mayer, B. J., Ramesh, N., & Geha, R. S. (1998). The Wiskott-Aldrich syndrome protein-interacting protein (WIP) binds to the adaptor protein Nck. *The Journal of*

Biological Chemistry, 273(33), 20992–20995.

Ayoub, M. A., Couturier, C., Lucas-Meunier, E., Angers, S., Fossier, P., Bouvier, M., & Jockers, R. (2002). Monitoring of Ligand-independent Dimerization and Ligand-induced Conformational Changes of Melatonin Receptors in Living Cells by Bioluminescence Resonance Energy Transfer. *Journal of Biological Chemistry*, 277(24), 21522–21528.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M200729200>

Beel, K., Cotter, M. M., Blatny, J., Bond, J., Lucas, G., Green, F., Vanduppen, V., Leung, D. W., Rooney, S., Smith, O. P., Rosen, M. K., & Vandenberghe, P. (2009). A large kindred with X-linked neutropenia with an I294T mutation of the Wiskott-Aldrich syndrome gene. *British Journal of Haematology*, 144(1), 120–126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2008.07416.x>

Binder, V. (2007). *Das Wiskott-Aldrich-Syndrom. Eine Gegenüberstellung der klinischen Erstbeschreibung (1937) mit dem aktuellen Wissen über die Rolle des Wiskott-Aldrich-Proteins (WASP) ; molekulargenetische Untersuchung der erstbeschriebenen Familie in drei Generationen ; Analyse zur Verteilung und Häufigkeit der Mutationen sowie zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation beim Wiskott-Aldrich-Syndrom* [Ludwig-Maximilians-Universität]. <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-71073>

Blundell, M. P., Worth, A., Bouma, G., & Thrasher, A. J. (2010). The Wiskott-Aldrich syndrome: The actin cytoskeleton and immune cell function. *Disease Markers*, 29(3–4), 157–175.
<https://doi.org/10.3233/DMA-2010-0735>

Boonyawat, B., Dhanraj, S., Al Abbas, F., Zlateska, B., Grunenbaum, E., Roifman, C. M., Steele, L., Meyn, S., Blanchette, V., Scherer, S. W., Swierczek, S., Prchal, J., Zhu, Q., Torgerson, T. R., Ochs, H. D., & Dror, Y. (2013). Combined de-novo mutation and non-random X-chromosome inactivation causing Wiskott-Aldrich syndrome in a female with thrombocytopenia. *Journal of Clinical Immunology*, 33(7), 1150–1155.
<https://doi.org/10.1007/s10875-013-9927-9>

Bourne, H. C., Weston, S., Prasad, M., Edkins, E., & Benson, E. M. (2004). Identification of WASP mutations in 10 Australian families with Wiskott–Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Pathology*, 36(3), 262–264.

<https://doi.org/10.1080/00313020410001692521>

- Boztug, K., Schmidt, M., Schwarzer, A., Banerjee, P. P., Díez, I. A., Dewey, R. A., Böhm, M., Nowrouzi, A., Ball, C. R., Glimm, H., Naundorf, S., Kühlcke, K., Blasczyk, R., Kondratenko, I., Maródi, L., Orange, J. S., von Kalle, C., & Klein, C. (2010). Stem-Cell Gene Therapy for the Wiskott–Aldrich Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *363*(20), 1918–1927. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003548>
- Braun, C. J., Boztug, K., Paruzynski, A., Witzel, M., Schwarzer, A., Rothe, M., Modlich, U., Beier, R., Göhring, G., Steinemann, D., Fronza, R., Ball, C. R., Haemmerle, R., Naundorf, S., Kühlcke, K., Rose, M., Fraser, C., Mathias, L., Ferrari, R., ... Klein, C. (2014). Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome—Long-term efficacy and genotoxicity. *Science Translational Medicine*, *6*(227), 227ra33. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007280>
- Chen, N., Zhang, Z.-Y., Liu, D.-W., Liu, W., Tang, X.-M., & Zhao, X.-D. (2015). The clinical features of autoimmunity in 53 patients with Wiskott-Aldrich syndrome in China: A single-center study. *European Journal of Pediatrics*, *174*(10), 1311–1318. <https://doi.org/10.1007/s00431-015-2527-3>
- Chicaybam, L., Sodre, A. L., Curzio, B. A., & Bonamino, M. H. (2013). An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. *PLOS ONE*, *8*(3), e60298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060298>
- Chou, H.-C., Antón, I. M., Holt, M. R., Curcio, C., Lanzardo, S., Worth, A., Burns, S., Thrasher, A. J., Jones, G. E., & Calle, Y. (2006). WIP regulates the stability and localization of WASP to podosomes in migrating dendritic cells. *Current Biology: CB*, *16*(23), 2337–2344. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.10.037>
- Conley, M. E., Notarangelo, L. D., & Etzioni, A. (1999). Diagnostic criteria for primary immunodeficiencies. Representing PAGID (Pan-American Group for Immunodeficiency) and ESID (European Society for Immunodeficiencies). *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, *93*(3), 190–197. <https://doi.org/10.1006/clim.1999.4799>
- Cuerrier, D., Moldoveanu, T., & Davies, P. L. (2005). Determination of peptide substrate specificity for mu-calpain by a peptide library-based approach: The importance of primed side interactions. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(49), 40632–40641.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M506870200>

de la Fuente, M. A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I. M., Elkhali, A., Gallego, M. D., Suresh, K., Siminovich, K., Ochs, H. D., Anderson, K. C., Rosen, F. S., Geha, R. S., & Ramesh, N. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(3), 926–931.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0610275104>

de Saint Basile, G., Lagelouse, R. D., Lambert, N., Schwarz, K., Le Mareck, B., Odent, S., Schlegel, N., & Fischer, A. (1996). Isolated X-linked thrombocytopenia in two unrelated families is associated with point mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene. *The Journal of Pediatrics*, *129*(1), 56–62.

Derry, J., Kerns, J. A., Weinberg, K. I., Ochs, H. D., Volpini, V., Estivill, X., Walker, A. P., & Francke, U. (1995). WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Human Molecular Genetics*, *4*(7), 1127–1135.

<https://doi.org/10.1093/hmg/4.7.1127>

Derry, J., Ochs, H. D., & Francke, U. (1994). Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome. *Cell*, *78*(4), 635–644.

Devriendt, K., Kim, A. S., Mathijs, G., Frints, S. G. M., Schwartz, M., Van den Oord, J. J., Verhoef, G. E. G., Boogaerts, M. A., Fryns, J.-P., You, D., Rosen, M. K., & Vandenberghe, P. (2001). Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia. *Nature Genetics*, *27*(3), 313–317. <https://doi.org/10.1038/85886>

Donnelly, S. K., Weisswange, I., Zettl, M., & Way, M. (2013). WIP provides an essential link between Nck and N-WASP during Arp2/3-dependent actin polymerization. *Current Biology: CB*, *23*(11), 999–1006. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2013.04.051>

Dovas, A., & Cox, D. (2010). Regulation of WASp by phosphorylation. *Communicative & Integrative Biology*, *3*(2), 101–105.

Dupuis-Girod, S., Medioni, J., Haddad, E., Quartier, P., Cavazzana-Calvo, M., Le Deist, F., de Saint Basile, G., Delaunay, J., Schwarz, K., Casanova, J.-L., Blanche, S., & Fischer, A. (2003). Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: Risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients. *Pediatrics*, *111*(5 Pt 1), e622–627.

- El-Hakeh, J., Rosenzweig, S., Oleastro, M., Basack, N., Berozdnic, L., Molina, F., Rivas, E. M., Zelazko, M., & Danielian, S. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome in Argentina: 17 unique, including nine novel, mutations. *Human Mutation*, *19*(2), 186–187.
<https://doi.org/10.1002/humu.9013>
- Filipovich, A. H., Stone, J. V., Tomany, S. C., Ireland, M., Kollman, C., Pelz, C. J., Casper, J. T., Cowan, M. J., Edwards, J. R., Fasth, A., Gale, R. P., Junker, A., Kamani, N. R., Loechele, B. J., Pietryga, D. W., Ringdén, O., Vowels, M., Hegland, J., Williams, A. V., ... Horowitz, M. M. (2001). Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: Collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program. *Blood*, *97*(6), 1598–1603.
- Fillat, C., Español, T., Oset, M., Ferrando, M., Estivill, X., & Volpini, V. (2001). Identification of WASP mutations in 14 Spanish families with Wiskott-Aldrich syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, *100*(2), 116–121.
- Fried, S., Matalon, O., Noy, E., & Barda-Saad, M. (2014). WIP: More than a WASp-interacting protein. *Journal of Leukocyte Biology*, *96*(5), 713–727. <https://doi.org/10.1189/jlb.2RU0314-162R>
- Fried, S., Reicher, B., Pauker, M. H., Eliyahu, S., Matalon, O., Noy, E., Chill, J., & Barda-Saad, M. (2014). Triple-color FRET analysis reveals conformational changes in the WIP-WASp actin-regulating complex. *Science Signaling*, *7*(331), ra60.
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2005198>
- Frieden, C. (1983). Polymerization of actin: Mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20 degrees C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *80*(21), 6513–6517.
- Friedrich, W., Schütz, C., Schulz, A., Benninghoff, U., & Hönig, M. (2009). Results and long-term outcome in 39 patients with Wiskott-Aldrich syndrome transplanted from HLA-matched and -mismatched donors. *Immunologic Research*, *44*(1–3), 18–24.
<https://doi.org/10.1007/s12026-008-8063-8>
- Gersting, S. W., Kemter, K. F., Staudigl, M., Messing, D. D., Danecka, M. K., Lagler, F. B., Sommerhoff, C. P., Roscher, A. A., & Muntau, A. C. (2008). Loss of Function in

Phenylketonuria Is Caused by Impaired Molecular Motions and Conformational Instability.
The American Journal of Human Genetics, 83(1), 5–17.

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2008.05.013>

Gersting, S. W., Lotz-Havla, A. S., & Muntau, A. C. (2012). Bioluminescence resonance energy transfer: An emerging tool for the detection of protein-protein interaction in living cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 815, 253–263. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-424-7_19

Greer, W. L., Shehabeldin, A., Schulman, J., Junker, A., & Siminovitch, K. A. (1996). Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Human Genetics*, 98(6), 685–690.
<https://doi.org/10.1007/s004390050285>

Gresch, O., Engel, F. B., Nestic, D., Tran, T. T., England, H. M., Hickman, E. S., Körner, I., Gan, L., Chen, S., Castro-Obregon, S., Hammermann, R., Wolf, J., Müller-Hartmann, H., Nix, M., Siebenkotten, G., Kraus, G., & Lun, K. (2004). New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods (San Diego, Calif.)*, 33(2), 151–163.
<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2003.11.009>

Higgs, H. N., Blanchoin, L., & Pollard, T. D. (1999). Influence of the C terminus of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASp) and the Arp2/3 complex on actin polymerization. *Biochemistry*, 38(46), 15212–15222.

Ho, L. L., Ayling, J., Prosser, I., Kronenberg, H., Iland, H., & Joshua, D. (2001). Missense C168T in the Wiskott–Aldrich Syndrome protein gene is a common mutation in X-linked thrombocytopenia. *British Journal of Haematology*, 112(1), 76–80.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2001.02465.x>

Imai, K., Morio, T., Zhu, Y., Jin, Y., Itoh, S., Kajiwara, M., Yata, J.-I., Mizutani, S., Ochs, H. D., & Nonoyama, S. (2004). Clinical course of patients with WASP gene mutations. *Blood*, 103(2), 456–464. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1480>

Inoue, H., Kurosawa, H., Nonoyama, S., Imai, K., Kumazaki, H., Matsunaga, T., Sato, Y., Sugita, K., & Eguchi, M. (2002). X-linked thrombocytopenia in a girl. *British Journal of Haematology*, 118(4), 1163–1165.

- Jin, Y., Mazza, C., Christie, J. R., Giliiani, S., Fiorini, M., Mella, P., Gandellini, F., Stewart, D. M., Zhu, Q., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., & Ochs, H. D. (2004). Mutations of the Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP): Hotspots, effect on transcription, and translation and phenotype/genotype correlation. *Blood*, *104*(13), 4010–4019. <https://doi.org/10.1182/blood-2003-05-1592>
- Jo, E.-K., Futatani, T., Kanegane, H., Kubota, T., Lee, Y.-H., Jung, J.-A., Song, C.-H., Park, J.-K., Nonoyama, S., & Miyawaki, T. (2003). Mutational analysis of the WASP gene in 2 Korean families with Wiskott-Aldrich syndrome. *International Journal of Hematology*, *78*(1), 40–44.
- Khorchid, A., & Ikura, M. (2002). How calpain is activated by calcium. *Nature Structural & Molecular Biology*, *9*(4), 239–241. <https://doi.org/10.1038/nsb0402-239>
- Kim, A. S., Kakalis, L. T., Abdul-Manan, N., Liu, G. A., & Rosen, M. K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott–Aldrich syndrome protein. *Nature*, *404*(6774), 151–158. <https://doi.org/10.1038/35004513>
- Klein, C. (2006). Angeborene Immundefekte. In H. Gadner, G. Gaedicke, C. Niemeyer, & J. Ritter (Hrsg.), *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie* (S. 253–267). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-29036-2_24
- Kobayashi, R., Ariga, T., Nonoyama, S., Kanegane, H., Tsuchiya, S., Morio, T., Yabe, H., Nagatoshi, Y., Kawa, K., Tabuchi, K., Tsuchida, M., Miyawaki, T., & Kato, S. (2006). Outcome in patients with Wiskott-Aldrich syndrome following stem cell transplantation: An analysis of 57 patients in Japan. *British Journal of Haematology*, *135*(3), 362–366. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2006.06297.x>
- Kolluri, R., Shehabeldin, A., Peacocke, M., Lamhonwah, A. M., Teichert-Kuliszewska, K., Weissman, S. M., & Siminovitch, K. A. (1995). Identification of WASP mutations in patients with Wiskott-Aldrich syndrome and isolated thrombocytopenia reveals allelic heterogeneity at the WAS locus. *Human Molecular Genetics*, *4*(7), 1119–1126.
- Kwan, S., Hagemann, T. L., Blaese, R. M., Knutsen, A., & Rosen, F. S. (1995). Scanning of the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene: Identification of 18 novel alterations including a possible mutation hotspot at Arg86 resulting in thrombocytopenia, a mild WAS phenotype. *Human Molecular Genetics*, *4*(10), 1995–1998. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.10.1995>

- Kwan, S., Hagemann, T. L., Radtke, B. E., Blaese, R. M., & Rosen, F. S. (1995). Identification of mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome gene and characterization of a polymorphic dinucleotide repeat at DXS6940, adjacent to the disease gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92*(10), 4706–4710.
- Kwan, S. P., Lehner, T., Hagemann, T., Lu, B., Blaese, M., Ochs, H., Wedgwood, R., Ott, J., Craig, I. W., & Rosen, F. S. (1991). Localization of the gene for the Wiskott-Aldrich syndrome between two flanking markers, TIMP and DXS255, on Xp11.22-Xp11.3. *Genomics*, *10*(1), 29–33.
- Landy, A. (1989). Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, *58*, 913–949.
<https://doi.org/10.1146/annurev.bi.58.070189.004405>
- Lanzi, G., Moratto, D., Vairo, D., Masneri, S., Delmonte, O., Paganini, T., Parolini, S., Tabellini, G., Mazza, C., Savoldi, G., Montin, D., Martino, S., Tovo, P., Pessach, I. M., Massaad, M. J., Ramesh, N., Porta, F., Plebani, A., Notarangelo, L. D., ... Giliani, S. (2012). A novel primary human immunodeficiency due to deficiency in the WASP-interacting protein WIP. *The Journal of Experimental Medicine*, *209*(1), 29–34. <https://doi.org/10.1084/jem.20110896>
- Lemahieu, V., Gastier, J. M., & Francke, U. (1999). Novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene and their effects on transcriptional, translational, and clinical phenotypes. *Human Mutation*, *14*(1), 54–66. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1999\)14:1<54::AID-HUMU7>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1999)14:1<54::AID-HUMU7>3.0.CO;2-E)
- Litzman, J., Jones, A., Hann, I., Chapel, H., Strobel, S., & Morgan, G. (1996). Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome. *Archives of Disease in Childhood*, *75*(5), 436–439.
- Liu, D.-W., Zhang, Z.-Y., Zhao, Q., Jiang, L.-P., Liu, W., Tu, W.-W., Song, W.-X., & Zhao, X.-D. (2015). Wiskott-Aldrich syndrome/X-linked thrombocytopenia in China: Clinical characteristic and genotype-phenotype correlation. *Pediatric Blood & Cancer*, *62*(9), 1601–1608. <https://doi.org/10.1002/pbc.25559>
- Loyola Presa, J. G., de Carvalho, V. O., Morrisey, L. R., Bonfim, C. M., Abagge, K. T., Vasselai, A., & Marinoni, L. P. (2013). Cutaneous manifestations in patients with Wiskott-Aldrich

- syndrome submitted to haematopoietic stem cell transplantation. *Archives of Disease in Childhood*, 98(4), 304–307. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2011-300812>
- Luthi, J. N., Gandhi, M. J., & Drachman, J. G. (2003). X-linked thrombocytopenia caused by a mutation in the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) gene that disrupts interaction with the WAS protein (WASP)-interacting protein (WIP). *Experimental Hematology*, 31(2), 150–158.
- Lutskiy, M. I., Sasahara, Y., Kenney, D. M., Rosen, F. S., & Remold-O'Donnell, E. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome in a female. *Blood*, 100(8), 2763–2768. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-02-0388>
- Machesky, L. M., & Gould, K. L. (1999). The Arp2/3 complex: A multifunctional actin organizer. *Current Opinion in Cell Biology*, 11(1), 117–121.
- Machesky, L. M., Reeves, E., Wientjes, F., Mattheyse, F. J., Grogan, A., Totty, N. F., Burlingame, A. L., Hsuan, J. J., & Segal, A. W. (1997). Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodial protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochemical Journal*, 328(Pt 1), 105–112.
- Mahlaoui, N., Pellier, I., Mignot, C., Jais, J.-P., Bilhou-Nabéra, C., Moshous, D., Neven, B., Picard, C., de Saint-Basile, G., Cavazzana-Calvo, M., Blanche, S., & Fischer, A. (2013). Characteristics and outcome of early-onset, severe forms of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 121(9), 1510–1516. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-448118>
- Massaad, M. J., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2013). Wiskott-Aldrich syndrome: A comprehensive review. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1285(1), 26–43. <https://doi.org/10.1111/nyas.12049>
- Massaad, M. J., Ramesh, N., Le Bras, S., Giliani, S., Notarangelo, L. D., Al-Herz, W., Notarangelo, L. D., & Geha, R. S. (2011). A peptide derived from the Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein-interacting protein (WIP) restores WAS protein level and actin cytoskeleton reorganization in lymphocytes from patients with WAS mutations that disrupt WIP binding. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(4), 998-1005.e1-2. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.01.015>
- Moratto, D., Giliani, S., Bonfim, C., Mazzolari, E., Fischer, A., Ochs, H. D., Cant, A. J., Thrasher, A. J., Cowan, M. J., Albert, M. H., Small, T., Pai, S.-Y., Haddad, E., Lisa, A., Hambleton, S.,

- Slatter, M., Cavazzana-Calvo, M., Mahlaoui, N., Picard, C., ... Notarangelo, L. D. (2011). Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: An international collaborative study. *Blood*, *118*(6), 1675–1684. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-319376>
- Mullen, C. A., Anderson, K. D., & Blaese, R. M. (1993). Splenectomy and/or bone marrow transplantation in the management of the Wiskott-Aldrich syndrome: Long-term follow-up of 62 cases. *Blood*, *82*(10), 2961–2966.
- NCBI ClinVar - VCV000403608.3. (2021, Juni 17). VCV000403608.3—*ClinVar*— NCBI; Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/variation/403608/#id_second
- NCBI Gene - WIPF1. (2016, Dezember 9). WIPF1 WAS/WASL interacting protein family member 1 [*Homo sapiens (human)*]—Gene—NCBI; Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7456>
- Notarangelo, L. D., Mazza, C., Giliiani, S., D’Aria, C., Gandellini, F., Ravelli, C., Locatelli, M. G., Nelson, D. L., Ochs, H. D., & Notarangelo, L. D. (2002). Missense mutations of the WASP gene cause intermittent X-linked thrombocytopenia. *Blood*, *99*(6), 2268–2269.
- Nucleotide BLAST*. (2017, November 28). Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query; Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- Ochs, H. D. (2007). *Primary immunodeficiency diseases* (2. ed.). Oxford Univ. Press.
- Ochs, H. D. (2019). Wiskott-Aldrich syndrome. In Ted. W. Post (Hrsg.), *UpToDate*. UpToDate. <http://www.uptodate.com/contents/wiskott-aldrich-syndrome>
- Ochs, H. D., Filipovich, A. H., Veys, P., Cowan, M. J., & Kapoor, N. (2009). Wiskott-Aldrich syndrome: Diagnosis, clinical and laboratory manifestations, and treatment. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, *15*(1 Suppl), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.bbmt.2008.10.007>

- Ochs, H. D., & Thrasher, A. J. (2006). The Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *117*(4), 725–738; quiz 739. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2006.02.005>
- Oshima, K., Imai, K., Albert, M. H., Bittner, T. C., Strauss, G., Filipovich, A. H., Morio, T., Kapoor, N., Dalal, J., Schultz, K. R., Casper, J. T., Notarangelo, L. D., Ochs, H. D., & Nonoyama, S. (2015). Hematopoietic Stem Cell Transplantation for X-Linked Thrombocytopenia With Mutations in the WAS gene. *Journal of Clinical Immunology*, *35*(1), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s10875-014-0105-5>
- Ozsahin, H., Cavazzana-Calvo, M., Notarangelo, L. D., Schulz, A., Thrasher, A. J., Mazzolari, E., Slatter, M. A., Le Deist, F., Blanche, S., Veys, P., Fasth, A., Bredius, R., Sedlacek, P., Wulffraat, N., Ortega, J., Heilmann, C., O'Meara, A., Wachowiak, J., Kalwak, K., ... Fischer, A. (2008). Long-term outcome following hematopoietic stem-cell transplantation in Wiskott-Aldrich syndrome: Collaborative study of the European Society for Immunodeficiencies and European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*, *111*(1), 439–445. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-03-076679>
- Pai, S.-Y., DeMartini, D., Forino, C., Cavagnini, S., Lanfranchi, A., Giliani, S., Moratto, D., Mazza, C., Porta, F., Imberti, L., Notarangelo, L. D., & Mazzolari, E. (2006). Stem cell transplantation for the Wiskott-Aldrich syndrome: A single-center experience confirms efficacy of matched unrelated donor transplantation. *Bone Marrow Transplantation*, *38*(10), 671–679. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705512>
- Parolini, O., Ressmann, G., Haas, O. A., Pawlowsky, J., Gadner, H., Knapp, W., & Holter, W. (1998). X-linked Wiskott-Aldrich syndrome in a girl. *The New England Journal of Medicine*, *338*(5), 291–295. <https://doi.org/10.1056/NEJM199801293380504>
- Perez, F. (2013). *SerialCloner* (2.6.1) [Windows]. SerialBasics.
- Peterson, F. C., Deng, Q., Zettl, M., Prehoda, K. E., Lim, W. A., Way, M., & Volkman, B. F. (2007). Multiple WASP-interacting protein recognition motifs are required for a functional interaction with N-WASP. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(11), 8446–8453. <https://doi.org/10.2210/pdb2IFS/pdb>
- Pfleger, K. D. G., & Eidne, K. A. (2006). Illuminating insights into protein-protein interactions using bioluminescence resonance energy transfer (BRET). *Nature Methods*, *3*(3), 165–174.

<https://doi.org/10.1038/nmeth841>

- Proust, A., Guillet, B., Picard, C., de Saint Basile, G., Pondarré, C., Tamary, H., Dreyfus, M., Tchernia, G., Fischer, A., & Delaunay, J. (2007). Detection of 28 novel mutations in the Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia based on multiplex PCR. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 39(1), 102–106. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2007.02.007>
- Ramesh, N., Antón, I. M., Hartwig, J. H., & Geha, R. S. (1997). WIP, a protein associated with Wiskott–Aldrich syndrome protein, induces actin polymerization and redistribution in lymphoid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(26), 14671–14676.
- Rasband, W. (1997). *Imagej* (J 1.48k) [Java auf Linux]. U. S. National Institutes of Health.
- Reicher, B., Joseph, N., David, A., Pauker, M. H., Perl, O., & Barda-Saad, M. (2012). Ubiquitylation-dependent negative regulation of WASp is essential for actin cytoskeleton dynamics. *Molecular and Cellular Biology*, 32(15), 3153–3163. <https://doi.org/10.1128/MCB.00161-12>
- Rivero-Lezcano, O. M., Marcilla, A., Sameshima, J. H., & Robbins, K. C. (1995). Wiskott-Aldrich syndrome protein physically associates with Nck through Src homology 3 domains. *Molecular and Cellular Biology*, 15(10), 5725–5731.
- Sasahara, Y., Kawai, S., Kumaki, S., Ohashi, Y., Minegishi, M., & Tsuchiya, S. (2000). Novel mutations, no detectable mRNA and familial genetic analysis of the Wiskott-Aldrich syndrome protein gene in six Japanese patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *European Journal of Pediatrics*, 159(1–2), 23–30.
- Sasahara, Y., Rachid, R., Byrne, M. J., de la Fuente, M. A., Abraham, R. T., Ramesh, N., & Geha, R. S. (2002). Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation. *Molecular Cell*, 10(6), 1269–1281.
- Schatz, U. A. (2014). *Aufbau eines Systems zur Untersuchung peroxisomaler Protein-Protein-Interaktionen in der lebenden Zelle mittels Biolumineszenz Resonanzenergietransfer [Dissertation]* [Ludwig-Maximilians-Universität München]. https://edoc.ub.uni-muenchen.de/16988/1/Schatz_Ulrich_Andreas.pdf
- Schindelhauer, D., Weiss, M., Hellebrand, H., Golla, A., Hergersberg, M., Seger, R., Belohradsky,

- B. H., & Meindl, A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome: No strict genotype-phenotype correlations but clustering of missense mutations in the amino-terminal part of the WASP gene product. *Human Genetics*, *98*(1), 68–76.
- Schuster, V., Böhrer, T., & Klein, C. (2004). Wiskott-Aldrich-Syndrom (WAS). *Allergologie*, *27*(04), 184–188. <https://doi.org/10.5414/ALP27184>
- Shin, C. R., Kim, M.-O., Li, D., Bleesing, J. J., Harris, R., Mehta, P., Jodele, S., Jordan, M. B., Marsh, R. A., Davies, S. M., & Filipovich, A. H. (2012). Outcomes following hematopoietic cell transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome. *Bone Marrow Transplantation*, *47*(11), 1428–1435. <https://doi.org/10.1038/bmt.2012.31>
- Stewart, D. M., Tian, L., & Nelson, D. L. (1999). Mutations That Cause the Wiskott-Aldrich Syndrome Impair the Interaction of Wiskott-Aldrich Syndrome Protein (WASP) with WASP Interacting Protein. *The Journal of Immunology*, *162*(8), 5019–5024.
- Sullivan, K. E., Mullen, C. A., Blaese, R. M., & Winkelstein, J. A. (1994). A multiinstitutional survey of the Wiskott-Aldrich syndrome. *The Journal of Pediatrics*, *125*(6 Pt 1), 876–885.
- Thompson, L. J., Lalloz, M. R., & Layton, D. M. (1999). Unique and recurrent WAS gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, *25*(3–4), 218–226.
- Torres, E., & Rosen, M. K. (2003). Contingent phosphorylation/dephosphorylation provides a mechanism of molecular memory in WASP. *Molecular Cell*, *11*(5), 1215–1227.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(9), 4350–4354.
- Uniprot: WIPF1*. (2016, Dezember 9). 2016-12-09 15:48:21. <http://www.uniprot.org/uniprot/O43516>
- van der Gucht, J., Paluch, E., Plastino, J., & Sykes, C. (2005). Stress release drives symmetry breaking for actin-based movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(22), 7847–7852. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502121102>
- Volkman, B. F., Prehoda, K. E., Scott, J. A., Peterson, F. C., & Lim, W. A. (2002). Structure of the

N-WASP EVH1 domain-WIP complex: Insight into the molecular basis of Wiskott-Aldrich Syndrome. *Cell*, 111(4), 565–576.

Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W.-L., & Cooper, J. A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Current Opinion in Cell Biology*, 15(1), 23–30.

Wengler, G. S., Notarangelo, L. D., Berardelli, S., Pollonni, G., Mella, P., Fath, A., Ugazio, A. G., & Parolini, O. (1995). High prevalence of nonsense, frame shift, and splice-site mutations in 16 patients with full-blown Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood*, 86(10), 3648–3654.

Wiskott, A. (1937). *Familiärer, angeborener Morbus Werlhofii*. 68, 212–216.

Worth, A. J. J., Metelo, J., Bouma, G., Moulding, D., Fritzsche, M., Vernay, B., Charras, G., Cory, G. O. C., Thrasher, A. J., & Burns, S. O. (2013). Disease-associated missense mutations in the EVH1 domain disrupt intrinsic WASp function causing dysregulated actin dynamics and impaired dendritic cell migration. *Blood*, 121(1), 72–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-403857>

Yates, A., Akanni, W., Amode, M. R., Barrell, D., Billis, K., Carvalho-Silva, D., Cummins, C., Clapham, P., Fitzgerald, S., Gil, L., Girón, C. G., Gordon, L., Hourlier, T., Hunt, S. E., Janacek, S. H., Johnson, N., Juettemann, T., Keenan, S., Lavidas, I., ... Flicek, P. (2016). Ensembl 2016. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D710–D716. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1157>

Zhang, Z.-Y., Xiao, H.-Q., Jiang, L.-P., Zhou, Y., Zhao, Q., Yu, J., Liu, W., Yang, X.-Q., & Zhao, X.-D. (2010). Analysis of clinical and molecular characteristics of Wiskott–Aldrich syndrome in 24 patients from 23 unrelated Chinese families. *Pediatric Allergy and Immunology*, 21(3), 522–532. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.00996.x>

Zhu, Q., Christie, J., Tyler, E., & et, A. (2002). X-chromosome inactivation in symptomatic carrier females of X-linked thrombocytopenia. *Clin Immunol.*, 103.

Zhu, Q., Watanabe, C., Liu, T., Hollenbaugh, D., Blaese, R. M., Kanner, S. B., Aruffo, A., & Ochs, H. D. (1997). Wiskott-Aldrich Syndrome/X-Linked Thrombocytopenia: WASP Gene Mutations, Protein Expression, and Phenotype. *Blood*, 90(7), 2680–2689. <https://doi.org/10.1182/blood.V90.7.2680>

13 Anhang

Tabelle A-1: Die hier aufgeführten Messwerte wurden von Dr. Tanja Bittner in der Arbeitsgruppe Muntau/Gersting der er Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Doktor von Haunerschen Kinderspital, Ludwig-Maximilians-Universität, München, nach den gleichen Protokollen wie in dieser Arbeit erstellt und wurden bislang nicht veröffentlicht.

Variante	BRET50	Bestimmtheitsmaß
	WIP vs. WASP	
WT	0,148	0,882
H30del	0,568	0,903
T45M	0,241	0,814
V75M	0,493	0,955
R86C	0,587	0,952
F114I	0,697	0,954
D121insGD	0,535	0,904
E133K	0,949	0,863
Q185X	0,210	0,918
R211X	0,146	0,754
L270P	0,278	0,924
R321X	0,262	0,846

14 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich noch denen gegenüber meinen Dank zum Ausdruck bringen die mir diese Dissertation ermöglicht haben.

Zuerst gilt mein Dank Prof. Dr. Søren Gersting und Prof. Dr. Ania Muntau.

Herr Prof. Dr. Gersting hat es mir ermöglicht dieses Thema zu erforschen. Durch seine Ausdauer und Unterstützung sowie seine Anregung und wissenschaftliche Betreuung nahm diese Arbeit in vielen Gesprächen und Diskussionen Form und Gestalt an. Seine Unterstützung ermöglichte mir das Else-Kröner-Fresenius-Stipendium.

Zu Beginn meines wissenschaftlichen Arbeitens hatte ich die Möglichkeit ein breites Repertoire an system- und molekularbiologischen Methoden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Muntau zu erlernen.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern dieser Arbeitsgruppe für ihre stetige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Klein möchte ich für sein wissenschaftliches Feedback und Votum für mich gegenüber der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken. Insbesondere meiner Mutter, aber auch meiner Tante Annemarie, die mich durch Gespräch und Diskussion unterstützt hat.

Ganz besonderer Dank allerdings gilt meiner Frau Marie, ohne deren bedingungslose Geduld und Unterstützung ich diese Arbeit nie hätte fertigstellen können.

15 Eidesstattliche Versicherung

Zorn, Gabriel

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema:

Über den Einfluss von Mutationen des Wiskott-Aldrich-Syndrom-Proteins (WASp) auf die Interaktion von WASp und dem WASp-Interaktionsprotein (WIP) und dem klinischen Phänotyp des Wiskott-Aldrich-Syndroms.

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 25.03.2023
Ort, Datum

Gabriel Zorn
Unterschrift Doktorand

17 Publikationsliste

Sabrina Schmoll, Katrin Romanek, Gabriel Zorn, Hans Eiglmeier, Florian Eyer (2021)
Anticholinergic syndrome after atropine overdose in a supposedly homeopathic
solution: a case report; Clin Toxicol (Phila). 2022 Feb;60(2):252-254. doi:
10.1080/15563650.2021.1918704. Epub 2021 May 14. PMID: 33988064.