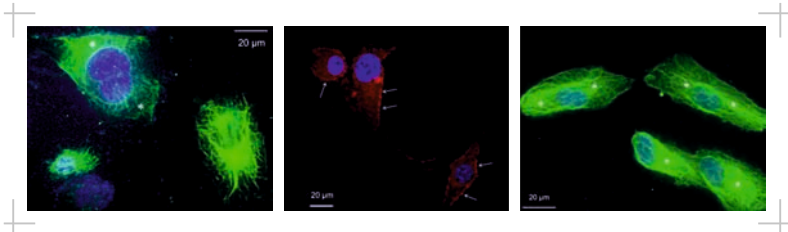


Julia Weber

Beschreibung der intrazellulären Lokalisation
der Wildtyp-RDH5 und mutierter RDH5
im Vergleich zum RLBP1



INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des
Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



edition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Beschreibung der intrazellulären Lokalisation
der Wildtyp-RDH5 und mutierter RDH5
im Vergleich zum RLBP1

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Julia Weber

aus Lich

Gießen 2014

Aus der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH,

Standort Gießen

Direktorin: Prof. Dr. Birgit Lorenz

Gutachter: PD Dr. Preising

Gutachter: Prof. Dr. Schneider

Tag der Disputation: 26.11.2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Phototransduktion in der Retina	1
1.2 Der Retinolzyklus	3
1.2.1 Der stäbchenspezifische Retinolzyklus	3
1.2.2 Der zapfenspezifische Retinolzyklus	6
1.3 Lokalisation und Interaktion der Proteine RDH5 und RLBP1 im retinalen Pigmentepithel	8
1.4 Mutationen im <i>RLBP1</i> -Gen und deren Phänotypen	11
1.4.1 Retinitis pigmentosa	11
1.4.2 Retinitis punctata albescens	12
1.4.3 Bothnische Dystrophie	13
1.4.4 Neufundland Zapfen-Stäbchen-Dystrophie.....	13
1.5 Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen und deren Phänotyp	13
1.6 Vergleich zwischen den Phänotypen bei <i>RLBP1</i> - und <i>RDH5</i> -Genmutationen	15
1.7 Wirkungen von Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen auf molekularer Ebene.....	16
1.7.1 Die Punktmutation p.G238W im <i>RDH5</i> -Gen	17
1.7.2 Die Punktmutation p.A294P im <i>RDH5</i> -Gen	19
1.8 Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Geräteliste.....	22
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	23
2.1.3 Chemikalien	24
2.1.4 Enzyme.....	25
2.1.5 Primer	25
2.1.6 Vektoren und Plasmide	26
2.1.6.1 pCR [®] 2.1-TOPO [®]	26
2.1.6.2 pcDNA3.1+	26
2.1.6.3 pEGFP-N1.....	27
2.1.7 Größenmarker.....	28
2.1.8 Antikörper zur Proteincharakterisierung.....	28

2.1.9	Stammlösungen	28
2.1.10	Medien.....	30
2.1.10.1	Bakterienkultur	30
2.1.10.2	Zellkultur.....	31
2.1.11	Bakterien	31
2.1.12	Zelllinien	31
2.1.12.1	HEK 293T	31
2.1.12.2	HeLa.....	32
2.1.12.3	ARPE-19	32
2.1.13	Reagenziensysteme und Kits.....	32
2.2	Methoden.....	33
2.2.1	Two step-Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion	33
2.2.1.1	Reverse Transkription	33
2.2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion.....	34
2.2.2	Agarose-Gelelektrophorese	35
2.2.3	TOPO TA Cloning-Kit.....	36
2.2.3.1	TA-Klonierung in den pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor	36
2.2.3.2	Transformation in TOP10 kompetente Zellen	37
2.2.4	Mini-Präparation	38
2.2.5	Restriktionsverdau der Plasmid-DNA.....	38
2.2.6	Bestimmung des DNA-Gehaltes im Photometer	39
2.2.7	Sequenzierung	40
2.2.8	Herstellen von Glyzerinstocks	40
2.2.9	Midi-Präparation	40
2.2.10	DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel	41
2.2.11	Vektor-Dephosphorylierung.....	42
2.2.12	Ligation	42
2.2.12.1	Ligation der Gene RLBP1 und RDH5 in den Expressionsvektor pcDNA3.1+	43
2.2.12.2	Religation des RLBP1-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1+	43
2.2.12.3	Ligation stumpfer Enden.....	43
2.2.13	Herstellung elektrokompenter XL1-Blue <i>E.coli</i>	44
2.2.14	Transformation in XL1-Blue <i>E.coli</i>	44

2.2.15	Maxi-Präparation.....	45
2.2.16	Mutagenese-PCR.....	46
2.2.17	Kultivierung der HEK293T- und HeLa-Zellen.....	47
2.2.17.1	Kryokonservierung der HEK293T- und HeLa-Zellen.....	48
2.2.18	Transfektion durch Lipofektion.....	48
2.2.18.1	Lipofectamine LTX-Kit.....	48
2.2.18.2	Roti [®] -Fect Plus.....	49
2.2.19	M-PER-Proteinextraktionsreagens.....	49
2.2.20	Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit.....	50
2.2.21	Die denaturierende diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämli.....	50
2.2.22	Western-Blot.....	53
2.2.23	Immunhistochemie.....	55
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Klonierung des <i>RDH5</i> -Gens.....	58
3.1.1	Amplifikation des <i>RDH5</i> -Gen-Transkriptes.....	58
3.1.2	Klonierung des <i>RDH5</i> -Gens in den pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor.....	59
3.1.3	Klonierung des <i>RDH5</i> -Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1+.....	61
3.2	Klonierung des <i>RLBP1</i> -Gens.....	64
3.2.1	Amplifikation des <i>RLBP1</i> -Gens.....	64
3.2.2	Klonierung des <i>RLBP1</i> -Gens in den pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor.....	65
3.2.3	Klonierung des <i>RLBP1</i> -Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1+.....	67
3.3	Einfügen der Punktmutation p.G238W in das <i>RDH5</i> -Gen.....	72
3.3.1	Mutagenese-PCR.....	72
3.3.2	Ligation stumpfer Enden.....	73
3.4	Einfügen der Punktmutation p.A294P in das <i>RDH5</i> -Gen.....	76
3.4.1	Mutagenese-PCR.....	76
3.4.2	Ligation stumpfer Enden.....	77
3.5	Darstellung der Expression des <i>RLBP1</i> -Gens im Western-Blot.....	79
3.6	Darstellung der Expression des Wildtyp- <i>RDH5</i> -Gens und der <i>RDH5</i> -Mutanten im Western-Blot.....	80
3.7	Darstellung der intrazellulären Lokalisation des Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen.....	82

3.8	Darstellung der intrazellulären Lokalisation der Wildtyp-RDH5 in ARPE-19-Zellen	83
3.9	Darstellung der intrazellulären Lokalisation des heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RLBP1	85
3.10	Darstellung der intrazellulären Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 sowie der RDH5-Mutanten	86
4	Diskussion	90
4.1	Klonierung der Gene	91
4.2	Mutagenese.....	91
4.3	Darstellung der Genexpression durch den Western-Blot	92
4.3.1	Expression des Wildtyp-RLBP1 und der Wildtyp-RDH5	92
4.3.2	Expression der mutierten RDH5 ^{G238W} und RDH5 ^{A294P}	93
4.4	Darstellung der Genexpression und Lokalisation der Proteine mittels Immunhistochemie	94
4.4.1	Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 im Vergleich zur Lokalisation der RDH5 in ARPE-19-Zellen.....	95
4.4.2	Lokalisation des heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RLBP1 im Vergleich zur Lokalisation des RLBP1 in ARPE-19-Zellen.....	97
4.4.3	Vergleich zwischen der Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten	98
4.4.4	Lokalisation der Wildtyp-RDH5 im Vergleich zur Lokalisation des Wildtyp-RLBP1	101
4.4.5	Lokalisation der RDH5-Mutanten im Vergleich zur Lokalisation des Wildtyp-RLBP1	102
4.5	Schlussfolgerung bezüglich der Wirkung der Mutationen im <i>RDH5</i> -Gen auf die Lokalisation und Interaktion zwischen RDH5 und RLBP1	104
4.6	Ausblick.....	105
5	Zusammenfassung	108
6	Summary	110
7	Abkürzungsverzeichnis	112
8	Abbildungsverzeichnis	117
9	Tabellenverzeichnis	119
10	Literaturverzeichnis	120
	Erklärung zur Dissertation	138

Danksagung..... 139

1 Einleitung

Die Erkrankung Fundus albipunctatus ist mit Mutationen im *RDH5*-Gen verknüpft. Fundus albipunctatus kann zur Nachtblindheit und Netzhautdystrophie führen. Das *RDH5*-Gen kodiert für die Retinoldehydrogenase 5, einem Enzym des Retinolzyklus [Yamamoto *et al.* 1999, Yamamoto *et al.* 2003].

Der Retinolzyklus findet im retinalen Pigmentepithel (RPE) statt. Das RPE ist eine Zellschicht, die apikal im direkten Kontakt mit den Photorezeptoren in der Netzhaut steht und basal die Netzhaut gegenüber der Aderhaut abschließt [Strauss 2005].

Für die Phototransduktion benötigen die Photorezeptoren den lichtempfindlichen Chromophor 11-cis-Retinal, um Licht absorbieren und über eine Enzymkaskade in ein Nervensignal umwandeln zu können. Das Nervensignal erzeugt im Gehirn einen Seheindruck.

Der Retinolzyklus im RPE dient der Bereitstellung von 11-cis-Retinal für die Photorezeptoren. Mit der Nahrung nimmt der Mensch Vitamin A (all-trans-Retinol) auf. All-trans-Retinol muss in mehreren enzymatischen Schritten des Retinolzyklus zu 11-cis-Retinal umgewandelt werden, damit es für den Sehvorgang zur Verfügung stehen kann [Marmorstein 2001, Thompson und Gal 2003].

Außerdem kann all-trans-Retinal, das nach der Lichtabsorption in den Photorezeptoren entsteht, durch den Retinolzyklus wieder enzymatisch zu 11-cis-Retinal regeneriert werden [Marmorstein 2001].

Treten Mutationen in den am Retinolzyklus beteiligten Enzymen auf, können daraus Funktionsverluste dieser Enzyme resultieren. Die Funktionsverluste der Enzyme können den Retinolzyklus und damit die Bereitstellung von 11-cis-Retinal stören. Dadurch können Erkrankungen der Netzhaut hervorgerufen werden [Thompson und Gal 2003].

1.1 Die Phototransduktion in der Retina

Unter der Phototransduktion wird der Prozess der Umwandlung des optischen Signals in ein elektrisches Nervensignal verstanden. Die Phototransduktion findet in den Außensegmenten der Photorezeptoren statt. Dort befinden sich sogenannte Diskmembranen, die aus einer Lipiddoppelschicht bestehen, worin dicht gepackt das Photopigment Rhodopsin eingebettet liegt.

Rhodopsin besteht aus dem lichtempfindlichen Chromophor 11-cis-Retinal und dem Apo-Protein Opsin. Im dunkeladaptierten Zustand liegt 11-cis-Retinal kovalent über

eine Schiff'sche Base an ein Lysin im Opsin gebunden vor. In diesem Zustand ist Rhodopsin inaktiv.

Die Absorption eines Lichtquants führt zur Isomerisierung des 11-cis-Retinals zu all-trans-Retinal, das Konformationsänderungen im Rhodopsin auslöst und damit dieses aktiviert. Das aktivierte Rhodopsin wird auch als Metarhodopsin II bezeichnet [Lamb und Pugh 2006].

Das aktivierte Rhodopsin aktiviert das G-Protein Transducin. Die Aktivierung kann nur stattfinden, wenn beide Moleküle miteinander in Kontakt kommen und eine Bindung eingehen. Dies ist durch die laterale Diffusion der Moleküle möglich, wobei sich Rhodopsin innerhalb der Diskmembran bewegt, während Transducin sich entlang der zytoplasmatischen Seite an der Membranoberfläche bewegt [Burns und Lamb 1993]. Das G-Protein Transducin besitzt eine α -, β - und γ -Untereinheit. Im inaktiven Zustand bindet Guanosindiphosphat (GDP) an die α -Untereinheit des Transducins. Nach der Aktivierung durch Rhodopsin wird das GDP freigesetzt und Guanosintriphosphat (GTP), das im Zytoplasma vorliegt, bindet stattdessen an die α -Untereinheit. Durch diesen Prozess wird das G-Protein aktiviert, das anschließend von dem aktivierten Rhodopsin dissoziiert. Das aktivierte Rhodopsin wird durch diese Interaktion nicht verändert, sodass es noch an weitere G-Proteine binden und diese aktivieren kann.

Im nächsten Schritt dissoziiert die α -Untereinheit mit dem gebundenen GTP (G_{α} -GTP) von der β - und γ -Untereinheit des G-Proteins Transducin. Anschließend bewegt sich G_{α} -GTP entlang der Diskmembran und bindet an eine der zwei γ -Untereinheiten der sich dort befindenden retinalen cGMP-Phosphodiesterase 6 (PDE6). Zur vollständigen Aktivierung der PDE6 muss ein weiterer G_{α} -GTP-Komplex an die zweite γ -Untereinheit der PDE6 binden. Dadurch werden die α - und β -Untereinheiten der PDE6 aktiviert, die die Hydrolyse des zyklischen Guanosinmonophosphats (cGMP) zu Guanosinmonophosphat (GMP) katalysieren [Lamb und Pugh 2006].

Im dunkeladaptierten Zustand synthetisiert eine Guanylatzyklase cGMP, wodurch im Zytoplasma eine konstante Konzentration an cGMP vorliegt. Das cGMP bindet an Ionenkanäle, die sich in der Plasmamembran der Photorezeptorzelle befinden. Die Ionenkanäle werden durch die Bindung von cGMP offen gehalten. Dadurch kommt es zu einem konstanten Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} in die Photorezeptorzelle. Dieser Einstrom depolarisiert die Plasmamembran der Photorezeptoraußensegmente und sorgt

für eine ständige Freisetzung des Neurotransmitters Glutamat an den Synapsen der Photorezeptorzellen [Wang und Kefalov 2011].

Bei Belichtung werden jedoch die Proteine Rhodopsin und Transducin aktiviert, die zur Aktivierung der PDE6 führen, woraufhin cGMP vermehrt hydrolysiert wird, sodass die Konzentration von cGMP im Zytoplasma abfällt [Lamb und Pugh 2006]. Daraus resultiert, dass die Ionenkanäle in der Plasmamembran der Photorezeptoraußensegmente nicht mehr offen gehalten werden, sodass der Einstrom von Na^+ und Ca^{2+} blockiert und die Plasmamembran der Photorezeptoraußensegmente hyperpolarisiert wird. Infolgedessen reduziert sich die Freisetzung von Glutamat an den Synapsen. So wird das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umgewandelt und an die postsynaptischen Bipolarzellen weitergeleitet [Wang und Kefalov 2011].

Der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{K}^+$ -Austauscher pumpt, während die Ionenkanäle geschlossen sind, weiterhin Ca^{2+} aus der Zelle hinaus, sodass sich die zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration verringert. Das stimuliert die Aktivität der Guanylatzyklase. Die Aktivierung der Guanylatzyklase führt wiederum zur Erhöhung von cGMP und erneuter Öffnung der Ionenkanäle [Lamb und Pugh 2006, Wang und Kefalov 2011].

1.2 Der Retinolzyklus

Der Retinolzyklus dient der Wiederherstellung der Lichtempfindlichkeit des Sehpigments Rhodopsin in den Stäbchen und der Opsine in den Zapfen [Mata *et al.* 2002].

1.2.1 Der stäbchenspezifische Retinolzyklus

Die Absorption eines Lichtquants durch Rhodopsin induziert die Isomerisierung von 11-cis-Retinal zu all-trans-Retinal. Rhodopsin wird zu Metarhodopsin II aktiviert [Lamb und Pugh 2004, Radu *et al.* 2008]. In dieser unphosphorylierten Form aktiviert Metarhodopsin II das G-Protein Transducin. Um die Aktivierung von Transducin zu beenden, muss Metarhodopsin II inaktiviert werden. Dies geschieht, indem es durch die Rhodopsinkinase phosphoryliert wird. Das inhibitorische Protein Arrestin bindet anschließend an das phosphorylierte Metarhodopsin II und blockiert damit den Zugang von Transducin zur zytoplasmatischen Seite des Metarhodopsins II. Infolgedessen kommt es zur Hydrolyse der Schiff'schen Basenbindung und zum Zerfall des Metarhodopsins II in all-trans-Retinal und Opsin [Lamb und Pugh 2004].

All-trans-Retinal dissoziiert von Opsin. Opsin liegt danach als Apo-Protein vor und ist unempfindlich für Licht. Um die Lichtsensibilität des Apo-Opsins wiederherzustellen, muss all-trans-Retinal über den Retinolzyklus zu 11-cis-Retinal zurückisomerisiert werden. Anschließend kann sich 11-cis-Retinal wieder mit dem Apo-Opsin zu Rhodopsin verbinden [Radu *et al.* 2008].

Das nach Hydrolyse der Schiff'schen Basenbindung freigesetzte all-trans-Retinal wird zunächst durch eine ATP-abhängige Flippase (ABCA4) von der intradiskal gelegenen Seite der Diskmembran auf die zytosolische Seite der Diskmembran in den Außensegmenten der Photorezeptorzelle transportiert [Weng *et al.* 1999]. Dort katalysiert die all-trans-Retinaldehydrogenase 8 mit Unterstützung der all-trans-Retinaldehydrogenase 12 die Reduktion von all-trans-Retinal zu all-trans-Retinol, wobei $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Wasserstoffdonor dient [Parker und Crouch 2010]. Nach der Reduktion wird die Rezeptorblockade des Apo-Opsins durch Arrestin aufgehoben und die Chromophorbindestelle wird wieder zugänglich [Hofmann *et al.* 1992].

Das lipophile all-trans-Retinol verlässt die Photorezeptorzelle durch passive nichtionische Diffusion durch die Zellmembran [Amengual *et al.* 2012].

Da die Vitamin A-Metabolite - hierzu gehören unter anderem die Retinoide all-trans-Retinal und all-trans-Retinol - hydrophob sind, liegen sie *in vivo* an wasserlösliche Proteine gebunden vor [Noy 2000]. So wird all-trans-Retinol, gebunden an das Interphotorezeptor-Retinoid-bindende Protein (IRBP, RBP4), durch die Interphotorezeptormatrix zum RPE transportiert [Saari 2000].

Auch aus der Blutbahn wird all-trans-Retinol in die Zellen des RPEs aufgenommen [Imanishi *et al.* 2004a]. Das mit der Nahrung aufgenommene Retinol wird im Blut entweder in Form von Retinylestern in Chylomikronen oder an ein Retinol-bindendes Protein (RBP) spezifisch gebunden transportiert. Im Fastenzustand liegen über 95% der Retinoide in der Blutzirkulation an ein RBP gebunden vor, während postprandial die Retinylester in den Chylomikronen dominieren [D'Ambrosio *et al.* 2011]. Das RBP mobilisiert Retinol aus Retinylestervorräten, die hauptsächlich in der Leber lokalisiert sind, und transportiert es über die Blutzirkulation zu den Zielzellen. Dieses spezifische Retinol-Transportsystem dient der Erhaltung der Homöostase. Vitamin A bleibt für die

Zielzellen auch dann erhältlich, wenn mit der Nahrung kein Vitamin A aufgenommen wird [Amengual *et al.* 2012].

Im RPE bindet all-trans-Retinol an das zelluläre Retinol-bindende Protein Typ I (CRBPI, RBP1) [Noy 2000]. Das CRBPI besitzt eine 100fach höhere Affinität für Retinol im Vergleich zu dem IRBP und fördert damit den Transport des Retinols durch die Interphotorezeptormatrix zum RPE [Edwards und Adler 1994]. Das CRBPI transportiert all-trans-Retinol zum Endoplasmatischen Retikulum (ER), wo es durch die dort lokalisierte Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT) verestert wird [Imanishi *et al.* 2004a]. Die LRAT katalysiert den Transfer einer Fettsäure aus der *sn*-1-Position des Phosphatidylcholins, üblicherweise des Dipalmitoyl-Phosphatidylcholins, auf all-trans-Retinol. Durch diese Reaktion entstehen 1-Lyso-Phosphatidylcholin und ein all-trans-Retinylester, typischerweise dementsprechend all-trans-Retinylpalmitat [Kaschulaa *et al.* 2006].

Die all-trans-Retinylester können in Retinosomen gespeichert werden. Retinosomen sind Fettkörperchen, die am ER entstehen, sich von dort abschnüren und aus einem all-trans-Retinylester-haltigen hydrophoben Kern, umgeben von einer Monomembranschicht des ERs, bestehen. Sie sind unabhängige intrazelluläre Strukturen, die sich jedoch in der Nähe der Plasmamembran oder der Membranen anderer intrazellulärer Zellorganellen befinden [Imanishi *et al.* 2004b].

Eine Isomerohydrolase verwendet als Ausgangsprodukt die all-trans-Retinylester, um diese zu 11-cis-Retinol zu isomerisieren. Zuerst wird die Esterbindung hydrolysiert, wodurch all-trans-Retinol und eine freie Fettsäure entstehen. Die dabei freiwerdende Energie wird für die Isomerisierung der *trans*- in die *cis*-Konfiguration benötigt [Gollapalli und Rando 2003]. Bei dieser Isomerohydrolase handelt es sich um ein membranständiges RPE-spezifisches 65 kDa-Protein (RPE65). Um die Membranverbindung herstellen zu können, müssen Cystein-Bindungsstellen des RPE65 palmitoyliert werden. Die Membranständigkeit des RPE65 ist notwendig, da es nur so die stark hydrophoben all-trans-Retinylester im Innern der Membran erreichen kann [Takahashi *et al.* 2006].

Das nach der Isomerisierung entstandene 11-cis-Retinol wird anschließend durch das zelluläre Retinaldehyd-bindende Protein (RLBP1 *alias* CRAIBP) nichtkovalent gebunden [Saari *et al.* 2001]. RLBP1 stimuliert die Reaktion der Isomerohydrolase um

das 50fache [Saari und Crabb 2005]. RLBP1 ist ein wasserlösliches Protein mit einer hochaffinen hydrophoben Bindungsstelle sowohl für 11-cis-Retinol als auch für 11-cis-Retinal [Saari *et al.* 2001]. Die Affinität für 11-cis-Retinal ist etwa 2,5fach höher [Humbert *et al.* 2006, Saari und Crabb 2005, Saari *et al.* 2009]. RLBP1 dient als Substratträgerprotein von 11-cis-Retinol. 11-cis-Retinol wird anschließend durch die 11-cis-Retinoldehydrogenase 5 (RDH5) zu 11-cis-Retinal oxidiert. Dabei dient NAD^+ als Kofaktor [Parker und Crouch 2010]. RLBP1 beeinflusst die Aktivität der RDH5, indem es der RDH5 11-cis-Retinol bereitstellt [Wu *et al.* 2006]. 11-cis-Retinol kann jedoch auch verestert und als 11-cis-Retinylester im RPE gespeichert werden. RLBP1 stimuliert allerdings die Oxidation von 11-cis-Retinol zu 11-cis Retinal, während es die Veresterung hemmt [Saari *et al.* 1994]. 11-cis-Retinylester werden im dunkeladaptierten Zustand aufgebaut [Bridges 1976] und können bei Belichtung hydrolysiert und als 11-cis-Retinal für die Regenerierung des Sehpigments weiterverwendet werden [Saari *et al.* 1994].

An RLBP1 gebunden wird 11-cis-Retinal an den apikalen Zellpol der retinalen Pigmentepithelzelle transportiert. Von dort aus gelangt 11-cis-Retinal in die extrazelluläre Interphotorezeptormatrix, wo es wieder an das IRBP bindet, welches 11-cis-Retinal zurück zu den Außensegmenten der Photorezeptorzelle bringt [Wang und Kefalov 2011]. Aufgrund des aktiven Abtransports des 11-cis-Retinals durch das IRBP vom RPE wird die Freisetzung von neuem 11-cis-Retinal aus dem RPE gefördert sowie die Konversion von all-trans-Retinol zu neuem 11-cis-Retinal beschleunigt [Edwards und Adler 2000]. Nachdem 11-cis-Retinal in die Photorezeptorzelle gelangt ist, verbindet es sich erneut mit dem Apo-Opsin zu Rhodopsin. Damit ist das Sehpigment wiederhergestellt [Saari 2000].

1.2.2 Der zapfenspezifische Retinolzyklus

Verschiedene Studien legen nahe, dass es einen zapfenspezifischen Retinolzyklus gibt. Zunächst einmal unterscheidet sich die Dunkeladaptation der Zapfen von der der Stäbchen. Im Anschluss an die Adaptation des Auges an gewöhnliches helles Licht läuft die Dunkeladaptation in zwei Teilschritten ab. Der erste Schritt beginnt sofort, läuft schnell innerhalb von drei bis vier Minuten ab, und entspricht der Funktion der Zapfen, während der zweite Schritt etwas später einsetzt und mindestens dreißig Minuten dauert. Er entspricht der Funktion der Stäbchen [Hecht *et al.* 1937]. Trotz der

vergleichbaren Entfärbung des Sehpigments in den Zapfen und Stäbchen nach der Exposition mit hellem Licht findet die Dunkeladaptation in den Zapfen viel schneller statt als in den Stäbchen. Da nach der Exposition mit hellem Licht die Regeneration des Sehpigments essentiell ist, um die dunkeladaptierte Sensitivität wiederherzustellen, impliziert die enorme Differenz in der Dunkeladaptation zwischen den Zapfen und Stäbchen, dass das Sehpigment in den Zapfen wesentlich schneller regeneriert wird als in den Stäbchen [Wang und Kefalov 2011]. Die maximale Regenerationsrate des Sehpigments ist in den Zapfen 2000mal höher als in den Stäbchen [Mata *et al.* 2002]. Die Regeneration des Sehpigments wird bestimmt durch die lokale Konzentration von 11-cis-Retinal. Nach langer Lichtexposition wird die Regeneration des Sehpigments durch die Rate, zu der 11-cis-Retinal an das Opsin in den Außensegmenten geliefert wird, limitiert [Lamb und Pugh 2004]. Dies untermauert die Vermutung, dass die Zapfen möglicherweise über einen zusätzlichen zapfenspezifischen Retinolzyklus wesentlich schneller mit dem Chromophor 11-cis-Retinal versorgt werden können als die Stäbchen [Wang und Kefalov 2011]. Unter Tageslichtverhältnissen sind die Stäbchen gesättigt und der Sehvorgang wird komplett durch die Zapfen übernommen. Jedoch ist die maximale Durchlaufrate des Chromophors durch den bekannten Retinolzyklus zu langsam, um die bei Helligkeit erhaltene Photosensitivität erklären zu können [Mata *et al.* 2002]. Außerdem können entfärbte, isolierte Zapfen ihre Lichtsensitivität zurückerlangen, wenn sie entweder mit 11-cis-Retinal oder 11-cis-Retinol versorgt werden, während entfärbte, isolierte Stäbchen ihre Lichtsensitivität nur unter Hinzugabe von 11-cis-Retinal, nicht aber 11-cis-Retinol, regenerieren [Jones *et al.* 1989]. Dies bedeutet, dass die Zapfen einen Zugang zu 11-cis-Retinol in der Retina besitzen und damit einen anderen Weg der Regeneration des Sehpigments einschlagen können [Muniz *et al.* 2007]. Außerdem liegen in zapfenreichen Retinae besonders hohe Konzentrationen an 11-cis-Retinyestern in der Retina vor, während in stäbchenreichen Retinae vorzugsweise all-trans-Retinyester vorliegen, die hauptsächlich im RPE lokalisiert sind [Rodriguez und Tsin 1989]. In zapfenreichen Retinae liegt außerdem eine hohe Aktivität der Retinyesterhydrolase vor, die die Retinyester wieder zu freien Retinoiden hydrolysiert. Diese können zur Regeneration des Sehpigments in den Zapfen verwendet werden [Bustamante *et al.* 1995]. Zudem wurde RLBP1 in den Müller-Gliazellen der Retina nachgewiesen. Dieses RLBP1 unterschied sich in seiner Funktion von dem RLBP1 im RPE. Der Nachweis von RLBP1 in den Müller-Zellen zeigte, dass diese in den Retinolzyklus in der Retina

involviert sein können [Bunt-Milam und Saari 1983]. Kultivierte Müller-Zellen in zapfenreichen Retinae synthetisierten all-trans-Retinylester, 11-cis-Retinol und 11-cis-Retinylester aus all-trans-Retinol. Den größten Teil des synthetisierten 11-cis-Retinals gaben sie an das Medium ab. Vermutlich sind die Zapfen, nicht aber die Stäbchen, in der Lage, 11-cis-Retinol aufzunehmen und in die Aldehyd-Form zu oxidieren [Das *et al.* 1992]. In zapfenreichen Retinae wurde die Aktivität dreier Enzyme des Retinolzyklus nachgewiesen, die sich von den Enzymen des stäbchenspezifischen Retinolzyklus unterschieden. Dabei handelte es sich um eine Retinylestersynthetase, eine Retinoldehydrogenase und eine Isomerase [Mata *et al.* 2002].

Der zapfenspezifische Retinolzyklus läuft vermutlich folgendermaßen ab: Nach Lichtabsorption wird 11-cis-Retinal in den Außensegmenten der Zapfen zu all-trans-Retinal isomerisiert und durch eine Retinoldehydrogenase zu all-trans-Retinol reduziert. Dieses wird aus den Zapfen durch die Interphotorezeptormatrix zu den Müller-Zellen transportiert [Muniz *et al.* 2007]. Dabei dient IRBP als Transporter der Retinoide zwischen den Zapfen und den Müller-Zellen [Parker *et al.* 2009]. In den Müller-Zellen bindet all-trans-Retinol an das CRBP und kann durch die Isomerase II direkt zu 11-cis-Retinol isomerisiert werden [Mata *et al.* 2005]. All-trans-Retinol kann jedoch auch durch eine Retinylestersynthetase zu einem all-trans-Retinylester verestert werden. 11-cis-Retinol kann dagegen durch die 11-cis-ARAT, welche die Acyl-Gruppe des Acyl-CoAs zur Veresterung verwendet, zu einem 11-cis-Retinylester verstoffwechselt werden [Muniz *et al.* 2006]. Die 11-cis-Retinylester können wiederum durch die 11-cis-Retinylesterhydrolase zu 11-cis-Retinol hydrolysiert werden [Bustamante *et al.* 1995]. 11-cis-Retinol wird dann aus den Müller-Zellen freigesetzt und, gebunden an das IRBP, zu den Zapfen transportiert [Parker *et al.* 2011]. In den Außensegmenten der Zapfen befindet sich eine Retinoldehydrogenase, die unter Verwendung von NADP^+ als Cofaktor 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal oxidiert. 11-cis-Retinal verbindet sich mit dem Apo-Opsin. Damit ist das Sehpigment der Zapfen wiederhergestellt [Mata *et al.* 2002].

1.3 Lokalisation und Interaktion der Proteine RDH5 und RLBP1 im retinalen Pigmentepithel

Die Proteine RDH5 und RLBP1 konnten im RPE am ER und an der apikalen Plasmamembran lokalisiert werden [Bhattacharya *et al.* 2002, Bonilha *et al.* 2004,

Huang *et al.* 2009]. Eine Interaktion zwischen dem RLBP1 und der RDH5 konnte nachgewiesen werden [Saari und Bredberg 1982]. Umstritten ist, ob RLBP1 als Substratträgerprotein von 11-cis-Retinal für die RDH5 dient [Simon *et al.* 1999]. Möglicherweise wird 11-cis-Retinal von RPE65 direkt an die RDH5 weitergegeben [Preising und Lorenz 2009].

Saari und Bredberg [1982] zeigten, dass eine Interaktion zwischen dem RLBP1 und der RDH5 stattfindet. Denn die enzymatische Reduktion von 11-cis-Retinal, das an RLBP1 gebunden war, fand nur in Anwesenheit von Mikrosomen statt [Saari und Bredberg 1982]. Die RDH5 ist ein mikrosomales Enzym [Zimmerman 1976]. Crabb *et al.* [1991] konnten für zielgerichtete Antikörper gegen Epitope des nativen RLBP1 zugängliche von unzugänglichen Epitopen differenzieren. An den exponierten Domänen des nativen Proteins finden möglicherweise Interaktionen mit Enzymen des Retinolzyklus statt [Crabb *et al.* 1991]. Es wurden weiterhin Aminosäurereste in der Liganden-Bindetasche des RLBP1 identifiziert sowie flüssigkeitsexponierte Regionen des RLBP1, die an der Interaktion mit Enzymen des Retinolzyklus beteiligt sein könnten [Wu *et al.* 2004]. Wu *et al.* [2006] vermuteten anhand von Ergebnissen der Immunpräzipitation, dass eine Interaktion zwischen der RDH5 und der C-terminalen Region des RLBP1 stattfindet. Bhattacharya *et al.* [2002] konnten ebenfalls mittels Immunpräzipitation zeigen, dass eine Interaktion zwischen dem RLBP1 und der RDH5 stattfindet. Es wurde ein Proteinkomplex durch Co-Immunpräzipitation von u.a. RLBP1, RDH5, RPE65 und LRAT in Mikrosomen, dem Zerfallsprodukt des ERs [Rassow *et al.* 2012], boviner RPE-Zellen nachgewiesen [Bhattacharya *et al.* 2002].

Huang *et al.* [2009] zeigten anhand von Immunfärbungen der Maus- und Rattenretina, dass die Enzyme des Retinolzyklus - LRAT, RPE65 und RDH5 - im Zellkörper lokalisiert sind und nicht in den apikalen Ausläufern der RPE-Zelle. Durch die Immunfärbung des ERs wurde weiterhin gezeigt, dass sich die Lokalisation des ERs ebenfalls auf den Zellkörper der RPE-Zelle beschränkte. Dies unterstützt die Vermutung, dass die Enzyme LRAT, RPE65 und RDH5 mit der Membran des ERs oder davon abgeleiteten Membranen assoziiert sind. Die Umsetzung von all-trans-Retinal zu 11-cis-Retinal muss demnach im Zellkörper stattfinden. Dagegen konnte RLBP1 in der gesamten RPE-Zelle nachgewiesen werden, sowohl basal als auch in den apikalen Ausläufern. Die intrazelluläre Lokalisation des RLBP1 passt zu der Funktion des

RLBP1 als Transporter der Retinoide zwischen dem Zellkörper und der apikalen Membran. Möglicherweise bewegt RLBP1 das gebundene Retinoid jedoch nicht selbst durch die RPE-Zelle, sondern stellt den Retinoiden Bindestellen bereit, sodass sich die Retinoide über mehrere Bindungs- und Dissoziationsschritte durch die flüssige Phase der RPE-Zelle bewegen können [Huang *et al.* 2009].

Im Gegensatz dazu führten die Ergebnisse von Nawrot *et al.* [2004] zu der Vermutung, dass sich zusätzlich ein Proteinkomplex zur Prozessierung der Retinoide im apikalen RPE befindet. Der Nachweis mehrerer Retinoid-prozessierender Proteine im apikalen RPE der Maus, darunter RLBP1, RDH5, Ezrin, Radixin, Moesin (ERM)-Proteine und das ERM-bindende Phosphoprotein 50 (EPB50), trug ebenfalls zur Unterstützung dieser Vermutung bei [Bonilha *et al.* 2004]. Nawrot *et al.* [2004] zeigten, dass eine Bindung zwischen RLBP1 und dem EBP50 im apikalen RPE erfolgt. Das C-terminale Ende des EBP50 bindet wiederum an das Protein Ezrin, welches mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden ist. ERM-Proteine können so Proteine, die in der Plasmamembran lokalisiert sind, an das Aktin-Zytoskelett konnektieren. Da EBP50 mit dem Protein der ERM-Familie und einem Zielprotein, wie z.B. RLBP1, interagiert, trägt es so zur apikalen Lokalisation des Zielproteins bei [Nawrot *et al.* 2004]. Mata *et al.* [1998b] zeigten, dass 11-cis-Retinylester in der Plasmamembran des RPEs gespeichert werden können und wiesen die Aktivität einer Retinylesterhydrolase und der RDH5 in der Plasmamembran des RPEs nach. Somit könnte die Interaktion mit EBP50 zur Lokalisation von RLBP1 an die apikale Plasmamembran beitragen, wo die Interaktion mit der RDH5 stattfindet. Die RDH5 könnte an der Freisetzung des an RLBP1 gebundenen 11-cis-Retinals und dessen Export zu den Photorezeptoren beteiligt sein [Bonilha *et al.* 2004].

Laut Saari und Bredberg [1982] dient RLBP1 als Substratträgerprotein für die RDH5. Das an RLBP1 gebundene 11-cis-Retinol kann entweder durch die LRAT verestert oder aber durch die RDH5 zu 11-cis-Retinal oxidiert werden [Saari *et al.* 1994].

Simon *et al.* [1999] zeigten, dass die RDH5 in der Membran des glatten ERs im RPE lokalisiert ist. Die RDH5 ist ein integrales Membranprotein, das als Homodimer vorliegt [Lidén *et al.* 2001, Tryggvason *et al.* 2001]. Die N-terminale und C-terminale Domäne der RDH5 sind hydrophob und in der Membran des ERs verankert. Ein kurzes Stück des C-terminalen Endes reicht ins Zytosol hinein. Die zentral lokalisierte katalytische Domäne ragt in das Lumen des ERs hinein. Da die katalytische Domäne zum Lumen

hin ausgerichtet ist, ist davon auszugehen, dass dort die Synthese von 11-cis-Retinal aus 11-cis-Retinol stattfindet. Nach Simon *et al.* [1999] ist es daher unwahrscheinlich, dass RLBP1 als Substratträgerprotein für die RDH5 dient. Denn das RLBP1 und die katalytische Domäne der RDH5 sind in zwei unterschiedlichen Zellkompartimenten, nämlich RLBP1 im Zytosol und die katalytische Domäne der RDH5 im Lumen des ERs, lokalisiert. Es sei denn, RLBP1 besitzt einen Mechanismus zur Membrantranslokation [Simon *et al.* 1999].

1.4 Mutationen im *RLBP1*-Gen und deren Phänotypen

Bei Patienten mit Erkrankungen, die sich in Form retinaler Dystrophien äußerten, wurden Mutationen im *RLBP1*-Gen nachgewiesen. Zu diesen Erkrankungen zählen die Bothnische Dystrophie, die Neufundland-Zapfen-Stäbchen-Dystrophie, die autosomal-rezessive Retinitis pigmentosa und die Retinitis punctata albescens [Humbert *et al.* 2006]. RLBP1 bindet 11-cis-Retinol und dient vermutlich als Substratträgerprotein für die RDH5. Diese Funktion wird durch Mutationen im *RLBP1*-Gen beeinträchtigt. Durch Mutationen kann die Konformation der Bindedomäne des Retinoids verändert und die Bindung des Retinoids sowohl verstärkt als auch aufgehoben werden [Golovleva *et al.* 2003]. Das mutierte rekombinante RLBP1 ist außerdem weniger wasserlöslich als das Wildtyp-RLBP1. Durch den Funktionsverlust von RLBP1 kann es zur Unterbrechung des Retinal-Vitamin A-Metabolismus kommen [Maw *et al.* 1997]. Außerdem könnte der Funktionsverlust zu einer toxischen Akkumulation von 11-cis-Retinylestern im RPE und einem späteren Defekt des RPEs mit Zelltod der Photorezeptoren führen [Burstedt *et al.* 1999].

1.4.1 Retinitis pigmentosa

Die Retinitis pigmentosa (RP) bezeichnet eine Gruppe erblicher Netzhautdystrophien, die durch den frühen Beginn der Nachtblindheit und den progressiven Verlust des Gesichtsfeldes charakterisiert sind. Der primäre Defekt bei RP betrifft die Funktion der Stäbchen, die dem Funktionsverlust der Zapfen typischerweise vorausgeht [Van Soest *et al.* 1999]. Die RP zeigt folgendes charakteristisches Erscheinungsbild des Fundus: Diffuse Netzhautatrophien, Pigmentablagerungen, die über die gesamte Netzhaut verteilt sind, sowie verengte Netzhautgefäße. Es kann zur Migration retinaler Pigmentepithelzellen kommen, die sich besonders an den Bifurkationen der Netzhautgefäße ansiedeln [Heckenlively *et al.* 1991]. Die RP kann schon früh anhand

der verzögerten b-Welle im Ganzfeld-Elektroretinogramm (ERG) diagnostiziert werden [Berson 1993]. Die RP ist sowohl phänotypisch als auch genetisch eine heterogene Erkrankung. Mehrere Mutationen in verschiedenen Genen wurden nachgewiesen, die mit dem klinischen Erscheinungsbild einhergingen [Van Soest *et al.* 1999]. Die RP kann autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal vererbt werden [Heckenlively *et al.* 1991].

Mutationen im *RLBPI*-Gen wurden bei Patienten mit autosomal-rezessiver Retinitis pigmentosa nachgewiesen. Diese Patienten zeigten eine beginnende Nachtblindheit im Alter von drei bis vier Jahren, die progressiv verlief. Die Untersuchung des Fundus der Patienten zeigte die typische Verengung der Gefäße, Makuladegenerationen und kleine weiße Flecken, die sich über den gesamten Fundus verteilten [Maw *et al.* 1997].

1.4.2 Retinitis punctata albescens

Die Retinitis punctata albescens (RPA) ist eine hereditäre Erkrankung, die autosomal-rezessiv und in seltenen Fällen autosomal-dominant vererbt wird [Humbert *et al.* 2006]. Die RPA kann als eine Untergruppe der RP betrachtet werden [Ellis und Heckenlively 1983]. Ähnlich wie die RP ist die RPA eine genetisch heterogene Erkrankung [Morimura *et al.* 1999]. Unter den Genmutationen ist die Erkrankung am häufigsten mit Mutationen im *RLBPI*-Gen assoziiert [Humbert *et al.* 2006]. Sie ist progressiv und führt zur retinalen Dystrophie. Der Fundus der Patienten zeigt charakteristischerweise multiple kleine weiß-gelbliche Flecken, die häufig radiär angeordnet sind und die Makula aussparen. Oft treten verengte Arteriolen und atrophische Veränderungen der Diskmembranen auf. Funktionell äußert sich die Erkrankung in einem progressiven Verlust des Gesichtsfeldes, einer abnormalen Dunkeladaptation und Nachtblindheit. Dies zeigt sich in abnormalen bis nicht detektierbaren Antworten im skotopischen und photopischen ERG sowie einem erhöhten Schwellenwert der Stäbchen in der Dunkeladaptometrie [Ellis und Heckenlively 1983]. Die dunkeladaptierten Antworten auf einen blauen Stimulus leichter Intensität im isolierten skotopischen ERG bei Patienten mit RPA waren extrem gering bis gar nicht detektierbar [Fishman *et al.* 2004]. Des Weiteren kommt es zur Verminderung der Sehschärfe, Beeinträchtigung der Farbwahrnehmung und Photophobie [Ellis und Heckenlively 1983].

1.4.3 Bothnische Dystrophie

Die Bothnische Dystrophie kann als eine Variante der RPA angesehen werden, die geographisch gebunden in Nordschweden auftritt und auf einer Gründermutation des *RLBP1*-Gens beruht [Burstedt *et al.* 1999]. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt [Gränse *et al.* 2001]. Die Patienten sind von Nachtblindheit seit ihrer frühen Kindheit, multiplen weiß-gelben Flecken am Fundus und einer Makuladegeneration mit progressiver Einschränkung der Sehstärke und des Gesichtsfeldes betroffen [Burstedt *et al.* 1999]. Im Frühstadium der Erkrankung können die Patienten einen normalen Fundus aufweisen. Bei einem jungen Patienten mit Bothnischer Dystrophie, der keine Anzeichen einer RPA oder Makulopathie und eine normale Sehschärfe hatte, konnte mithilfe des multifokalen ERGs in beiden Augen eine zentrale Reduktion der Amplituden festgestellt werden. Das multifokale ERG kann bei diesen Patienten zur objektiven Dokumentation einer beeinträchtigten Makulafunktion herangezogen werden [Gränse *et al.* 2001].

1.4.4 Neufundland Zapfen-Stäbchen-Dystrophie

Die Neufundland Zapfen-Stäbchen-Dystrophie äußert sich in Form einer retinalen Dystrophie, die ophthalmoskopisch der RPA ähnelt, jedoch einen rapideren und ausgeprägteren progressiven Verlauf zeigt. Die Erkrankung manifestiert sich im Kindesalter und kann in der 4. bis 5. Lebensdekade zum kompletten Sehverlust führen. Die Erkrankung wurde bei Bewohnern der Insel Neufundland diagnostiziert. Bei den untersuchten Patienten wurden zum einen Splice-junction-Mutationen und zum anderen Punktmutationen im *RLBP1*-Gen nachgewiesen. Da die Patienten wider Erwarten keine homozygoten Träger der Mutationen waren, wurde die Möglichkeit verworfen, dass der Defekt auf einer Gründermutation beruht. Der rapide Verlauf der Erkrankung wurde auf einen kompletten Ausfall des *RLBP1* aufgrund der Splice-junction-Mutation zurückgeführt. Bei Punktmutationen kann dagegen eine Restaktivität des Enzyms erhalten bleiben [Eichers *et al.* 2002].

1.5 Mutationen im *RDH5*-Gen und deren Phänotyp

Die Erkrankung Fundus albipunctatus ist mit Mutationen im *RDH5*-Gen assoziiert [Cideciyan *et al.* 2000, Driessen *et al.* 2001, Gonzalez-Fernandez *et al.* 1999, Hirose *et al.* 2000, Kuroiwa *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 2000, Wada *et al.* 2000, Yamamoto *et al.* 1999]. Fundus albipunctatus (FA) ist eine kongenitale Erkrankung, die autosomal-

rezessiv vererbt wird. Sie äußert sich typischerweise in Form einer stationären Nachtblindheit. Der Fundus dieser Patienten stellt sich durch ein charakteristisches Erscheinungsbild dar, bei dem auf Höhe des retinalen Pigmentepithels eine große Anzahl kleiner diskreter gelblich-weißer Läsionen, die rund bis elliptisch sind, auftreten. Typischerweise liegt die maximale Dichte dieser Läsionen in der mittleren Peripherie und nicht im Zentrum, der Makula [Heckenlively 1998]. Mittels Optischer Kohärenztomographie konnten die charakteristischen weißen Fundusläsionen genauer lokalisiert werden. Sie korrelierten mit Verdickungen der Schichten des RPEs und der Innen- und Außensegmente der Photorezeptoren. Bei den FA-Patienten konnte eine reduzierte Autofluoreszenz mit den weißen Fundusläsionen korreliert werden. Die reduzierte Autofluoreszenz wurde auf eine verringerte Produktion des 11-cis-Retinals und die damit einhergehende begrenzte Menge der Photopigmente zurückgeführt. Dies hatte eine verringerte Bildung von Lipofuszin und eine Verringerung der Autofluoreszenz zur Folge [Schatz *et al.* 2010].

Diagnostisch zeigten die FA-Patienten in der Dunkeladaptometrie sowohl eine verzögerte Antwort der Zapfen als auch der Stäbchen. Normalerweise findet ein steiler Abfall der Kurve der Zapfenfunktion statt, die nach etwa zwölf Minuten ihren Schwellenwert erreicht. Dort verzeichnet die Kurve einen Knick, den sogenannten Kohlrausch-Knick, der den Übergang der Zapfenfunktion zur Stäbchenfunktion darstellt. Danach dominiert die Stäbchenfunktion, die ihren endgültigen Schwellenwert nach 30 Minuten erreicht. Bei den FA-Patienten verzögern sich die charakteristischen Punkte der Dunkeladaptationskurve um das 5 - 6fache. Trotz der verzögerten Dunkeladaptation werden die normalen Schwellenwerte erreicht [Carr 1974].

Im skotopischen ERG lässt sich die verzögerte Dunkeladaptation der Zapfen und Stäbchen nach Lichtexposition ebenfalls darstellen. Die elektrischen Spannungsänderungen der Retina als Reaktion auf Lichtblitze mit blauem Dämmerlicht nach Lichtexposition wurden aufgezeichnet. Normalerweise steigt die Amplitude der b-Welle als Reaktion auf diesen schwachen Stimulus schnell an und erreicht ihr Maximum nach 20 bis 30 Minuten. Bei den FA-Patienten ließ sich die skotopische b-Welle erst 60 Minuten nach der Dunkeladaptation nachweisen. Sie stieg dann langsam an und erreichte die normale Amplitude nach 140 Minuten [Carr 1974].

Bei einzelnen Patienten mit FA wurden neben den typischen Fundusläsionen auch Bull's Eye-Makulaläsionen und eine Zapfendystrophie festgestellt. Diese

Zapfendystrophie betraf die gesamte Netzhaut, wie anhand des Ganzfeld-ERGs gezeigt werden konnte. Die Zapfendystrophie dieser Patienten begann erst in der 2. Lebensdekade, was auf einen progressiven Verlauf des FA hindeutet. Bedingt durch die Zapfendystrophie wiesen diese Patienten außerdem Defekte im Farbsehen auf [Miyake *et al.* 1992]. Niwa *et al.* [2005] unterstützen die Vermutung des progressiven Verlaufs der Zapfendystrophie bei FA-Patienten, da die Differenz der Amplituden im Zapfen-ERG zwischen der Kontrollgruppe und den FA-Patienten bei höherem Lebensalter, zwischen 50 und 70 Jahren, größer war als bei jüngeren Patienten im Alter von 10 bis 30 Jahren. Außerdem nahm bei den FA-Patienten die Regression der Amplitude der Zapfen-b-Welle mit höherem Alter stark zu. Niwa *et al.* [2005] stellten die Vermutung auf, dass die primäre Ursache für die Dysfunktion des Zapfensystems bei FA der Verlust der Zapfen oder eine Verkürzung der Außensegmente der Zapfen sein kann [Niwa *et al.* 2005].

1.6 Vergleich zwischen den Phänotypen bei *RLBP1*- und *RDH5*-Genmutationen

Lauber [1910] differenzierte folgendermaßen zwischen dem FA und der RPA: Den FA beschrieb er als stationäre Anomalie, die sich durch weiße Pünktchen am Fundus bei sonst normalem ophthalmoskopischem Befund auszeichnet. Außer hochgradiger Nachtblindheit besteht keinerlei Funktionsstörung. Die RPA hat dagegen progressiven Charakter. Zusätzlich zu den weißen Pünktchen am Fundus bestehen Pigmentverschiebungen und -anhäufungen, atrophische Herde der Choroidea sowie eine retinitische Optikusatrophie mit Verengung der Netzhautgefäße. Funktionell bestehen zusätzlich zur Nachtblindheit eine Herabsetzung der zentralen Sehschärfe, Einschränkungen des Gesichtsfeldes und Störungen des Farbsinns [Lauber 1910].

Eine neuere Studie zeigte dagegen, dass sich die gleiche Mutation im *RLBP1*-Gen bei jungen Patienten in den ersten zwei Lebensdekaden phänotypisch als FA darstellen konnte, während sie bei älteren Patienten in der vierten bis fünften Lebensdekade die Kriterien der RPA erfüllte. Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass Patienten, die an der stationären Nachtblindheit erkrankt zu sein scheinen, einen progressiven, atrophischen RPA-Phänotyp entwickeln können [Katsanis *et al.* 2001]. Außerdem zeigten mehrere neuere Untersuchungen, dass auch der auf einer *RDH5*-Genmutation beruhende FA eine progressive Verlaufsform annehmen kann [Miyake *et al.* 1992,

Niwa *et al.* 2005]. Daher ist es essentiell, nicht nur Patienten mit RPA, sondern auch die Patienten mit diagnostiziertem FA kontinuierlich zu beobachten [Katsanis *et al.* 2001].

Diagnostisch zeigten FA-Patienten im Gegensatz zu RPA-Patienten nur leicht abnormale Antworten im skotopischen ERG, während die Antworten bei RPA-Patienten stark beeinträchtigt bis nicht detektierbar waren. FA-Patienten konnten in der Dunkeladaptometrie nach einer verlängerten Dunkeladaptation normale Schwellenwerte erreichen, wohingegen bei RPA-Patienten der endgültige Schwellenwert in der Dunkeladaptometrie stark erhöht blieb [Ellis und Heckenlively 1983].

Eine Unterscheidung zwischen der Diagnose FA und RPA ist wichtig, weil die Prognose für das Sehen bei Tageslicht bei FA-Patienten entscheidend besser ist als bei RPA-Patienten [Hajali *et al.* 2009].

Oft ist jedoch ophthalmoskopisch zwischen den beiden Erkrankungen kaum ein Unterschied erkennbar. Bei beiden Erkrankungen stellt sich der Fundus durch eine hohe Anzahl an weiß-gelben Flecken dar, die vom hinteren Pol des Fundus ausgehen und dort am dichtesten vorliegen. Die Makula bleibt oft komplett ausgespart [Carr 1974].

Aufgrund dessen kann besonders bei jungen Patienten die Differenzierung zwischen der RPA und dem FA klinisch unmöglich sein. Daher ist eine molekulargenetische Bestätigung der Erkrankung sowie die Bestimmung der Genotyp-Phänotyp-Korrelation von außerordentlicher Bedeutung [Innaccone *et al.* 2007].

1.7 Wirkungen von Mutationen im *RDH5*-Gen auf molekularer Ebene

Auf molekularer Ebene kann eine Genmutation zum einen zur völligen Abwesenheit des Enzyms und zum anderen zur Anwesenheit eines nicht oder nicht ausreichend funktionierenden oder gar toxisch wirkenden Enzyms führen [Lorenz *et al.* 2010].

Als Ursache der Erkrankung Fundus albipunctatus wurden Mutationen im *RDH5*-Gen nachgewiesen. Auch der mit Zapfendystrophie einhergehende FA wird durch Mutationen im *RDH5*-Gen verursacht [Nakamura *et al.* 2000]. Das *RDH5*-Gen kodiert für das Enzym RDH5, das für den Hauptteil der 11-cis-RDH-Aktivität im RPE verantwortlich ist [Kim *et al.* 2005]. Anhand eines Mausmodells zeigten Driessen *et al.* [2000], dass ein Funktionsverlust der RDH5 zu einer Akkumulation von 11-cis-Retinol und 11-cis-Retinylestern im RPE führte, da die Oxidationsrate von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal verringert war. Bei Vorliegen von Mutationen in der RDH5 ist die

Enzymaktivität insoweit reduziert, dass 11-cis-Retinal nur verzögert gebildet wird [Gonzalez-Fernandez *et al.* 1999]. Da 11-cis-Retinal für die Reaktivierung des Sehpigments Rhodopsin zwingend erforderlich ist, resultiert daraus eine reduzierte Menge des Sehpigments in den Stäbchen. Das führt wiederum zu einem eingeschränkten Dämmerungssehen und einer verlängerten Dunkeladaptation. Bei einigen Patienten mit Fundus albipunctatus läuft auch die Regeneration des Sehpigments der Zapfen verzögert ab [Niwa *et al.* 2005].

Als Ursache der verringerten Regeneration des Sehpigments kommt nicht nur ein Funktionsverlust, sondern auch eine nicht erfolgende Expression und demzufolge fehlende Enzymaktivität der RDH5 in Betracht. Eine dennoch vorhandene, geringe Enzymaktivität könnte dadurch zustande kommen, dass andere 11-cis-Retinaldehydrogenasen, wie beispielsweise die 11-cis-Retinaldehydrogenase 10 [Farjo *et al.* 2009] und die 11-cis-Retinaldehydrogenase 11, die ebenfalls an der Regeneration von 11-cis-Retinal beteiligt sind, den Verlust der 11-cis-Retinaldehydrogenase 5 kompensieren [Kim *et al.* 2005]. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass bei Mutationen im *RDH5*-Gen die RDH5 zwar exprimiert wird, es jedoch aufgrund der Mutation zu einer veränderten intrazellulären Lokalisation der RDH5 kommt. Damit einhergehend könnte die Interaktion zwischen der RDH5 und dem RLBP1 gestört sein. Dies würde zur Unterbrechung des Retinolzyklus führen. Auch hier könnte der Funktionsverlust durch andere Retinaldehydrogenasen kompensiert werden.

1.7.1 Die Punktmutation p.G238W im *RDH5*-Gen

Die Punktmutation p.G238W ist eine Missense-Mutation, bei der die Aminosäure Glycin an der Position 238 durch die Aminosäure Tryptophan substituiert wird.

Schatz *et al.* [2010] untersuchten einen Patienten, der heterozygoter Träger der Punktmutation p.G238W war. Bei diesem Patienten lag der typische Phänotyp des FA mit diffusen weißen Flecken an den Fundi und einer verlängerten Dunkeladaptation vor. Mit den weißen Fundusläsionen konnte eine reduzierte Autofluoreszenz korreliert werden, die auf eine verringerte Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal hindeutete [Schatz *et al.* 2010].

Auch Hajali *et al.* [2009] und Gonzalez-Fernandez *et al.* [1999] beschrieben Patienten mit typischen Eigenschaften des FA, bei denen die Diagnose durch den Nachweis der Punktmutation p.G238W im *RDH5*-Gen gestellt werden konnte.

Yamamoto *et al.* [1999] beschrieben zwei Patienten, die die Mutation p.G238W aufwiesen. Einer der beiden Patienten war homozygot und der andere heterozygot für die Mutation. Der Fundus dieser Patienten zeigte hellgelbe Flecken in der Makula und der Peripherie der Retina. Der Vitamin A-Spiegel im Serum war in der Norm. Die Dunkeladaptation der Zapfen und Stäbchen war verzögert. Die normale Sensitivität wurde allerdings erreicht. Im Stäbchen-ERG zeigte sich eine reduzierte Amplitude der b-Welle, während das Zapfen-ERG nicht pathologisch war. Yamamoto *et al.* [1999] führten eine *In-vitro*-Mutagenese mit der Punktmutation p.G238W durch und verglichen die Expressionsrate der mutierten 11-cis-RDH mit der des Wildtyp-Enzyms in COS-1-Zellen. Das mutierte Enzym wurde auf einem 88 - 92% niedrigerem Niveau exprimiert als das Wildtyp-Enzym. In einem weiteren Versuch wurde die Fähigkeit des mutierten und des Wildtyp-Enzyms, die Oxidation von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal zu katalysieren, getestet. Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde der Zellumsatz von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal bestimmt. Dabei zeigte das mutierte Enzym im Vergleich zu dem Wildtyp-Enzym keine Aktivität. Um zu analysieren, ob bei dem mutierten Enzym eine sehr geringe Restaktivität vorhanden war, wurde die Reaktionszeit des Versuchs verlängert. Es zeigte sich anhand des Messergebnisses von 11-cis-Retinal, dass die Enzymaktivität des mutierten Enzyms um 80 - 90% niedriger als die des Wildtyp-Enzyms war.

Die Mutation p.G238W verursacht demnach einen Funktionsverlust der 11-cis-RDH5. Dies ist schlüssig, da die durch diese Mutation betroffenen Aminosäuren in der katalytischen Domäne des Enzyms liegen. Durch die verringerte Aktivität der 11-cis-RDH5 wird weniger 11-cis-Retinal als normal im RPE produziert. Die vollständige Wiederherstellung der Zapfen- und Stäbchenpigmente könnte jedoch darauf zurückzuführen sein, dass eine niedrige Aktivität der 11-cis-RDH5 erhalten bleibt. Auch ein alternativer Weg, der den Chromophor zu einer langsameren Rate zur Verfügung stellt, muss in Erwägung gezogen werden. Dass die Patienten mit den Mutationen im *RDH5*-Gen keine Degeneration der Retina aufwiesen, könnte auf die Restproduktion des Chromophors zurückgeführt werden [Yamamoto *et al.* 1999].

Des Weiteren beschrieben Innaccone *et al.* [2007] ein 6-jähriges Mädchen mit FA, das die zwei verschiedenen Punktmutationen p.G238W und p.D128N im *RDH5*-Gen zeigte. Das Zapfen-ERG der Patientin war nicht beeinträchtigt. Das Stäbchen-ERG war bei einer Stimulation mit Dämmerlicht stark eingeschränkt, während es bei Stimulation mit hellen Lichtblitzen kaum beeinträchtigt war. Dies spricht ebenfalls für die Vermutung, dass es einen alternativen, aber weniger effizienten Weg zur Wiederherstellung von 11-cis-Retinal geben muss [Innaccone *et al.* 2007].

1.7.2 Die Punktmutation p.A294P im *RDH5*-Gen

Die Punktmutation p.A294P ist eine Missense-Mutation, bei der die Aminosäure Alanin an der Position 294 durch die Aminosäure Prolin substituiert wird.

Schatz *et al.* [2010] untersuchten einen Patienten, der homozygoter Träger dieser Punktmutation war. Bei diesem Patienten konnte der Phänotyp FA mit den typischen weißen Flecken an den Fundi und einer diskreten Makulaatrophie nachgewiesen werden. Mit den weißen Fundusläsionen konnte eine Reduktion der Autofluoreszenz korreliert werden, die wiederum auf eine reduzierte Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal hindeutete [Schatz *et al.* 2010].

Gonzales-Fernandez *et al.* [1999] beschrieben einen Patienten, der den compound heterozygoten Genotyp p.R280H / p.A294P aufwies. Klinisch lag die Diagnose Fundus albipunctatus vor. Der Patient zeigte die typischen gelb-weißen Flecken am Fundus, die die Makula aussparten. Elektrophysiologisch wurde eine typische verlängerte Dunkeladaptation mit normalen Schwellenwerten bestimmt [Gonzales-Fernandez *et al.* 1999].

Lidén *et al.* [2001] untersuchten mehrere Mutationen im *RDH5*-Gen, die mit FA assoziiert sind, darunter die Punktmutation p.A294P. Dabei stellten sie fest, dass die Expressionsrate der $RDH5^{A294P}$ in COS-1-Zellen 22% der der Wildtyp-Expressionsrate ausmachte. Dies war im Vergleich zur Expressionsrate anderer Mutanten relativ hoch. Die Expressionsrate der $RDH5^{G238W}$ machte dagegen nur 2% der des Wildtyps aus.

Des Weiteren wurde die enzymatische Aktivität der *RDH5*-Mutanten *in vitro* mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie und *in vivo* mittels eines Zellreportersystems gemessen. Dabei stellte sich heraus, dass die $RDH5^{A294P}$ *in vitro* eine vergleichbare enzymatische Aktivität wie das Wildtyp-Enzym besaß, während die enzymatische

Aktivität der anderen Mutanten, z.B. der RDH5^{G238W} drastisch reduziert war. Die enzymatische Aktivität *in vivo* der RDH5^{A294P} lag mit einem Anteil von 52% der enzymatischen Aktivität des Wildtyp-Enzyms ebenfalls weit über der Aktivität der anderen Mutanten. Bei der RDH5^{G238W} lag sie z.B. unter 1%. Lidén *et al.* [2001] stellten fest, dass die RDH5 als Dimer vorliegt und dass die Funktion der RDH5^{A294P} bei der Expression zweier mutierter Allele durch den anderen RDH5-Mutanten dominant-negativ beeinflusst wird.

Die meisten Mutationen im *RDH5*-Gen befinden sich in der katalytischen Domäne des Enzyms im Lumen des ERs. Eine Ausnahme stellt die Mutation p.A294P dar, die in der C-terminalen Transmembranregion lokalisiert ist. Bei der Mutation p.A294P ist die enzymatische Aktivität des Enzyms daher weniger eingeschränkt als bei Mutationen, die die katalytische Domäne betreffen. Diese Mutation führt dagegen zu einer untauglichen Membraninsertion des Enzyms. Als Konsequenz könnte es zu einer Dislokation des C-terminalen Endes des Enzyms kommen, sodass sich dieses nicht im Zytosol, sondern im Lumen des ERs befindet [Lidén *et al.* 2001]. Das C-terminale Ende der RDH5 ist wichtig für dessen richtige Lokalisation und Funktion [Tryggvason *et al.* 2001]. Interaktionen, die am C-terminalen Ende des Enzyms stattfinden, könnten beeinträchtigt sein [Lidén *et al.* 2001].

1.8 Zielsetzung

Als Ursache für den Funktionsverlust der mutierten RDH5 bei Patienten mit Fundus albipunctatus kommt eine veränderte intrazelluläre Lokalisation der mutierten RDH5 in Frage. Eine veränderte intrazelluläre Lokalisation könnte die Interaktion zwischen der RDH5 und dem RLBP1 beeinträchtigen und zu einer verringerten Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal führen.

Ziel dieser Arbeit war es, zunächst die Expression und intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten mit den Punktmutationen p.G238W und p.A294P zu überprüfen. Diese beiden Missense-Mutationen im *RDH5*-Gen wurden ausgewählt, da die Arbeitsgruppe von Schatz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz, der Direktorin der Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde der Universitätsklinikum Gießen-Marburg GmbH Standort Gießen, Patienten, die Träger dieser Mutationen waren, beschrieben hatte [Schatz *et al.* 2010]. Bei diesen Patienten konnte der Phänotyp Fundus albipunctatus mit den Mutationen im *RDH5*-Gen

assoziiert werden. Außerdem konnten die weißen Fundusläsionen der Patienten mit Verdickungen im retinalen Pigmentepithel und einer reduzierten Autofluoreszenz korreliert werden, was auf eine verringerte Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal hindeutete [Schatz *et al.* 2010].

Des Weiteren sollte ein Vergleich zwischen der intrazellulären Lokalisation der Wildtyp-RDH5 bzw. der RDH5-Mutanten und des RLBP1 angestellt werden. Anhand dessen könnte ein Rückschluss bezüglich deren Interaktion gezogen werden.

Um dies zu überprüfen, wurden das *RDH5*- und *RLBP1*-Gen mittels RT-PCR aus der Gesamt-RNA aus humanem RPE-Gewebe isoliert. Die entstandenen DNA-Produkte wurden über eine TA-Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert. Die Wildtyp-Vektorkonstrukte wurden unabhängig voneinander in Expressionsvektoren umklont. In das subklonierte *RDH5*-Gen wurde über mutierte PCR-Primer die Punktmutation p.G238W und in einen zweiten Vektor die Punktmutation p.A294P eingefügt. Daraufhin erfolgte die Transfektion der Expressionsvektoren in HEK293T- und HeLa-Zellen. Die Proteinexpression wurde in Western-Blots untersucht und die intrazelluläre Lokalisation wurde durch immunhistochemische Methoden dargestellt. Des Weiteren wurde als Vergleich dazu die intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp-RDH5 und des Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen, einer Zelllinie des humanen RPEs, mittels immunhistochemischer Methoden dargestellt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräteliste

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Agarose-Gelelektrophorese	Compact S/M	Biometra, Göttingen
Elektroporator	Multiporator	Eppendorf AG, Hamburg
Feinwaage	Pioneer	Ohaus, Nänikon (CH)
Geldokumentation	BioDocAnalyze	Biometra, Göttingen
Inkubator	BD 115	Binder, Tuttlingen
Inkubatorhaube	comfort 5355 R	Eppendorf AG, Hamburg
Küvetten, Elektroporation	71-2010	Peqlab, Erlangen
Magnetrührer	IKA RT classic	IKA-Werke, Staufen
Mikroskop	VWRI 630	VWR, Darmstadt
Orbitalschüttler	CERTOMAT MOII	Sartorius AG, Göttingen
PCR Thermocycler	T personal	Biometra, Göttingen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Eppendorf Reference 1 - 10 µl, 2 - 20 µl, 10 - 100 µl, 100 - 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Transferpette [®] S 0,1 - 1 µl, 1 - 10 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl	BRAND, Wertheim
Polyacrylamidelektrophorese	Multigel-long	Biometra, Göttingen
Taumelschüttler	Biometra WT17	Biometra, Göttingen
Thermoblock	TB2 Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vortexer	Lab dancer	VWR, Darmstadt

Fortsetzung Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

<i>Gerät</i>	<i>Typ</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Wasserbad	Julabo TW12	Julabo, Seelbach
Zentrifuge	AK 15	Sigma, Osterode
Zentrifuge	1-15 PK	Sigma, Osterode

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2: Verwendete Materialien

<i>Bezeichnung</i>	<i>Typ</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
Blotting Membran	Protran [®] Nitrocellulose Transfer Membran BA85	10401197	Whatman, Dassel
Kryoröhrchen	CryoPure 2,0 ml	72.380	Sarstedt, Nümbrecht
6-Loch-Platte	Cell Culture Plates with Inserts	PAA35006X	PAA, Pasching (Österreich)
Pipettenspitzen	1 - 10 µl	720031	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	1 - 10 µl	701115	Sarstedt, Nümbrecht
	100 - 1000 µl	70.762	Sarstedt, Nümbrecht
	2 - 200 µl	4844	Corning, Wiesbaden
Reaktionsgefäße	0,5 ml	72.699	Sarstedt, Nümbrecht
	1,5 ml	72.690.001	Sarstedt, Nümbrecht
	2,0 ml	72.691	Sarstedt, Nümbrecht
	15 ml	188171	Greiner Bio-One, Frickenhausen
	50 ml	227261	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Röntgenfilm	Amersham Hyperfilm ECL	28-9068-40	GE Healthcare, Freiburg

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Summenformel</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
30%ige Acrylamid- und Bisacrylamid-stammlösung (37,5:1)	C_3H_5NO	3029.2	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose GenAgarose LE	$C_{12}H_{18}O_9$	M3044.1000	Genaxxon, Ulm
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$H_8N_2O_8S_2$	001201-0500	Merck, Darmstadt
Borsäure	HBO_3	6943.1	Merck, Darmstadt
Ethanol vergällt	C_2H_6O	K928.1	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	$C_{21}H_{20}N_3Br$	E 8751	Sigma-Aldrich, Hamburg
Ethylenediaminetetraacetic acid \times 2 Na (EDTA)	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \times 2 H_2O$	8043.2	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	6781.1	Carl Roth, Karlsruhe
Luria Broth (LB)		12795-027	Invitrogen, Darmstadt
Milchpulver, fettfrei			TSI, Zeven
Natriumdodecylsulfat (SDS) ultrapure	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	2326.1	Carl Roth, Karlsruhe
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	$C_6H_{16}N_2$	2367.1	Carl Roth, Karlsruhe
Select Agar		30391-023	Invitrogen, Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	$C_4H_{11}NO_3$	AE15.3	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X 100	$C_{33}H_{60}O_{10}$	3051.3	Carl Roth, Karlsruhe
Tween 20	$C_{58}H_{114}O_{26}$	9127.1	Carl Roth, Karlsruhe

2.1.4 Enzyme

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

	<i>Enzym</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller</i>
<i>Ligasen</i>	T4 DNA Ligase	15224-025	Invitrogen, Karlsruhe
	T4 DNA Ligase	#M0202S	New England Biolabs, Frankfurt am Main
<i>Restriktionsenzyme</i>	<i>EcoRI</i>	#ERO275	Fermentas, St. Leon-Roth
	<i>XbaI</i> Fast Digest	#FD0684	Fermentas, St. Leon-Roth
	<i>SmaI</i> Fast Digest	#FD0663	Fermentas, St. Leon-Roth
<i>Polymerasen</i>	Prime Script Reverse Transcriptase	2680A	Takara, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)
	HotStar HiFidelity DNA Polymerase	202602	Qiagen, Hilden
	Phusion Hot Start DNA Polymerase	M0535S	New England Biolabs, Frankfurt am Main

2.1.5 Primer

Tabelle 2.5: Verwendete Primer. * Die mutierte Position ist fett und unterstrichen gedruckt.

	<i>Primer</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Klonierungsprimer</i>	RLBP1-3U	AGGCCAGAGATTCTAACTACAGTT
	RLBP1-5U	CCAAGGACTCTGTGTCTTCCATAG
	RDH5-Rta	CTGCCAGTCTAGACTGCCACCTGTAG
	RDH5-Rtb	CAATCTCTTGCTGGAATTCTGGATT
<i>Mutageneseprimer</i>	RDH5G238Wa	P-CACTAT <u>T</u> GGGGGGCCTTCCTCAC*
	RDH5G238Wb	P-GGCCTGTGTGGCAGGAGGCA
	RDH5-294Pa	P-CTCTGGCTGCCT <u>C</u> CCTCCTAC*
	RDH5-294Pb	P-CAGCTTGGCATCCCAACCTG

2.1.6 Vektoren und Plasmide

Tabelle 2.6: Verwendete Vektoren und Plasmide

<i>Vektoren/Plasmide</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
pCR [®] 2.1-TOPO [®]	K4560-01	Invitrogen, Karlsruhe
pcDNA3.1+	V790-20	Invitrogen, Karlsruhe
pEGFP-N1		Gabe des Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm) der Universität Nantes (Frankreich)

2.1.6.1 pCR[®]2.1-TOPO[®]

Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor setzt sich aus 3932 Basenpaaren zusammen. Er trägt das lacZ α -Gen, durch das die Insertion des DNA-Fragments in den Vektor geprüft werden kann. Das lacZ α -Gen kodiert für das N-terminale α -Fragment der β -Galaktosidase. Durch die Insertion eines DNA-Fragmentes in den Vektor wird es zerstört, sodass die rekombinanten Klone keine β -Galaktosidase synthetisieren können. Des Weiteren enthält der Vektor eine M13-forward- und M13-reverse-Primerbindestelle sowie einen f1-Replikationsursprung, sodass einzelsträngige DNA zur Sequenzierung repliziert werden kann. Die Multiple-Klonierungsstelle dient der Insertion des DNA-Fragments. Außerdem besitzt der Vektor einen T7-Promotor, der die Replikation des Inserts ermöglicht. Der pUC-Replikationsursprung dient als Startpunkt der Replikation des Plasmids. Zur Selektion der transfizierten Klone enthält der Vektor Resistenzgene gegenüber Ampicillin und Kanamycin.

2.1.6.2 pcDNA3.1+

Der Expressionsvektor pcDNA3.1+ besteht aus 5428 Basenpaaren. Er besitzt einen schnellen Promotor aus dem humanen Zytomegalievirus (CMV), der für eine hohe und effiziente Expressionsrate des rekombinanten Proteins sorgt. Des Weiteren ermöglicht eine T7-Promotorstelle *in vitro* die Transkription in Strangrichtung und die Sequenzierung des Inserts. Die Multiple-Klonierungsstelle in Strang- und Gegenstrangrichtung erlaubt die Insertion des Gens. Durch das Bovine-Growth-Hormon (BGH)-Polyadenylierungssignal kann die Transkription effizient beendet und die mRNA polyadenyliert werden. Der f1-Replikationsursprung erlaubt die Replikation

einzelsträngiger DNA. Der Vektor besitzt ein Resistenzgen gegenüber Neomycin, welches der Selektion transfizierter Klone dient. Der SV40-Promotor und -Replikationsursprung sorgen für die hohe Expressionsrate des Resistenzgens. Das SV40-Polyadenylierungssignal ist für die Beendigung der Transkription des Resistenzgens und die Polyadenylierung seiner mRNA zuständig. Am pUC-Replikationsursprung wird die hohe Anzahl an Kopien der Replikation in *E.coli*-Bakterienzellen geregelt. Der Vektor enthält weiterhin ein Resistenzgen gegenüber Ampicillin (*bla*), eine β -Laktamase und einen entsprechenden Promotor. Durch das Ampicillin-Resistenzgen können die in *E.coli*-Bakterienzellen transfizierten Klone ebenfalls selektiert werden.

2.1.6.3 pEGFP-N1

Die Qualle *Aequorea* emittiert grünes Licht. Die lichtausstrahlenden Zellen beinhalten Aequorin und das grün fluoreszierende Protein (GFP). Dieses ist stark fluoreszierend und wird durch Energieübertragung des Calcium-aktivierten Photoproteins Aequorin aktiviert [Morise *et al.* 1974]. Die cDNA des GFPs produziert bei einer Expression in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen ein fluoreszierendes Produkt. Dazu werden keine exogenen Substanzen und Kofaktoren benötigt, sodass die GFP-Expression zur Kontrolle der Genexpression herangezogen werden kann [Chalfie *et al.* 1994]. pEGFP-N1 kodiert für eine Variante des Wildtyp-GFPs, die eine höhere Expressionsrate in Säugetierzellen und eine stärkere Fluoreszenz bei Anregung mit einer Wellenlänge von 488 nm zeigt [Cormack *et al.* 1996]. Der Vektor trägt eine Multiple-Klonierungsstelle, die sich zwischen dem CMV-immediate early-Promotor und der EGFP-kodierenden Sequenz befindet. Das SV40-Polyadenylierungssignal, das sich stromabwärts des *EGFP*-Gens befindet, regelt die korrekte Prozessierung des 3'-Endes der mRNA des *EGFP*-Gens. Der Vektor beinhaltet des Weiteren einen SV40-Replikationsursprung. Eine Neomycinresistenz-Kassette, bestehend aus dem SV40-early-Promotor, dem Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen und dem Herpes simplex virus-Thymidinkinase (HSV-TK)-Polyadenylierungssignal, dient der Selektion. Der Vektor beinhaltet außerdem einen pUC-Replikationsursprung zur Vermehrung in *E.coli* sowie einen *f1*-Ursprung zur Produktion einzelsträngiger DNA. Der pEGFP-N1-Vektor setzt sich aus 4700 Basenpaaren zusammen.

2 Material und Methoden

Blocklösung (3% BSA)	3% (w/v) BSA	0,3 g
	1% (v/v) Triton-X 100	100 µl
	ad 10 ml 1×PBS	
HEPES-Puffer (2×)	280 mM NaCl	16,4 g
	1,5 mM Na ₂ HPO ₄	0,0213 g
	50 mM HEPES	11,9 g
	ad 80 ml Aqua bidest.	pH 7,05
	ad 100 ml Aqua bidest.	
PBS-Puffer (1×)	137 mM NaCl	8 g
	2,7 mM KCl	0,2 g
	10 mM Na ₂ HPO ₄	1,4 g
	2 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4	0,24 g
	ad 1000 ml Aqua bidest.	
PFA-Lösung (4%)	4% (w/v) PFA	4 g
	ad 80 ml 1×PBS	
	mit 10 M NaOH	auf pH 11 einstellen
	mit 37% HCl	auf pH 7,3 einstellen
	ad 100 ml 1×PBS	
SDS (10%)	10% (w/v) SDS	10 g
	ad 100 ml Aqua bidest.	
SDS-PAGE-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) (5×)	0,225 M Tris	1,36 g, pH 6,8
	50% (v/v) Glycerin	25 ml
	5% (w/v) SDS	2,5 g
	0,05% (v/v) Bromphenolblau	2,5 ml (aus 1% Lösung)
	0,25 M DTT	1,93 g
	ad 50 ml Aqua bidest.	

TBE-Puffer (1×)	1 M Tris	24,2 g
	0,82 M Borsäure	10,3 g
	10 mM EDTA	0,7 g
	ad 2000 ml Aqua bidest.	
TBS-Puffer (10×)	1,50 M NaCl	88 g
	20 mM KCl, pH 7,4	2 g
	250 mM Tris	30 g
	ad 1000 ml Aqua bidest.	
TBS-T-Puffer (1×)	150 mM NaCl	8,8 g
	2 mM KCl, pH 7,4	0,2 g
	25 mM Tris	3,0 g
	0,05% (v/v) Tween 20	500 µl
	ad 1000 ml Aqua bidest.	

2.1.10 Medien

2.1.10.1 Bakterienkultur

LB Medium	Luria Broth (LB)	12,5 g
	ad 500 ml Aqua bidest.	
Für Agarplatten zur Selektion	1,5% (w/v) Select Agar	7,5 g hinzufügen, autoklavieren und auf 42 °C abkühlen lassen.
	100 µg/ml Ampicillin	500 µl hinzufügen.

Pro Agarplatte wurden 25 ml LB-Agar-Medium ausgegossen. Nach dem Aushärten wurden die Agarplatten bei 4 °C aufbewahrt.

2.1.10.2 Zellkultur

DMEM (+++)	100×Penicillin/Streptomycin	5 ml
	(enthält 10.000 U/ml Penicillin G und 10 mg/ml Streptomycin)	
	4 mM L-Glutamin	10 ml
	10% (v/v) FKS	50 ml
	ad 500 ml DMEM High Glucose	

2.1.11 Bakterien

Tabelle 2.9: Verwendete Bakterienzellen

Bakterienzellen	Genetische Eigenschaften	Hersteller, Ort
TOP10 elektrokompetente <i>E.coli</i>	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe
XL1-Blue <i>E.coli</i>	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44</i> <i>relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIqZ</i> Δ M15 Tn10 (Tetr)]	Stratagene, Heidelberg

2.1.12 Zelllinien

Tabelle 2.10: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Bezugsquelle, Ort
293T/17 [HEK 293T/17] (ATCC [®] CRL11268 [™])	LGC Standards GmbH, Wesel
HeLa NR1 (ATCC [®] CRL13011 [™])	LGC Standards GmbH, Wesel
ARPE-19 (ATCC [®] CRL-2302 [™])	LGC Standards GmbH, Wesel

2.1.12.1 HEK 293T

Graham *et al.* [1977] transformierten humane embryonale Nierenzellen (HEK-Zellen) mit DNA-Fragmenten des Adenovirus Typ 5. Die transformierten HEK-Zellen zeigten die typischen Eigenschaften Adenovirus-transfizierter Zellen mit einer Teilungstendenz der Zellen bei Konfluenz und die Bildung von Zellhaufen. Die Zellen hatten epithelialen

Charakter und eine starke Variationsbreite bezüglich der Zellgröße. Durch die Aufrechterhaltung dieser Zellkultur konnte eine humane Zelllinie hergestellt werden [Graham *et al.* 1977]. In diese Zelllinie eingebrachte Plasmid-Vektoren, die einen CMV-Promotor besitzen, nutzen effektiv den Proteinsyntheseapparat der Zelllinie und erzwingen die Translation der Gene, die künstlich in den Plasmid-Vektor integriert worden sind [Thomas und Smart 2005].

2.1.12.2 HeLa

Die HeLa-Zellen wurden 1951 aus dem aggressiven Adenokarzinom der Zervix einer Frau namens Henrietta Lacks gewonnen [Lucey *et al.* 2009]. Gey *et al.* [1952] untersuchten die Tumorzellen, die sie aus einer Gewebeprobe des Zervixkarzinoms entnommen hatten, auf deren Wachstumsverhalten. Eine Zelllinie des Epidermoidkarzinoms der Zervix wurde erhalten und wuchs fast ein Jahr unter Kulturbedingungen. Diese Zelllinie wuchs im Gegensatz zu normalen und anderen Tumorzellen, die zur Keratinisierung neigten, schnell in dem Kulturmedium [Gey *et al.* 1952].

2.1.12.3 ARPE-19

Bei der ARPE-19-Zelllinie handelt es sich um eine Zelllinie aus dem humanen RPE mit einem diploiden Chromosomensatz. Sie stammt aus dem Augapfel eines 19-jährigen männlichen Patienten. Die Zelllinie wurde 1986 von Amy Aotaki-Keen durch selektive Trypsinisierung der primären Kultur der RPE-Zellen hergestellt. Die RPE-Zellen zeigten ein starkes Wachstumspotential und bildeten stabile epitheliale Monolayer mit morphologischer und funktioneller Polarität. Die Zellen exprimierten die RPE-spezifischen Marker RLBP1 und RPE65 [Dunn *et al.* 1996].

2.1.13 Reagenziensysteme und Kits

Tabelle 2.11: Verwendete Reagenziensysteme und Kits

Bezeichnung	Bestellnummer	Hersteller, Ort
Accutase	L11-007	PAA, Pasching (Österreich)
Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit	10270014	Thermo Scientific, Schwerte

Fortsetzung Tabelle 2.11: Verwendete Reagenziensysteme und Kits

<i>Bezeichnung</i>	<i>Bestellnummer</i>	<i>Hersteller, Ort</i>
ECL Western blotting detection reagents (1)	105943	GE Healthcare, Amersham
ECL Western blotting detection reagents (2)	1059250	GE Healthcare, Amersham
Fluorescence Mounting Medium	S302380-2	Dako, Baltimore (USA)
Lipofectamine LTX und PLUS™ Reagent	15338-100	Invitrogen, Karlsruhe
Miniprep Plasmid DNA Purification	740615.50	Macherey-Nagel, Düren
M-PER-Proteinextraktionsreagens-Kit	10005843	Thermo Scientific, Schwerte
NucleoSpin Extract-Kit	740615.50	Macherey-Nagel, Düren
Qiafilter Plasmid Midi-Kit	12243	Qiagen, Hilden
Qiagen Maxiprep-Kit	12163	Qiagen, Hilden
Roti®-Fect Plus	CL21-2	Carl Roth, Karlsruhe
TOPO TA Cloning-Kit	K4560-01	Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Methoden

2.2.1 Two step-Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

2.2.1.1 Reverse Transkription

Als Ausgangsmaterial lag die mRNA aus humanem retinalem Pigmentepithel (RPE) vor. Die RPE-Gewebeprobe stammte von einem Gewebespende, dessen Auge im Zusammenhang mit der Entfernung eines Knochentumors enukleiert wurde. Die Verwendung der Gewebeprobe ist durch die Ethikkommission des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen (AZ: 257/13) befürwortet worden.

Mittels der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, die aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus stammte, und eines sequenzspezifischen Primers wurde die komplementäre cDNA des entsprechenden mRNA-Abschnitts gewonnen.

Der Reaktionsansatz zur Reversen Transkription setzte sich folgendermaßen zusammen:

2,0 µl	10 pmol/µl genspezifischer Primer
genspezifische Menge	mRNA
1,0 µl	dNTP-Mischung (10 mM)
ad 10 µl	RNase-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5 min im Heizblock bei 65 °C erhitzt, um das RNA-Primer-Gemisch zu denaturieren. Danach wurde er sofort auf Eis gekühlt.

Anschließend wurde hinzugefügt:

4,0 µl	5 × Prime Script Puffer
0,5 µl	200 U/µl Prime Script Reverse Transkriptase
0,5 µl	RNase Inhibitor
5,0 µl	RNase-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde geschüttelt und 10 min auf 30 °C erhitzt. Anschließend wurde er 30 min bei 50 °C im Heizblock erhitzt. Danach wurde er zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase 15 min bei 70 °C erhitzt und daraufhin auf Eis gekühlt.

2.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit der gewonnenen einzelsträngigen cDNA wurde eine Polymerase-Kettenreaktion durchgeführt, um eine doppelsträngige DNA zu erhalten.

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Amplifikation von Nukleinsäureabschnitten. Dabei binden die Primer an den zu amplifizierenden Einzelstrang (Annealing) und können nun von der temperaturstabilen DNA-Polymerase verlängert werden (Elongation). Wird die neu synthetisierte doppelsträngige DNA anschließend durch eine Temperaturerhöhung in ihre Einzelstränge denaturiert, können neue Primermoleküle binden und der Prozess wiederholt sich. Werden in den PCR-Ansatz zwei solcher Primer hinzugegeben, von denen der eine am *sense*-Strang und der andere am Gegenstrang (*antisense*-Strang) bindet, erhält man mit jedem Zyklus eine Verdopplung des zwischen den Primern befindlichen DNA-Abschnitts. Die PCR führt demnach zur exponentiellen Amplifikation [Lottspeich und Engels 2006].

Der Reaktionsansatz der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

1,0 µl	10 pmol/µl genspezifischer Primer A
1,0 µl	10 pmol/µl genspezifischer Primer B
5,0 µl	5 × HotStar HiFidelity PCR-Puffer
1,0 µl	cDNA aus der Reversen Transkription
0,5 µl	2,5 U/µl HotStar HiFidelity DNA-Polymerase
ad 25 µl	RNase-freies Wasser

Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermocycler 5 min bei 95 °C aktiviert. Danach folgte ein 3-Schritt-Zyklus, der sich aus den Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation aufbaute.

Tabelle 2.12: PCR-Bedingungen

Cycling-Schritt	Zeit in s	Temperatur in °C	Wiederholungen
Denaturierung	15	94	40
Annealing	60	60	
Elongation	60	72	

Die 3 Schritte wurden 40-mal durchgeführt, wobei der letzte Elongationsschritt auf 10 min verlängert war. Zum Schluss wurden die PCR-Produkte auf 10 °C abgekühlt.

2.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese ist die Standardmethode, um DNA-Moleküle unterschiedlicher Länge zu trennen. Sie wird daher zur Größenanalyse von DNA-Fragmenten angewandt. Elektrophorese ist die Bewegung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Da die DNA-Moleküle negative Ladungen tragen, wandern sie durch das Gel zur positiven Elektrode. Dabei bildet das Gel ein Netzwerk aus Poren, welches die DNA-Moleküle auf ihrem Weg zur positiven Elektrode durchwandern müssen. Kürzere Moleküle werden durch die Poren weniger behindert als längere und bewegen sich daher schneller durch das Gel. Moleküle gleicher Länge bilden im Gel Banden [Brown 2007].

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese konnten die PCR-Produkte ihrer Länge nach aufgetrennt werden. Dazu wurde ein 1%iges Agarose-Gel angefertigt. Dieses setzte sich folgendermaßen zusammen:

Agarose-Gel (1%)	1% (w/v) Agarose	1 g
	ad 100 ml 1×TBE-Puffer	

Dieses Gemisch wurde in der Mikrowelle bei 700 Watt erhitzt, bis es aufkochte und die Agarose gelöst war. Danach wurde die Gewichts Differenz ausgeglichen, indem soviel Aqua bidest. hinzugefügt wurde, bis das Ausgangsgewicht wiederhergestellt war. Zu dem Gemisch wurden 5 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Anschließend wurde das Gemisch mit dem Magnetrührstäbchen solange umgerührt, bis es handwarm war. Dann wurde das Gel in einen Gelschlitten mit Kamm ausgegossen.

Die Proben wurden mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in eine Elektrophoresekammer gesetzt und soviel TBE-Puffer hinzugefügt, bis das Gel knapp bedeckt war. Dann wurden die Proben sowie 8 µl des Größenmarkers in die Geltaschen einpipettiert.

Es wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Nach einer Laufzeit von 60 min wurde das Gel unter UV-Licht dokumentiert.

Ethidiumbromid interkaliert zwischen die DNA-Basenpaare und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht [Brown 2007]. Auf diese Weise konnten die DNA-Banden nach der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

2.2.3 TOPO TA Cloning-Kit

2.2.3.1 TA-Klonierung in den pCR®2.1-TOPO®-Vektor

Die DNA-Klonierung dient der Verknüpfung der Ziel-DNA mit einem Replikon, wodurch eine rekombinante DNA entsteht. Das Replikon stellt eine DNA-Sequenz dar, die eine unabhängige DNA-Replikation vermitteln kann. Dementsprechend wird bei Übertragung der rekombinanten DNA auf eine Wirtszelle auch die Ziel-DNA repliziert, wenn das Replikon in der Zelle replizieren kann [Strachan und Read 2005].

Die TA-Klonierung basiert auf dem Prinzip der Vaccina Topoisomerase vom Typ I. Dieses Enzym hat eine hohe Sequenzspezifität und bindet an doppelsträngige DNA. Sie spaltet die Phosphodiesterbindung eines DNA-Stranges nach einem 5'-(C/T)CCTT-Element und aktiviert dieses. Die durch diese Spaltung entstandene Energie nutzt die Topoisomerase I, um über eine 3'-Phosphotyrosylbindung kovalent an das 3'-Phosphat des geschnittenen Endes binden zu können [Shuman 1994]. Der pCR®2.1-TOPO®-Vektor besitzt zwei benachbarte solcher Schnittstellen. Die beiden Enden besitzen einen 3'-Thymidin-Überhang, an die die Topoisomerase I gebunden bleibt, sodass eine Selbstligation verhindert wird. Wird die Phosphotyrosylbindung

jedoch durch einen 5'-Hydroxylrest eines DNA-Stranges angegriffen, kommt es zur Freisetzung der Topoisomerase I und zur Ligation des DNA-Stranges mit dem Vektor. Da die Taq-Polymerase (bzw. die HotStar HiFidelity DNA-Polymerase) den PCR-Produkten einen Basenüberhang in Form eines Desoxyadenosins an das 3'-Ende hinzufügt und der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor einen 3'-Desoxythymidin-Überhang besitzt, können die PCR-Produkte und der Vektor effizient aneinander binden.

Der Reaktionsansatz setzte sich folgendermaßen zusammen:

1,5 µl	PCR-Produkt
1,0 µl	Dilute Salt Solution
ad 5 µl	Aqua bidest.
1,0 µl	10 ng/µl pCR [®] 2.1-TOPO [®] -Vektor

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde er auf Eis gelagert.

2.2.3.2 Transformation in TOP10 kompetente Zellen

Die Vektor-DNA wurde anschließend durch Transformation in Form von Elektroporation in TOP10 kompetente *E.coli*-Bakterien übertragen. Da der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor ein Resistenzgen gegenüber Ampicillin besitzt, konnten entsprechende Klone auf ampicillinhaltigen Agarplatten differenziert werden.

2,0 µl des Reaktionsansatzes der TA-Klonierung wurden zu 50 µl elektrokompenten *E.coli*-Bakterienzellen hinzugefügt. Das Gefäß wurde leicht gemischt und 15 min auf Eis gelagert. Das Gemisch wurde anschließend unter Vermeidung von Blasen in eine 0,1 cm Küvette gegeben. Die Probe wurde im Elektroporationsgerät elektrotransformiert. Danach wurden rasch 1000 µl LB Nährmedium, das auf Raumtemperatur erwärmt war, hinzugefügt. Das Gemisch wurde in ein 1,5 ml-Sammelgefäß umgefüllt und 1 h bei 37 °C und 100 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden 50 µl des Transformationsgemisches auf einer auf 37 °C vorgewärmten Agarplatte, welche mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt war, ausgestrichen. Die Agarplatte wurde 12 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Mini-Präparation

Die Mini-Präparation mittels Miniprep Plasmid DNA Purification-Kit diente der Gewinnung der Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen. Die über Nacht herangezogenen Bakterien wurden pelletiert und lysiert. Das alkalische Lysat wurde anschließend neutralisiert. Es folgte das Pelletieren des bakteriellen Debris und die Gewinnung der Plasmid-DNA aus dem Überstand.

Mittels Mini-Präparation wurde die Plasmid-DNA aus den auf der Agarplatte gewachsenen, transformierten Bakterienklonen isoliert und aufgereinigt. Dazu wurde ein Bakterienklon mit einer Pipettenspitze von der Agarplatte abgetragen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß gegeben, welches mit 5 ml LB Nährmedium und 5 µl 100 mg/ml Ampicillin befüllt war. Das 15 ml-Reaktionsgefäß wurde 12 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Danach wurden 1,5 ml der Übernachtskultur in ein 1,5 ml-Reagiergefäß pipettiert. Dieses wurde 5 min bei $2291 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zu dem Pellet wurden 100 µl S1-Lösung (Resuspensionspuffer) hinzugefügt. Anschließend wurde die Lösung resuspendiert, bis sich das Pellet gelöst hatte. Danach wurden 100 µl S2-Lösung (Lysepuffer) hinzugefügt und das Reagiergefäß wurde invertiert. Daraufhin wurden 100 µl S3-Lösung (Neutralisationspuffer) hinzugefügt und das Reagiergefäß wurde erneut invertiert. Das Gemisch wurde 10 min bei $9167 \times g$ zentrifugiert. Dann wurde der Überstand abgenommen und in ein neues Reagiergefäß gefüllt. Es wurden 700 µl eiskaltes (-20 °C) absolutes Ethanol hinzugefügt. Das Gemisch wurde anschließend 30 min bei $17968 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 200 µl 70%iges Ethanol wurden zu dem Pellet hinzugefügt. Es wurde erneut 5 min bei $17968 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde an der Luft getrocknet. Dann wurden 20 µl Aqua bidest. zu dem Pellet hinzugefügt und dieses darin resuspendiert.

2.2.5 Restriktionsverdau der Plasmid-DNA

Durch Restriktionsenzyme können die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch gespalten werden [Lottspeich und Engels 2012]. Dabei entstehen DNA-Fragmente, die anhand ihrer Größe identifiziert werden können. Die hier verwendeten Restriktionsenzyme gehören zu den Typ-II-Restriktionsendonukleasen. Diese erkennen spezifische DNA-Sequenzen, die oft

palindromisch sind, und spalten die DNA an konstanten Positionen innerhalb oder nahe der Erkennungssequenz. Dabei entstehen Fragmente mit einem 5'-Phosphat- und einem 3'-OH-Ende [Roberts *et al.* 2003]. Das in dieser Arbeit häufig eingesetzte Restriktionsenzym *EcoRI* wurde als Erstes aus einem Resistenzfaktor des *Escherichia coli* Stammes RY13 isoliert. Seine Erkennungssequenz ist 6 Basen lang und palindromisch. Die Spaltstelle liegt innerhalb der Erkennungsstelle G/AATTC. Bei dem Verdau entstehen kohäsive Enden, sogenannte sticky ends, mit einem 5'-Überhang [Lottspeich und Engels 2012].

Der Restriktionsverdau diente in dieser Arbeit einerseits der Überprüfung der Insertion des DNA-Fragments in die Plasmid-DNA und andererseits der Herstellung eines linearisierten Expressionsvektors sowie spezifischer DNA-Fragmente, die anschließend ligiert werden konnten.

Zusammensetzung des 10 µl-Reaktionsansatzes:

1,0 µg	Plasmid-DNA
1,0 µl	Restriktionsenzym-Puffer
1,0 µl	Restriktionsenzym
ad 10 µl	Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Zusammensetzung des 20 µl-Reaktionsansatzes:

10,0 µl	Plasmid-DNA
2,0 µl	Restriktionsenzym-Puffer
5,0 µl	Restriktionsenzym
3,0 µl	Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde 4 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.2.6 Bestimmung des DNA-Gehaltes im Photometer

Zur Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren wurden Absorptionsmessungen mithilfe des Photometers durchgeführt. Die Intensität eines Lichtstrahls beim Durchlaufen einer transparenten Substanz nimmt durch die Absorption der elektromagnetischen Strahlung ab. Das Ausmaß der Absorption wird als Extinktion

bezeichnet. Die Extinktion ist proportional zur Konzentration der absorbierenden Substanz und der durchlaufenden Schichtdicke. Die Nukleinsäurekonzentration wird im Vergleich zum Lösungsmittel, dessen Extinktion als Nullwert genommen wird, gemessen [Jansohn und Rothhämel 2012].

Die doppelsträngigen DNA-Proben wurden in Aqua bidest. verdünnt. Aqua bidest. diente als Nullwert.

2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte durch die Firma Seqlab - Sequence Laboratories Göttingen GmbH in Göttingen nach der Extended HotShot-Methode. Zur Sequenzierung wurden 1 µg Plasmid-DNA und 20 pmol Primer in ein 0,5 ml-Reagiergefäß pipettiert. Der Ansatz wurde auf 7 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt.

2.2.8 Herstellen von Glyzerinstocks

Um Bakterienzellen längerfristig aufbewahren zu können, wurden Glyzerinstocks angelegt.

In einem Kryoröhrchen wurden 200 µl 100%iges Glycerin mit 800 µl Bakterienlösung gemischt. Anschließend wurde das Gemisch 4 min in flüssigem Stickstoff und daraufhin im -80 °C-Gefrierschrank gelagert.

2.2.9 Midi-Präparation

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA mittels des Qiafilter Plasmid Midi-Kits basierte auf dem Prinzip der Alkalischen Lyse. Die DNA denaturiert bei einem stark alkalischen pH-Wert. Nach der Neutralisierung hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt [Mühlhardt 2009]. Anschließend wird die Plasmid-DNA unter salzarmen Bedingungen an Anionenaustauscherharze gebunden. Verunreinigungen werden in einem Waschschrift entfernt. Die Plasmid-DNA wird in einem salzhaltigen Puffer eluiert und anschließend wieder durch Ausfällung mit Isopropanol entsalzen.

Es wurden 25 µl der Startkultur aus dem Glyzerinstock zu 25 ml LB-Medium und 25 µl Ampicillin (c = 100 mg/ml) in einen Erlenmeyer-Kolben pipettiert. Dieser wurde 12 h bei 37 °C auf dem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Danach wurde die Kultur 15 min bei 6000 × g und 4 °C zentrifugiert, um die Bakterienzellen zu pelletieren. Der Überstand

wurde abgenommen. Das Bakterienpellet wurde in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Danach wurden 4 ml Puffer P2 hinzugefügt. Das Gefäß wurde 6-mal invertiert, um die Suspension zu mischen. Das Gefäß wurde im Anschluss 5 min bei 20 °C inkubiert. Dann wurden 4 ml Puffer P3 zum Lysat hinzugefügt und durch 6-maliges Invertieren gemischt. Das Lysat wurde auf die Säule des Qiafilters gegeben und 10 min bei 20 °C inkubiert. Währenddessen wurde der Qiagen-tip 100 äquilibriert. Dazu wurden 4 ml Puffer QBT auf ihn aufgetragen. Die Säule entleerte sich durch die Schwerkraft. Anschließend wurde ein Stempel auf den Qiafilter gesetzt, mithilfe dessen das Zelllysat durch den äquilibrierten Qiagen-tip gefiltert wurde. Nachdem das klare Lysat durch den Qiagen-tip gelaufen war, wurde dieser 2-mal mit 10 ml Puffer QC gewaschen. Danach wurde die Plasmid-DNA mit 5 ml Puffer QF eluiert. Im nächsten Schritt wurde die Plasmid-DNA präzipitiert, indem 3,5 ml 20 °C warmer Isopropanol zur eluierten DNA hinzugefügt wurden. Das Gefäß wurde gemischt und 45 min bei 10000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde mit 2 ml 20 °C warmem, 70%igem Ethanol gewaschen und 15 min bei 10000 × g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 10 min an der Luft getrocknet. Die Plasmid-DNA wurde danach in 300 µl Aqua bidest. gelöst.

2.2.10 DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel

Nach der Agarose-Gelelektrophorese kann die DNA aus dem Agarose-Gel extrahiert werden, indem die Agarose und die DNA zuerst in hohen Konzentrationen Natriumiodid, einem chaotropen Salz, gelöst werden. Die in Natriumiodid gelöste DNA bindet effektiv an Borosilikatglas [Vogelstein und Gillespie 1979].

Die DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel erfolgte mit dem NucleoSpin Extract-Kit. Zuerst wurde das DNA-Fragment aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten, gewogen und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Pro 100 mg Agarose-Gel wurden 200 µl Puffer NTI hinzugefügt. Die Probe wurde 10 min bei 50 °C inkubiert, wobei sie alle 2 min resuspendiert wurde, bis sich das Gel gelöst hatte. Anschließend wurde die DNA unter Vorhandensein von chaotropen Salzen an die Silikamembran in der NucleoSpin Extract II-Säule gebunden. Die NucleoSpin Extract II-Säule wurde in ein Sammelgefäß gesteckt und mit der Probe beladen. Die Säule wurde 1 min bei 11000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die NucleoSpin Extract II-Säule wurde wieder in das Sammelgefäß gesteckt. Danach wurden in einem Waschschrift mit dem

ethanolhaltigen Puffer NT3 Kontaminationen entfernt. Es wurden 700 µl Puffer NT3 auf die NucleoSpin Extract II-Säule gegeben. Die Säule wurde 1 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die NucleoSpin Extract II-Säule wurde wieder in das Sammelgefäß gesteckt. Danach wurde nochmals 2 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert, um den Puffer NT3 vollständig zu entfernen. Die NucleoSpin Extract II-Säule wurde anschließend 5 min bei $70 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Dann wurde sie in ein neues 1,5 ml-Gefäß gesteckt. Schließlich wurde die reine DNA unter salzarmen Bedingungen in dem Puffer NE eluiert. Dazu wurden 30 µl Puffer NE hinzugefügt und die Säule 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurde sie 1 min bei $11000 \times g$ zentrifugiert und damit die DNA eluiert.

2.2.11 Vektor-Dephosphorylierung

Wenn ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wird, entstehen dabei zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können.

Um dies zu verhindern, wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1+ nach dem Restriktionsverdau dephosphoryliert.

Bei der Dephosphorylierung werden die Phosphatreste an den 5'-Enden der DNA durch eine Phosphatase entfernt, sodass eine Selbstligation nicht mehr möglich ist [Mühlhardt 2009].

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

10,0 µl	0,1 µg/µl Expressionsvektor pcDNA3.1+
1,0 µl	5.000 U/ml Antarctic Phosphatase
1,5 µl	Antarctic Phosphatase-Reaktionspuffer
2,5 µl	Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde 15 min bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert und anschließend für 5 min bei $65 \text{ }^\circ\text{C}$ hitzeinaktiviert.

2.2.12 Ligation

Als Ligation bezeichnet man die Verknüpfung zweier DNA-Ketten durch eine Ligase. Die DNA-Ligase ist ein Enzym, das für die Replikation und Reparatur der DNA in *E.coli*-Bakterien benötigt wird. Die T4-DNA-Ligase stammt aus dem Bakterium *E.coli*,

das mit dem Bakteriophagen T4 infiziert ist. Diese Ligase katalysiert die Synthese von Phosphodiesterbindungen zwischen anliegenden 3'-Hydroxylgruppen und 5'-Phosphorylgruppen bei DNA-Doppelstrangbrüchen [Lehman 1974].

2.2.12.1 Ligation der Gene *RLBP1* und *RDH5* in den Expressionsvektor *pcDNA3.1+*

Die DNA-Ligase hat sich *in vitro* als ein nützliches Reagens zur Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle erwiesen [Lehman 1974]. Die Vektor-DNA wurde durch die T4-DNA-Ligase mit der Insert-DNA verknüpft.

Der Ligationsansatz setzte sich zusammen aus:

1,5 µl	0,067 µg/µl Vektor-DNA
genspezifische Menge	cDNA
1,0 µl	1 U/µl T4 DNA Ligase (Invitrogen)
4,0 µl	T4 DNA Ligase Puffer (Invitrogen)
ad 20 µl	Aqua bidest.

Der Ligationsansatz wurde 4 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.12.2 Religation des *RLBP1*-Gens in den Expressionsvektor *pcDNA3.1+*

Zu dem 10 µl-Ansatz des Restriktionsverdaus der Plasmid-DNA *pcDNA3.1+RLBP1* mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* wurde Folgendes hinzugefügt:

0,5 µl	400.000 U/ml T4 DNA Ligase (New England Biolabs)
1,5 µl	10 × T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs)
3,0 µl	Aqua bidest.

Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.12.3 Ligation stumpfer Enden

Die Ligation der stumpfen Enden, die am 5'-Ende phosphoryliert waren, erfolgte durch die T4-DNA-Ligase.

Zusammensetzung des Reaktionsansatzes:

plasmidspezifische Menge	Plasmid-DNA
1,0 µl	400.000 U/ml T4 DNA Ligase (New England Biolabs)
2,0 µl	10 × T4 DNA Ligase Puffer (New England Biolabs)
ad 20,0 µl	Aqua bidest.

Die Reaktionsansätze wurden 1 h bei Raumtemperatur und anschließend 20 min bei 70 °C im Heizblock inkubiert.

2.2.13 Herstellung elektrokompetenter XL1-Blue *E.coli*

Es wurde eine Kultur, bestehend aus 5 ml LB-Medium, 5 µl XL1-Blue *E.coli* aus einem Glycerinstock und 5 µl Antibiotikum 10 µg/µl Tetracyclin, in einem Erlenmeyer-Kolben hergestellt. Die Kultur wurde 16 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden 2 ml dieser Kultur entnommen und mit 100 ml LB-Medium und 100 µl Antibiotikum 10 µg/µl Tetracyclin versetzt. Diese Kultur wurde 2 - 3 h bei 37 °C und 180 rpm auf dem Orbitalschüttler inkubiert, bis eine OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 0,8 erreicht worden war. Daraufhin wurde die Zellsuspension in 50 ml-Reaktionsgefäße abgefüllt und 30 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde die Zellsuspension 5 min bei 5100 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 5100 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 25 ml eiskaltem 1 mM HEPES-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 5100 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 5100 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 5 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut 5 min bei 5100 × g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 1 ml eiskaltem 10%igem Glycerin resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl-Aliquots in 1,5 ml-Reagiergefäßen hergestellt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Aliquots im Gefrierschrank bei -80 °C gelagert.

2.2.14 Transformation in XL1-Blue *E.coli*

Die Transformation der rekombinanten DNA in Bakterienzellen erfolgte mittels Elektroporation.

Dabei werden die suspendierten Bakterienzellen in dem Elektroporationsgerät in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Pulsen mit hoher Feldstärke ausgesetzt. Dadurch entstehen kurzzeitig Poren in der Plasmamembran, durch die die DNA in die Zelle gelangen kann [Lottspeich und Engels 2012].

1,5 µl der Vektor-DNA wurden zu 100 µl elektrokompetenten XL1-Blue *E.coli* hinzugefügt. Der Ansatz wurde leicht gemischt und 15 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gemisch in eine 0,1 cm Küvette gegeben. Die Proben wurden im Elektroporationsgerät elektrotransformiert. Danach wurden rasch 1000 µl LB-Nährmedium, das auf Raumtemperatur erwärmt war, hinzugefügt. Das Gemisch wurde in ein 1,5 ml-Reagiergefäß umgefüllt und 1 h bei 37 °C und 100 rpm auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Gemisch 5 min bei $9167 \times g$ zentrifugiert. 800 µl des Überstandes wurden abgenommen. 100 µl des verbliebenen Zentrifugats wurden auf einer auf 37 °C vorgewärmten Agarplatte, welche mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt war, ausgestrichen. Die Agarplatten wurden 12 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.15 Maxi-Präparation

Die Reinigung der Plasmid-DNA mittels Qiagen Maxiprep-Kit basierte wie bei dem Qiafilter Plasmid Midi-Kit auf dem Prinzip der Alkalischen Lyse.

Über eine Maxi-Präparation wurde die Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur isoliert, um große DNA-Mengen für die Transfektion zu erhalten. Dazu wurden 100 µl der Startkultur in einen Erlenmeyer-Kolben gegeben, der mit 100 ml LB-Nährmedium und 100 µl Ampicillin ($c = 100 \text{ mg/ml}$) befüllt war. Die Kultur wurde 12 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Anschließend wurde die Übernachtskultur 15 min bei $6000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Bakterienpellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurden 10 ml Puffer P2 hinzugefügt und gemischt, indem das 50 ml-Reaktionsgefäß 6-mal invertiert wurde. Dann wurde das Reaktionsgefäß 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 10 ml gekühlter Puffer P3 hinzugefügt und sofort gemischt, indem das Reaktionsgefäß erneut 6-mal invertiert wurde. Danach wurde das Reaktionsgefäß 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde das Gemisch 60 min bei $10000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die Plasmid-DNA enthielt, wurde abgenommen. Der Überstand wurde erneut 30 min bei $10000 \times g$ und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder

abgenommen. Zwischenzeitlich wurde ein Qiagen-tip 500 äquilibriert, indem 10 ml Puffer QBT aufgetragen wurden und gewartet wurde, bis sich die Säule vollständig entleert hatte. Dann wurde der abgenommene Überstand auf den Qiagen-tip aufgetragen und durchlaufen lassen. Anschließend wurde der Qiagen-tip mit 2×30 ml Puffer QC gewaschen. Daraufhin wurde die DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA wurde präzipitiert, indem 10,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur zur eluierten DNA hinzugefügt wurden. Es wurde gemischt und sofort 30 min bei $15000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig umgefüllt. Das DNA-Pellet wurde mit 5 ml 70%igem Ethanol bei Raumtemperatur gewaschen. Danach wurde 10 min bei $15000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut vorsichtig umgefüllt, ohne das Pellet zu zerstören. Das Pellet wurde 10 min luftgetrocknet. Danach wurde die DNA in 1 ml Aqua bidest. gelöst.

2.2.16 Mutagenese-PCR

Das Einfügen der Mutationen in die Vektor-DNA erfolgte mittels der Phusion Hot Start DNA-Polymerase und selbst kreierte spezifischen Primern.

Hierbei handelte es sich um eine zielgerichtete Mutagenese-PCR mit einer doppelsträngigen Plasmid-DNA sowie einem mutierten und einem nichtmutierten Primer. Die Punktmutation in dem mutierten Primer wurde durch ein mutationsspezifisches Nukleotid kreierte. Dieses befand sich in der Mitte des Primers, umgeben von komplementären Nukleotiden.

Die doppelsträngige Plasmid-DNA wurde in der PCR durch Hitze denaturiert, sodass zwei Einzelstränge entstanden. Die beiden Primer lagerten sich nicht überlappend, sondern Rücken an Rücken an die Plasmid-DNA in Strang- bzw. Gegenstrangrichtung an. Die Primer, die an ihrem 5'-Ende phosphoryliert waren, produzierten lineare DNA-Doppelstränge mit stumpfen phosphorylierten 5'-Enden. Die linearen DNA-Doppelstränge konnten aufgrund der phosphorylierten 5'-Enden direkt in die Ligation eingesetzt werden. Durch die exponentielle Amplifikation der Plasmid-DNA war der Anteil nichtmutierter Plasmid-DNA minimal. Die nichtmutierte Plasmid-DNA wurde deshalb nicht zerstört.

Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

mutationspezifische Menge	Plasmid-DNA
0,5 µl	2 U/µl Phusion Hot Start DNA-Polymerase
10,0 µl	5 × Phusion HF Puffer
2,5 µl	10 pmol/µl Primer A
2,5 µl	10 pmol/µl Primer B
1,0 µl	10 mM dNTPs
ad 50,0 µl	Aqua bidest.

Die DNA des Reaktionsansatzes wurde in einem Thermocycler initial 30 s bei 98 °C denaturiert. Anschließend wurde ein 3-Schritt-Zyklus durchgeführt:

Tabelle 2.13: Mutagenese-PCR-Bedingungen

Reaktionsschritt	Zeit [s]	Temperatur [°C]	Wiederholungen
Denaturierung	10	98	35
Annealing	30	65	
Elongation	210	72	

Diese 3 Schritte wurden 35-mal durchgeführt. Die letzte Elongationszeit betrug 7 min bei 72 °C. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 10 °C abgekühlt.

2.2.17 Kultivierung der HEK293T- und HeLa-Zellen

Die Arbeit mit den HEK293T- und HeLa-Zellen wurde unter der Reinluftwerkbank vorgenommen. Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen unter Hinzugabe von 10 ml DMEM (+++). Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nachdem die adhärennten Zellen eine Konfluenz von 90% erreicht hatten, wurden sie abgelöst und frischem Kulturmedium zugeführt. Dazu wurde das Kulturmedium mit einer sterilen Glaspipette abgenommen. Die Zellen wurden mit 10 ml 1 × PBS gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Accutase zu den Zellen hinzugefügt. Die Zellen wurden 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu den abgelösten Zellen in der Zellsuspension wurden 8 ml DMEM (+++) hinzugefügt. 1 ml dieser Zellsuspension wurde in eine neue Zellkulturflasche gegeben und 9 ml DMEM (+++) wurden hinzugefügt. Die übrigen 9 ml der Zellsuspension wurden ebenfalls zu jeweils 1 ml auf neue Zellkulturflaschen verteilt und in 9 ml DMEM (+++) verdünnt. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5% CO₂ weiterinkubiert.

2.2.17.1 Kryokonservierung der HEK293T- und HeLa-Zellen

Zur Lagerung über einen längeren Zeitraum wurden die Zellen kryokonserviert. Dazu wurde das Kulturmedium der Zellen mit einer sterilen Glaspipette abgezogen. Die Zellen wurden 5 min in 2 ml Accutase bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 8 ml DMEM (+++) zu der Zellsuspension hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und 10 min bei $125 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Einfriermedium (90% FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Diese Suspension enthielt 1×10^6 Zellen. Die Suspension wurde in ein Kryoröhrchen umgefüllt und bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierschrank gelagert.

2.2.18 Transfektion durch Lipofektion

Die Transfektion der Vektor-DNA in HEK293T- und HeLa-Zellen erfolgte mittels Lipofektion. Darunter versteht man das Einbringen der Vektor-DNA in die Zielzelle durch die Bildung von DNA-Liposomen-Komplexen, die durch einen Endozytose-Mechanismus in die Zelle aufgenommen werden [Zhou und Huang 1994]. In den Liposomen ist das kationische Lipid N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA) enthalten, welches mit der DNA interagiert und DNA-Lipid-Komplexe bildet. Die Komplexbildung beruht auf der Interaktion zwischen den positiv geladenen DOTMA-Molekülen und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA. Dabei binden mehrere kationische Lipide an eine Vektor-DNA, sodass diese dem Komplex eine positive Ladung verleihen. Dieser positiv geladene Komplex kann dann an die negativ geladene Oberfläche der Zellmembran binden [Felgner *et al.* 1987].

2.2.18.1 Lipofectamine LTX-Kit

Die mittels Maxi-Präparation aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in HEK293T- und HeLa-Zellen transfiziert. Dazu wurde ein 1,5 ml-Reagiergefäß mit 500 μl DMEM High Glucose und 4 μg Plasmid-DNA befüllt. Als Negativ-Kontrolle diente DMEM High Glucose und als Positiv-Kontrolle 500 μl DMEM High Glucose mit 4 μg GFP-Vektor (pEGFP-N1). Das grün fluoreszierende Protein (GFP) hat sich als Marker der Genexpression etabliert. Es stammt aus der Qualle *Aequorea victoria*. GFP emittiert bei Anregung mit kurzwelligem Licht längerwelliges Licht [Tsien 1998]. Die Proben wurden resuspendiert. Anschließend wurden 7,5 μl PLUSTM Reagent zu den Proben hinzugefügt. Die Proben wurden erneut resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Danach wurden 22,5 µl Lipofectamine LTX zu den Proben hinzugefügt. Die Proben wurden erneut resuspendiert und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium DMEM (++++) auf den Zellen in der 6-Loch-Platte wurde währenddessen gewechselt. Pro Loch der 6-Loch-Platte waren 1 ml der Zellsuspension der kultivierten HEK293T- bzw. HeLa-Zellen ausgesät worden. Nach 30 min wurden die Proben (DNA-Lipid-Komplexe) tropfenweise zu den HEK293T- bzw. HeLa-Zellen in der 6-Loch-Platte hinzugefügt. Die 6-Loch-Platte wurde 5 min auf dem Schüttler bei 50 rpm inkubiert. Anschließend wurde die 6-Loch-Platte bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurde die Transfektion durch Auswertung der GFP-Expression mit dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert.

2.2.18.2 Roti[®]-Fect Plus

Mittels Roti[®]-Fect Plus wurde die Plasmid-DNA ebenfalls durch Lipofektion transfiziert. Es wurde ein 1,5 ml-Reagiergefäß mit 5 µg Plasmid-DNA und 100 µl DMEM High Glucose hergestellt. Die Lösung wurde gemischt. Ein 2 ml-Reagiergefäß wurde mit 10 µl Roti[®]-Fect Plus und 1,8 ml DMEM High Glucose befüllt. Die Lösung wurde gemischt. Die beiden Lösungen wurden vereinigt, ohne sie zu mischen. Als Negativ-Kontrolle wurden 100 µl DMEM High Glucose ohne Plasmid-DNA eingesetzt, die ebenfalls zu 10 µl Roti[®]-Fect Plus und 1,8 ml DMEM High Glucose gegeben wurden. Der Reaktionsansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Reaktionsansatz zu einem Loch der 6-Loch-Platte hinzugefügt. In einem Loch der 6-Loch-Platte war 1 ml der Zellsuspension der kultivierten Zellen angesetzt worden. Die 6-Loch-Platte wurde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde, 20 min bevor der Transfektionsansatz hinzugefügt wurde, durch 0,5 ml DMEM (++++) ausgetauscht. Die Zellen mit dem Transfektionsansatz wurden 6 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml DMEM (++++) ersetzt. Die Zellen wurden weitere 12 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.19 M-PER-Proteinextraktionsreagens

Das M-PER-Proteinextraktionsreagens extrahiert zytoplasmatische und nukleäre Proteine aus kultivierten Säugetierzellen. Das Reagens besteht aus einem geschützten Detergens für die Zelllyse, das in 25 mM Bicine-Puffer bei einem pH-Wert von 7,6 gelöst ist. Es führt zur effektiven Lyse von plattierten Zellen.

Das Kulturmedium wurde von den adhärennten Zellen abgenommen. Auf jedes Loch der 6-Loch-Platte wurden 200 µl M-PER-Reagens pipettiert. Die 6-Loch-Platte wurde 5 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde das Zelllysat in 1,5 ml-Reagiergefäße umgefüllt und 10 min bei $14000 \times g$ zentrifugiert, um den Zelldebris zu pelletieren. Der Überstand wurde abgenommen und in neue 1,5 ml-Reagiergefäße pipettiert.

2.2.20 Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit

Das Binden des Färbemittels Coomassie Brilliant Blue G-250 an ein Protein führt zu einer Veränderung des Absorptionsmaximums des Färbemittels von 365 zu 595 nm. Diese Zunahme der Absorption bei 595 nm ist messbar. Die Bindung des Färbemittels an das Protein erfolgt sehr schnell, innerhalb von ungefähr zwei Minuten. Eine Beeinflussung durch Kationen, wie Natrium oder Kalium, besteht allenfalls leicht, während große Mengen an Natriumdodecylsulfat und Triton X-100 die Reaktion stören [Bradford 1976]. Die Proteinkonzentration wird abgeschätzt, indem die Absorption mit der Absorption einer bekannten Standardreihe von Proteinen, die neben der unbekannt Probe gemessen werden, verglichen wird.

Die Probe wurde 1:10 verdünnt, das heißt, dass 5 µl der Probe in 45 µl Aqua bidest. gelöst wurden. Als Negativprobe wurden 50 µl Aqua bidest. eingesetzt. Zu beiden Proben wurden jeweils 1,5 ml Coomassie Plus (Bradford) Assay Reagent hinzugefügt. Die Proben wurden 10 min bei 20 °C inkubiert. Der Spektrophotometer wurde auf 595 nm gestellt. Das Messinstrument wurde durch eine Nullmessung mit Aqua bidest. eingestellt. Danach wurden die Proben gemessen. Der Durchschnittswert der Wiederholungsmessungen der Negativprobe wurde von dem Messwert der Positivprobe subtrahiert.

2.2.21 Die denaturierende diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli

Durch die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden die Proteine nach ihrer Molekularmasse aufgetrennt. Dazu werden die anderen Eigenschaften der Proteine, wie z.B. deren Form und Ladung, maskiert. Das anionische Detergens SDS führt dazu, dass die auf hydrophoben Wechselwirkungen beruhenden Bindungen innerhalb des Proteins nicht aufrechterhalten werden und die Quartär-, Tertiär- und Sekundärstrukturen des Proteins verloren gehen. Das Protein liegt dann in

linearer Form vor. Es wird zudem durch das stark negativ geladene SDS umhüllt, dessen negative Ladung die Eigenladung des Proteins überdeckt. Daher korreliert die Laufstrecke der resultierenden Bande allein mit der Größe des Proteins [Luttmann *et al.* 2009, Reinhard 2010].

Die Gelmatrix des Polyacrylamidgels entsteht durch Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid. Acrylamid bildet lineare Ketten, während Bisacrylamid für Verzweigungen sorgt, die die Ketten miteinander verbinden. So entsteht ein Netz, dessen Porengröße sich nach dem Verhältnis zwischen Acrylamid und Bisacrylamid richtet. Die Polymerisation ist eine Radikalreaktion und beginnt durch APS, das freie Elektronen für diese Reaktion liefert, und TEMED, das als Katalysator wirkt [Reinhard 2010].

Lämmli [1970] modifizierte das Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese. Diese hat den Vorteil, dass scharfe Proteinbanden aufgetrennt werden können. Die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese setzt sich aus einem Sammelgel und einem Trenngel zusammen. Das Sammelgel dient der Fokussierung der Proteine vor dem Eintritt in das Trenngel, sodass diese nahezu gleichzeitig in das Trenngel einwandern können. Im Trenngel erfolgt die Auftrennung der Proteine nach deren Molekulargewicht [Luttmann *et al.* 2009, Lämmli 1970].

Zuerst wurden die Glasplatten mit 70%igem Ethanol gereinigt.

Dann wurde ein 12%iges Trenngel hergestellt (25 ml):

Trenngel (12%)	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	6,25 ml
	20% SDS	125 µl
	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	10 ml
	Aqua bidest.	8,75 ml
	10% APS	200 µl
	TEMED	20 µl

Das Gel wurde gemischt und daraufhin zwischen die beiden zusammengesetzten Glasplatten ausgegossen. Darüber wurde eine dünne Schicht 100%igen Ethanols aufgetragen. Das Gel war nach 30 min bei Raumtemperatur auspolymerisiert. Dann wurde das Ethanol abgekippt und die Glasplatten wurden mit Tüchern getrocknet.

Anschließend wurde ein 4%iges Sammelgel hergestellt (10 ml):

Sammelgel (4%)	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	5,0 ml
	20% SDS	50 μ l
	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2,2 ml
	Aqua bidest.	2,8 ml
	10% APS	100 μ l
	TEMED	15 μ l

Das Sammelgel wurde über das Trenngel gegossen. Ein Kamm wurde in das Sammelgel gesteckt. Das Sammelgel war nach 30 min bei Raumtemperatur polymerisiert.

Es wurde ein SDS-PAGE-Laufpuffer hergestellt:

SDS-PAGE-Laufpuffer (10\times)	25 mM Tris	30,29 g
	192 mM Glycin	144,13 g
	10% (w/v) SDS	10 ml
	ad 1000 ml Aqua bidest.	

Der 10 \times SDS-PAGE-Laufpuffer wurde 1:10 in Aqua bidest. verdünnt.

Die aufgereinigten Proteine wurden mit dem Proteinauftragspuffer gemischt und anschließend 5 min bei 90 °C im Heizblock inkubiert. Der Proteinauftragspuffer hält den pH-Wert der Probe über einen weiten Temperaturbereich konstant und stabilisiert damit die Aspartyl-Prolyl-Peptidbindungen. Diese Peptidbindungen werden bei einem Erhitzen der Proteinprobe über 110 °C bevorzugt gespalten [Rittenhouse und Marcus 1984]. Der reduzierende Probenauftragspuffer führt außerdem zur Spaltung von Disulfidbrückenbindungen und damit zu einer weiteren Störung der Faltung der Proteine. Es können Zwischenstufen der gefalteten Proteine entstehen, die keine enzymatische Aktivität zeigen [Fountoulakis 1992].

Das Gel wurde in die Laufkammer eingespannt und die Pufferkammern wurden mit dem 1 \times SDS-PAGE-Laufpuffer befüllt.

Danach wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Das Gel lief 75 min bei einer Spannung von 250 V.

2.2.22 Western-Blot

Zum Nachweis von Proteinen werden diese auf Nitrozellulosemembranen fixiert und über spezifische Antikörper detektiert. Die Übertragung der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran geschieht mittels Elektrophorese in einem Semi-Dry-Blot. Die Proteine liegen danach auf der Nitrozellulosemembran immobilisiert vor und können mittels Antikörpern detektiert werden [Towbin *et al.* 1979]. Durch den Transfer der Proteine auf die Membran wird die Bindung der Antikörper an die Proteine erleichtert, da die Antikörper, die zu groß sind, um die Poren des Gels zu durchdringen, ihr Antigen auf der Membran gut erreichen können [Towbin *et al.* 1989]. Idealerweise repräsentiert eine Bande im Blot ein einziges Protein, sodass eine Immunreaktion mit einem bestimmten Protein dargestellt werden kann [Egger und Bienz 1994].

Es wurde ein Semi-Dry-Blot nach Kyhse-Andersen durchgeführt [Kyhse-Andersen 1984]. Das Semi-Dry-Blot-Gerät bestand aus zwei Elektroden. Dazwischen wurde der Blot aufgebaut. Dazu wurden zwei GB005 Whatman[®] gel blotting-Papiere und vier GB003 Whatman[®] gel blotting-Papiere in der Größe der Gelmembran zugeschnitten.

Es wurde folgender Blot-Transfer-Puffer eingesetzt:

Blot-Transfer-Puffer (10×)	250 mM Tris	30,3 g
	1,92 M Glycin	144,1 g
	20% Methanol	200 ml
	ad 1000 ml Aqua bidest.	pH 8,3

Der 10×Blot-Transferpuffer wurde 1:10 in Aqua bidest. verdünnt.

Das Filterpapier wurde in dem Blot-Transfer-Puffer getränkt.

Anschließend wurde ein GB005 Whatman[®] gel blotting-Papier auf die Anode gelegt. Darauf wurden zwei GB003 Whatman[®] gel blotting-Papiere gelegt. Die Filterpapiere wurden einzeln aufeinandergelegt und mit einem Reagenzglas glatt gestrichen, um Luftblasen zu beseitigen. Darauf wurde die in der Größe der Gelmembran zugeschnittene Protran[®]Nitrocellulose Transfer Membran gelegt. Auf diese wurde die Polyacrylamidgelmembran gelegt. Darüber wurden zuerst zwei weitere GB003 Whatman[®] gel blotting-Papiere und danach ein weiteres GB005

Whatman[®] gel blotting-Papier gestapelt. Auf den fertigen Stapel wurde der Deckel mit der Kathode aufgesetzt.

Es wurde 60 min bei 250 mA geblottet.

Danach wurde der Blot abgebaut. Die Protran[®] Nitrocellulose Transfer Membran wurde 3 min in 0,1% (w/v) in 5% Essigsäure Ponceau S-Lösung eingelegt und auf dem Taumelschüttler inkubiert. Damit wurde der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran überprüft. Die Proteinbanden waren rot angefärbt nachweisbar. Danach wurde das Ponceau S mit Aqua bidest. von der Nitrozellulosemembran abgewaschen. Die Nitrozellulosemembran wurde 12 h in 100 ml Blockierpuffer auf dem Taumelschüttler bei 20 rpm inkubiert. Der Blockierschritt ist essentiell, um die unspezifische Bindung der Antikörper zu vermindern. Dazu werden die unspezifischen Bindestellen in der Nitrozellulosemembran mit Kuhmilchproteinen blockiert. Außerdem wird durch die Blockierung die Renaturierung mancher Epitope gefördert [Hauri und Bucher 1986].

Anschließend folgten drei Waschschrte. Im ersten Waschschrte wurde die Nitrozellulosemembran 10 min in 1×TBS-T-Puffer auf dem Taumelschüttler bei 20 rpm inkubiert. Der 1×TBS-T-Puffer wurde erneuert und im zweiten Waschschrte wurde die Membran erneut 10 min unter Schütteln inkubiert. Der 1×TBS-T-Puffer wurde ein letztes Mal erneuert und im dritten Waschschrte wurde die Membran nochmals 10 min inkubiert.

Danach wurde die Nitrozellulosemembran mit dem polyklonalen primären Antikörper inkubiert. Dazu wurde der primäre Antikörper in 10 ml Blockierpuffer verdünnt. Die Membran wurde in den Puffer mit dem Antikörper eingelegt und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Taumelschüttler inkubiert. Danach wurde die Membran in drei Schritten wie oben beschrieben gewaschen. Anschließend wurde der gebundene primäre Antikörper durch einen spezifischen sekundären Antikörper detektiert. Dieser sekundäre Antikörper erkennt Domänen des primären Antikörpers und bindet an diesen. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Die Möglichkeit, dass mehrere sekundäre Antikörper an denselben primären Antikörper binden können, resultiert in einer Signalverstärkung [Green und Sambrook 2012]. Der sekundäre Antikörper wurde in 10 ml Blockierpuffer verdünnt. Die Membran wurde

darin 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der überschüssige Sekundärantikörper wie oben beschrieben mit $1\times$ TBS-T abgewaschen.

Anschließend erfolgte die Immundetektion mittels Chemilumineszenz. Dazu wurde die Membran auf Frischhaltefolie ausgebreitet und mit 4 ml (jeweils 2 ml) der ECL Western blotting detection-Reagenzien beträufelt, bis sie vollständig bedeckt war. Das Prinzip der Detektion beruht dabei auf der verstärkten Chemilumineszenz (ECL = enhanced Chemiluminescence). Unter Chemilumineszenz versteht man die Produktion von Licht durch eine chemische Reaktion. Die chemische Reaktion liefert dabei die Energie zur Anhebung von Elektronen in einen angeregten Zustand. Der Rückfall dieser Elektronen aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand wird durch die Aussendung von Licht begleitet, was man als Lumineszenz bezeichnet [Whitehead *et al.* 1979]. Die an den sekundären Antikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase katalysiert unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Luminol. Sobald die Oxidation erfolgt ist, befindet sich Luminol in einem angeregten Zustand. Es zerfällt dann unter Lichtemission in seinen Grundzustand. Die verstärkte Chemilumineszenz wird durch die Durchführung der Oxidation von Luminol durch die Meerrettich-Peroxidase in Gegenwart von chemischen Verstärkern, wie z.B. Phenolen, erreicht.

Die Nitrozellulosemembran wurde 1 min mit den ECL Western blotting detection-Reagenzien inkubiert und anschließend mit Aqua bidest. gewaschen. Die Membran wurde zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Röntgenkassette gelegt und inkubiert. Danach wurde der Röntgenfilm entwickelt. Dazu wurde er 2 min im Entwickler geschwenkt und danach in Aqua bidest. Daraufhin wurde er 2 min im Fixierer geschwenkt und danach erneut in Aqua bidest. Der Röntgenfilm wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.23 Immunhistochemie

Durch die Immunhistochemie wurden die Proteine an ihrem Aufenthaltsort innerhalb der Zelle lokalisiert.

Die Proteine wurden durch die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung detektiert. Das heißt, dass ein primärer Antikörper an das Protein bindet, an den wiederum ein spezifischer sekundärer Antikörper binden kann, der fluorochromiert ist. Durch die indirekte Immunfluoreszenzmarkierung besteht der Vorteil der Signalverstärkung, da

mehrere sekundäre Antikörper an einen primären Antikörper binden können. Die Fluorochrome, die fluoreszierenden Farbstoffe, absorbieren Licht einer bestimmten Wellenlänge und emittieren es bei einer anderen längeren Wellenlänge. Bei Bestrahlung des Fluorochroms mit Licht der Wellenlänge des Absorptionsbereichs und anschließender Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop durch einen Filter, der nur für Licht des emittierten Wellenlängenbereichs durchlässig ist, leuchtet das Fluorochrom vor dunklem Hintergrund. Bei gleichzeitiger Kombination von zwei Fluorochromen, die sich in ihrem Absorptions- und Emissionsspektrum unterscheiden, ist die Kolokalisation verschiedener Enzyme subzellulär parallel nachweisbar [Lottspeich und Engels 2012].

Die in einer 8-Loch-Imaging-Kammer transfizierten HeLa- und ARPE-19-Zellen wurden mit 4%igem PFA auf dem Objektträger fixiert. Dazu wurde das Medium abgenommen. Die Zellen wurden mit 100 µl 4%igem PFA bedeckt und 10 min bei 20 °C inkubiert. Danach folgten 3 Waschschriffe mit 1×PBS. Dazu wurde das 4%ige PFA abpipettiert. Die Zellen wurden in jedem Loch der 8-Loch-Platte mit 100 µl 1×PBS bedeckt und 10 min bei 20 °C inkubiert. Danach wurde die 1×PBS erneuert und der Waschschriff zweimal wiederholt. Anschließend wurde die 1×PBS wieder abpipettiert. Die Zellen wurden mit 100 µl des verdünnten Primärantikörpers bedeckt. Der Primärantikörper wurde 1:50 in einer 3%igen BSA-Blockierlösung verdünnt. Die Zellen wurden 70 min bei 20 °C mit dem Primärantikörper inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen. Es folgten wieder 3 Waschschriffe mit 1×PBS und einer jeweiligen Inkubationszeit von 10 min. Anschließend wurde die 1×PBS entfernt und 100 µl des Verdünnungsansatzes des Sekundärantikörpers wurden aufgetragen. Der Sekundärantikörper wurde 1:400 in einer 3%igen BSA-Blockierlösung verdünnt. Die Zellen wurden 60 min bei 20 °C und in Dunkelheit mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde der Sekundärantikörper abpipettiert. Es folgten 2 Waschschriffe in Dunkelheit mit 1×PBS und einer jeweiligen Inkubationszeit von 10 min bei 20 °C. Daraufhin wurden die Zellen in 100 µl einer 1:5000 in Methanol verdünnten DAPI-Lösung für 3 min bei 20 °C und in Dunkelheit inkubiert.

Mit der DAPI-Lösung können die Zellkerne angefärbt werden. DAPI ist ein DNA-bindendes Fluorochrom. Es bildet einen fluoreszierenden Komplex, indem es sich an die AT-reichen Sequenzen in der kleinen Furche der DNA anlagert [Kapuscinski 1995].

Es folgte ein weiterer Waschschrift in Dunkelheit mit 1×PBS und einer Inkubationszeit von 10 min bei 20 °C. Anschließend wurde die 1×PBS wieder abgenommen. Die Silikonrahmen wurden von dem Objektträger entfernt. Dieser wurde in Aqua bidest. eingetaucht und im Anschluss bei 50 °C getrocknet. Das Präparat wurde mit Dako Fluorescent Mounting Medium beschichtet und mit einem Deckglas belegt. Das Medium verstärkt die Visualisierung der Proben bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop und verzögert das Ausbleichen der Fluoreszenz. Der Objektträger wurde 12 h bei 4 °C gelagert und danach unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung des *RDH5*-Gens

3.1.1 Amplifikation des *RDH5*-Gen-Transkriptes

Zunächst wurde eine Two step-Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nach dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial lag die mRNA einer humanen Gewebeprobe des retinalen Pigmentepithels vor. Die Konzentration der mRNA betrug 268 ng/ μ l. Davon wurde 1 μ l in den Reaktionsansatz zur Reversen-Transkriptase-Reaktion eingesetzt. Mittels der Reversen Transkriptase und des sequenzspezifischen Primers *RDH5*-Rtb für das *RDH5*-Gen, der zu 10 pmol/ μ l konzentriert war, wurde die komplementäre DNA (cDNA) des entsprechenden mRNA-Abschnitts in der Reversen-Transkriptase-Reaktion (siehe Kapitel 2.2.1.1) gewonnen.

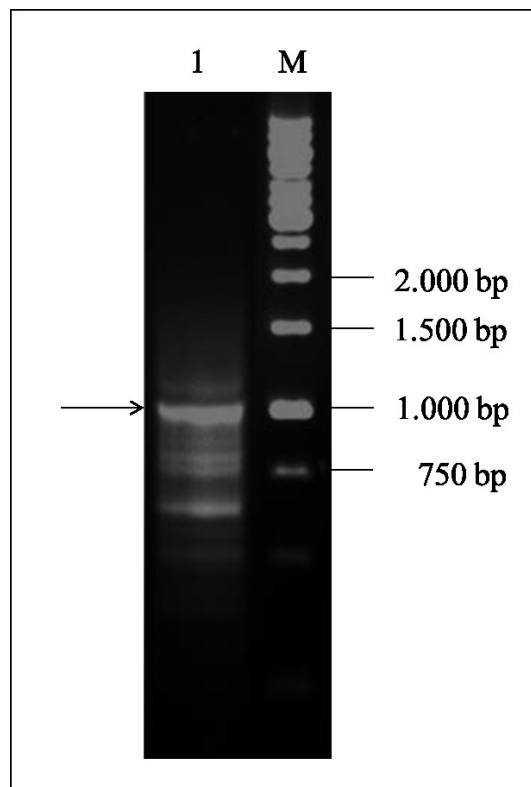


Abbildung 3.1: Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes *RDH5*. (1) *RDH5*-RT-PCR-Produkt. Das *RDH5*-Gen besitzt eine Größe von 1026 bp (\rightarrow). Durch die Agarose-Gelelektrophorese konnte die korrekte Amplifikation des *RDH5*-Gens gezeigt werden. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Die gewonnene cDNA wurde anschließend in den Reaktionsansatz zur Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.1.2 beschriebenen Protokoll, wobei abweichend davon die Annealingzeit 30 s betrug. Es wurde 1 µl, entsprechend einer Menge von 100 ng, cDNA verwendet. Weiterhin wurde 1 µl des 10 pmol/µl genspezifischen Primers A RDH5-Rta und 1 µl des 10 pmol/µl genspezifischen Primers B RDH5-Rtb eingesetzt.

5 µl des PCR-Produkts wurden anschließend auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Protokoll. Das Ergebnis der Gelelektrophorese ist in Abbildung 3.1 zu sehen. Die Länge des *RDH5*-PCR-Produktes beträgt 1026 Basenpaare.

3.1.2 Klonierung des *RDH5*-Gens in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

Das PCR-Produkt wurde im nächsten Schritt in einem Reaktionsansatz zur TA-Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor kloniert (siehe Abbildung 3.2).

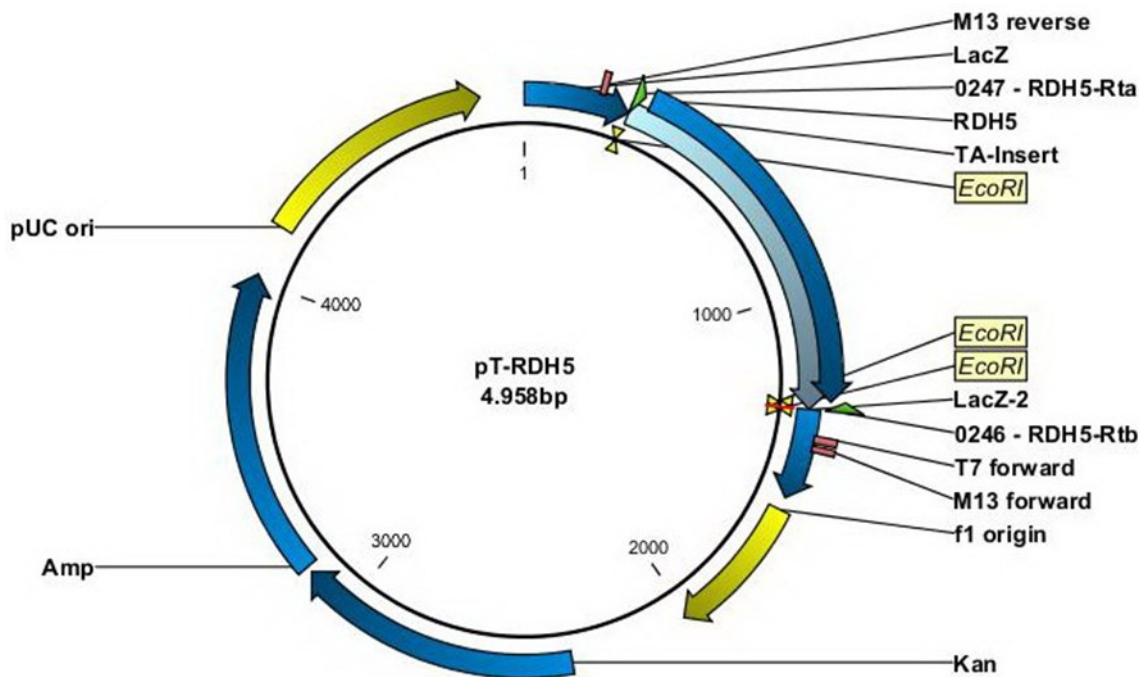


Abbildung 3.2: Vektorkarte des pT-RDH5-Vektors. TA-Insert: TA-kloniertes *RDH5*-PCR-Produkt, *RDH5*: kodierendes Insert, *EcoRI*: Restriktionsschnittstelle, T7 forward, M13 (reverse und forward): Sequenzierprimerbindestellen, LacZ(-2): LacZ-Gen zur Identifikation positiver Klone (hier geteilt durch das Insert), Amp, Kan: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Kanamycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, 0245-RDH-Rta und 0246-RDH-Rtb: Primer für das Insert.

Die TA-Klonierung erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Protokoll. Dafür wurden 1,5 µl des PCR-Produkts verwendet. Nach der TA-Klonierung erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in elektrokompetente *E.coli*-Bakterienzellen durch Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.3.2). Dabei betrug die Pulszeit $t = 4,7$ ms bei einer Spannung von $U = 1893$ V.

Die Bakterienzellen wurden anschließend auf einer Agarplatte, die mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt war, ausgestrichen und 12 h im Brutschrank inkubiert. Nach 12 h Inkubation waren auf der Agarplatte mehrere Klone gewachsen. Von 11 dieser Klone wurde über eine Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) die Plasmid-DNA isoliert.

Daraufhin wurde ein Restriktionsverdau nach dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Protokoll mit der Plasmid-DNA pT-RDH5 und dem Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt. Dabei wurde der lineare Genabschnitt *RDH5* mit *EcoRI*-Schnittstellen an beiden Enden aus dem Vektor ausgeschnitten. In den 10 µl-Reaktionsansatz des Restriktionsverdaus wurden 3,0 µl Plasmid-DNA eingesetzt.

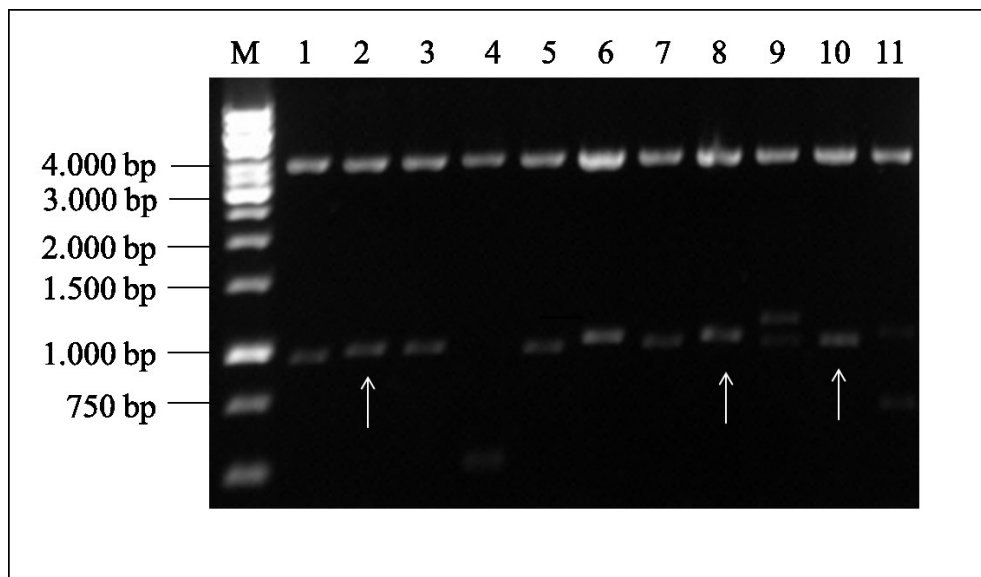


Abbildung 3.3: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT-RDH5 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. (1 - 11) Restriktionsverdau der Klone 1 - 11. Durch den Restriktionsverdau entstehen bei den korrekt klonierten Klonen zwei Fragmente in der Größe von 3932 bp und 1026 bp. Die markierten Klone (→) wurden sequenziert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

5 µl des Restriktionsverdau der einzelnen Klone wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. In Abbildung 3.3 ist das Ergebnis des Restriktionsverdau dargestellt. Der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor hat eine Größe von 3,932 kb, während das *RDH5*-Insert eine Größe von 1026 bp besitzt.

Die Klone 2, 8 und 10 wurden zur Prüfung des Inserts mit den Primern M13 forward und M13 reverse nach dem in Kapitel 2.2.7 beschriebenen Protokoll sequenziert. Bei Klon 8 wurde die korrekte Integration eines fehlerfreien *RDH5*-Transkripts in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor bestätigt. Von diesem Klon wurde ein Glyzerinstock (siehe Kapitel 2.2.8) angefertigt.

3.1.3 Klonierung des *RDH5*-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1+

Die Plasmid-DNA pT-RDH5-8 wurde über eine Midi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.9) isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt. Dieser betrug 682 ng/µl. Es folgte ein Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*.

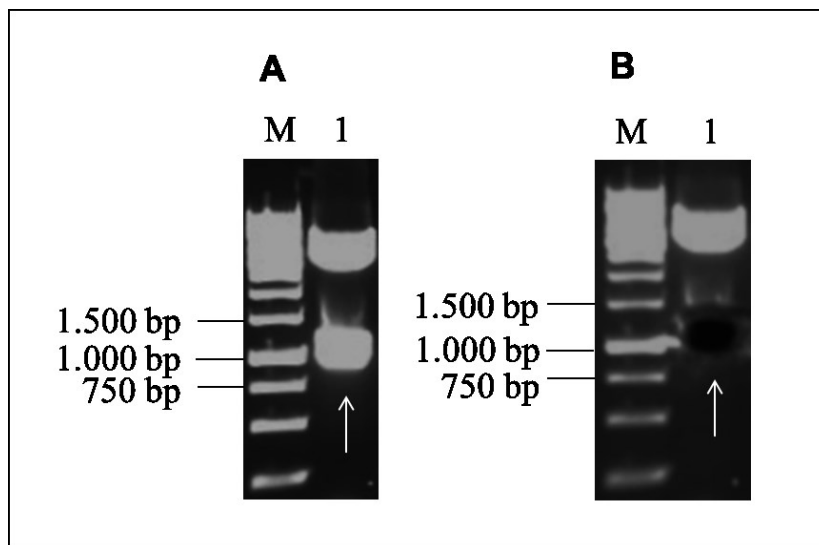


Abbildung 3.4: Agarose-Gelelektrophorese des *EcoRI*-Restriktionsverdau der Vektor-DNA pT-RDH5-8. (A) (M) 1 kb DNA-Größenmarker. (1) Restriktionsverdau der Vektor-DNA pT-RDH5-8 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. Durch den Restriktionsverdau entstanden zwei Fragmente. Das größere Fragment entsprach der Vektor-DNA. Das kleinere, 1049 bp-große Fragment (→) entsprach dem *EcoRI*-Insert mit dem *RDH5*-Gen. (B) (M) 1 kb DNA-Größenmarker. (1) Das *RDH5*-Insert (→) wurde aus dem Agarose-Gel extrahiert.

Es wurde ein 20 µl-Reaktionsansatz nach dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Protokoll mit 10 U/µl Restriktionsenzym hergestellt. Der Restriktionsansatz wurde unter Hinzugabe von 5 µl DNA-Ladepuffer auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Die in der Abbildung 3.4 dargestellte Bande bei 1049 bp, entsprechend der Länge des *EcoRI*-Inserts mit dem *RDH5*-Gen, wurde aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde mit dem NucleoSpin Extract-Kit (siehe Kapitel 2.2.10) aus dem Agarose-Gel extrahiert.

Nach der DNA-Extraktion aus dem Agarose-Gel wurde der DNA-Gehalt gemessen (siehe Kapitel 2.2.6). Dieser betrug 10 ng/µl. 60 ng DNA, entsprechend einer Menge von 6 µl, wurden in den Ligationsansatz zur Ligation des *RDH5*-Gens mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1+ eingesetzt. Die Ligation erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.12.1 beschriebenen Protokoll. Die Vektorkarte des in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ ligierten *RDH5*-Gens ist in Abbildung 3.5 zu sehen.

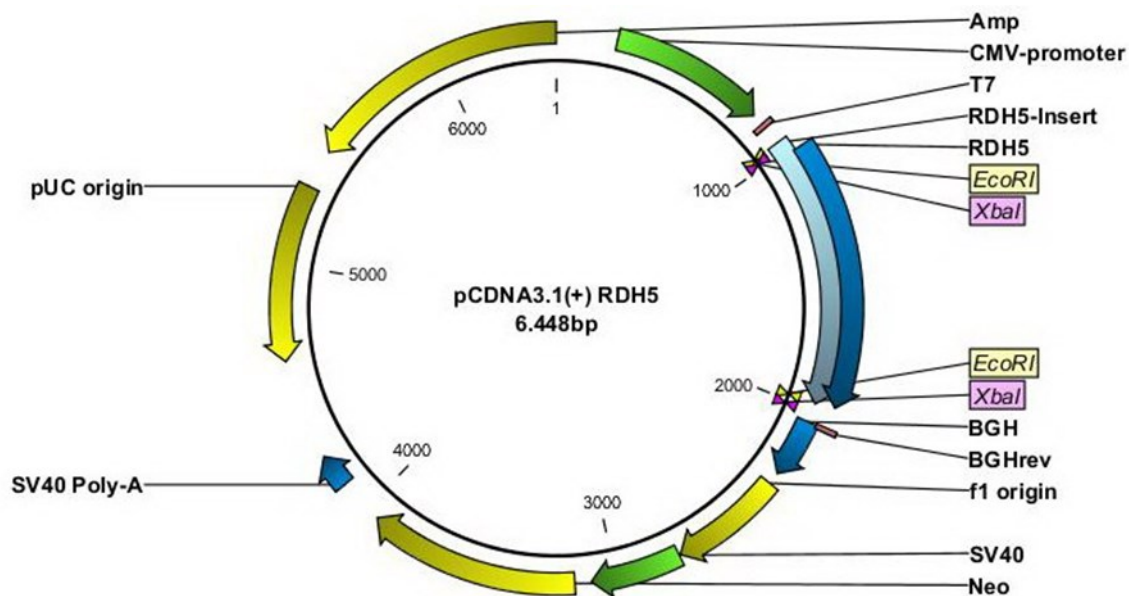


Abbildung 3.5: Vektorkarte des pcDNA3.1(+)-RDH5-Vektors. *RDH5*-Insert: *EcoRI*-Insert aus pT-*RDH5*, *RDH5*-Gen: kodierendes *RDH5*-Insert, *EcoRI*, *XbaI*: Restriktionsschnittstellen, T7, BGHrev: Sequenzierprimerbindestellen, Amp, Neo: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Neomycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, SV40poly und BGH: Polyadenylierungssignale, CMV und SV40: Promotoren.

Vor der Ligation wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1+ ebenfalls mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut, um zum einen kompatible Schnittstellen zu erhalten

und zum anderen, um den in Form eines zirkulären Plasmids vorliegenden Expressionsvektor zu linearisieren. Der Restriktionsverdau erfolgte in einem 10 µl-Ansatz nach dem in Kapitel 2.2.5 angegebenen Protokoll. In den 10 µl-Ansatz wurde 1 µl der zirkulären Plasmid-DNA pcDNA3.1+ eingesetzt. Außerdem wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1+ dephosphoryliert (siehe Kapitel 2.2.11).

Nach der Ligation erfolgte die Transformation der Plasmid-DNA in XL1-Blue *E.coli*-Bakterienzellen mittels Elektroporation (siehe Kapitel 2.2.14). Dabei betrug die Pulszeit $t = 3,9$ ms bei $U = 1858$ V. Auf der Agarplatte des Transformationsansatzes waren 6 Klone gewachsen, deren Plasmid-DNA über eine Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt wurde. Die Plasmid-DNA der 6 Klone wurde mit dem Restriktionsenzym *Xba*I verdaut. *Xba*I besitzt zwei Schnittstellen in der Plasmid-DNA. Eine davon ist innerhalb des Vektors und die andere innerhalb des Inserts lokalisiert. Nach erfolgter Ligation des Inserts *RDH5* in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ sollten durch den Restriktionsverdau demnach zwei Fragmente entstehen. Die Länge des kleineren Fragments sollte 1038 bp und die des größeren Fragments 5410 bp betragen.

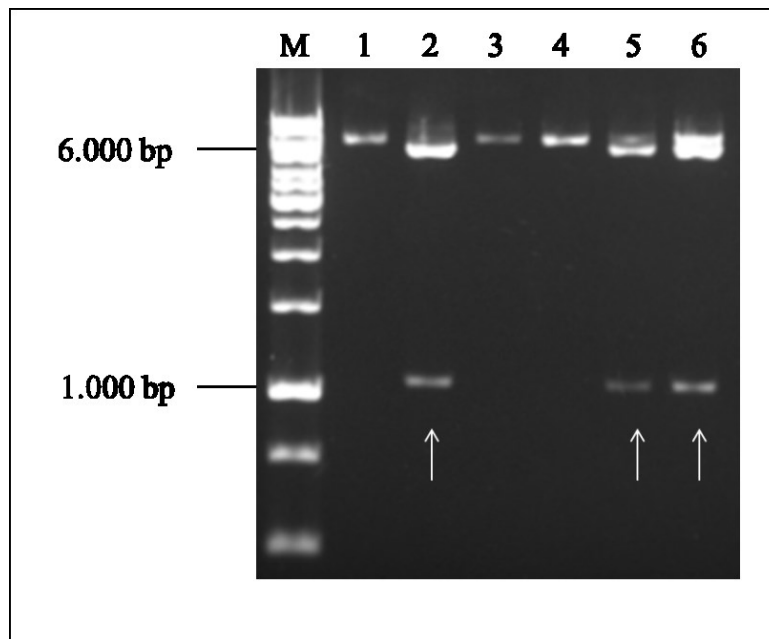


Abbildung 3.6: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5 mit dem Restriktionsenzym *Xba*I. (1 - 6) Restriktionsverdau der Klone 1 - 6. Durch den Restriktionsverdau entstanden bei den korrekt klonierten Klonen zwei Fragmente in der Größe von 5410 bp und 1038 bp. Die markierten Klone (→) wurden sequenziert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Der Restriktionsverdau erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Protokoll. Es wurde jeweils 1 µg Plasmid-DNA in den 10 µl-Restriktionsansatz eingesetzt. Da es sich um einen FastDigest handelte, wurde der Restriktionsansatz abweichend von diesem Protokoll nur 5 min bei 37 °C inkubiert.

7 µl des Restriktionsansatzes wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Abbildung 3.6 zeigt das Ergebnis des Restriktionsverdaus.

Bei den Klonen 2, 5 und 6 wurden die zwei Banden der gesuchten Größe nachgewiesen. Diese Klone wurden mit den Primern T7 (vorwärts) und BGHrev (rückwärts) sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7). Die Klone 2 und 6 enthielten die gewünschte Plasmid-DNA. Von diesen wurde ein Glyzerinstock (siehe Kapitel 2.2.8) angefertigt. Außerdem wurde die Plasmid-DNA der Klone über eine Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.15) isoliert und aufgereinigt. Danach wurde der DNA-Gehalt im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt. Dieser betrug 580 ng/µl.

3.2 Klonierung des *RLBP1*-Gens

3.2.1 Amplifikation des *RLBP1*-Gens

Zunächst wurde eine Two step-Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion nach dem in Kapitel 2.2.1 beschriebenen Protokoll durchgeführt.

Als Ausgangsmaterial lag die mRNA einer humanen Gewebeprobe aus dem retinalen Pigmentepithel vor. Die Konzentration der mRNA betrug 147,9 ng/µl. Davon wurden 1,5 µl in die Reverse Transkriptions-Reaktion (siehe Kapitel 2.2.1.1) eingesetzt. Weiterhin wurden 2 µl des genspezifischen Primers RLBP1-3U, der abweichend von diesem Protokoll zu 1 pmol/µl konzentriert war, eingesetzt.

Die durch die Reverse Transkription gewonnene cDNA wurde in den Reaktionsansatz der Polymerase-Kettenreaktion (siehe Kapitel 2.2.1.2) eingesetzt. Abweichend von dem Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion wurden 5 µl der cDNA und jeweils 2,5 µl der 1 pmol/µl genspezifischen Primer RLBP1-3U und RLBP1-5U verwendet.

5 µl des PCR-Produkts wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Das Ergebnis der PCR ist in Abbildung 3.7 zu sehen. Die Länge des *RLBP1*-Gens beträgt 1025 bp.

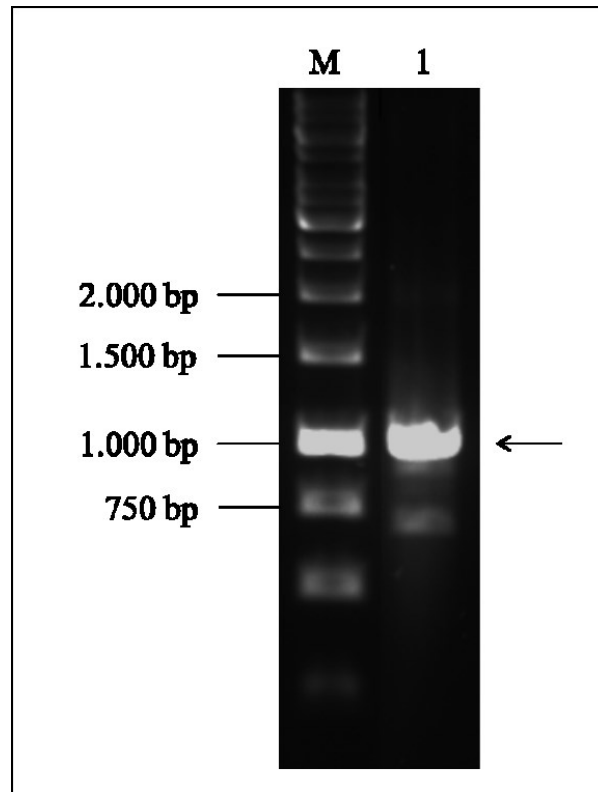


Abbildung 3.7: Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes *RLBPI*. (1) *RLBPI*-RT-PCR-Produkt. Das *RLBPI*-Gen besitzt eine Größe von 1025 bp (→). Durch die Agarose-Gelelektrophorese konnte die korrekte PCR-Amplifikation des *RLBPI*-Gens gezeigt werden. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

3.2.2 Klonierung des *RLBPI*-Gens in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor

Als Nächstes erfolgte die TA-Klonierung des *RLBPI*-Gens in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor nach dem in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Protokoll. Dazu wurden 2 µl des PCR-Produkts in den Reaktionsansatz zur TA-Klonierung eingesetzt. Die Vektorkarte des in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor klonierten *RLBPI*-Gens ist in Abbildung 3.8 dargestellt.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA mittels Elektroporation in *E.coli*-Bakterienzellen transformiert (siehe Kapitel 2.2.3.2). Dabei betrug die Pulszeit $t = 3,4$ ms bei einer Spannung von $U = 1843$ V. Die transformierten Bakterienzellen wurden, nachdem sie 1 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert worden waren, auf ampicillinhaltigen, 37 °C warmen Agarplatten ausgestrichen. Nach einer Inkubationszeit von 12 h im Brutschrank bei 37 °C waren 12 Klone gewachsen. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde mittels Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt.

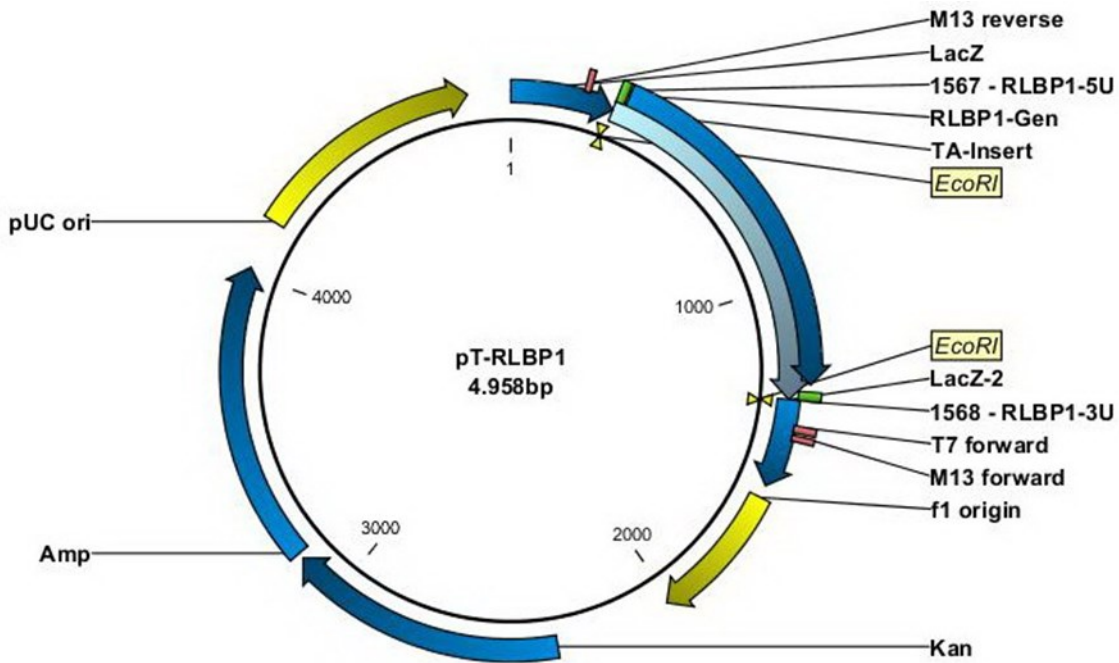


Abbildung 3.8: Vektorkarte des pT-RLBP1-Vektors. TA-Insert: TA-kloniertes *RLBP1*-PCR-Produkt, *RLBP1*-Gen: kodierendes Insert, *EcoRI*: Restriktionsschnittstelle, T7 forward, M13 (reverse und forward): Sequenzierprimerbindestellen, LacZ(-2): LacZ-Gen zur Identifikation positiver Klone (hier geteilt durch das Insert), Amp, Kan: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Kanamycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, 1567-RLBP1-5U und 1568-RLBP1-3U: Primer für das Insert.

Als Nächstes wurde ein Restriktionsverdau der Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* nach dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Protokoll durchgeführt, um die Ligation des *RLBP1*-Gens in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor zu überprüfen.

Es wurden 4 µl der Plasmid-DNA pT-RLBP1 in den 10 µl-Ansatz eingesetzt. Dieser wurde 1 h inkubiert. Der Restriktionsverdau wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.2). Das Ergebnis ist in Abbildung 3.9 dargestellt.

Bei den gesuchten Klonen waren zwei Fragmente entstanden, eines in der Größe des pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektors von 3,932 kb und eines in der Größe des *RLBP1*-Inserts von 1025 bp. Das *RLBP1*-Insert lag nach dem Restriktionsverdau linear, mit *EcoRI*-Schnittstellen an beiden Enden, vor.

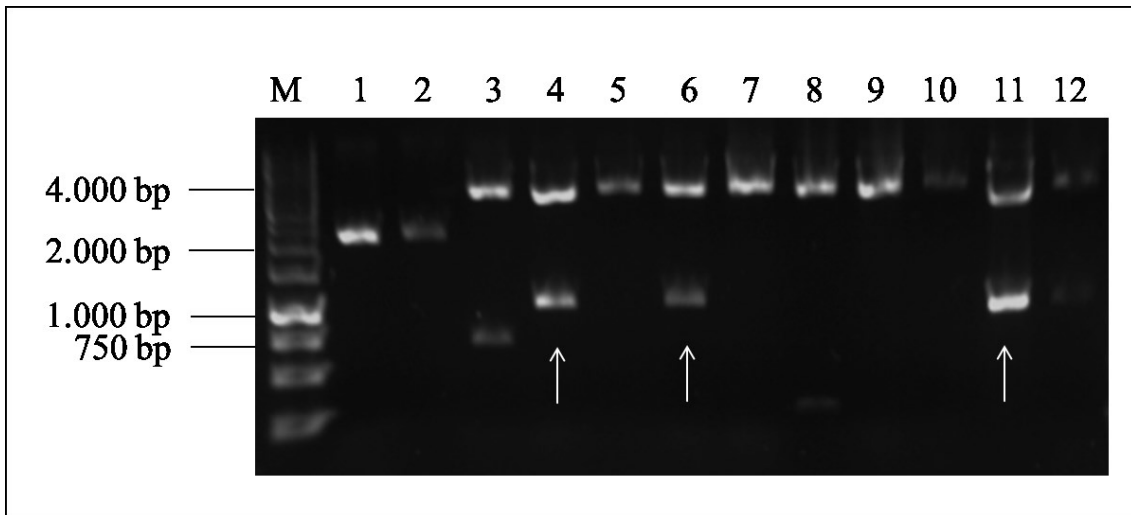


Abbildung 3.9: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT-RLBP1 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. (1 - 12) Restriktionsverdau der Klone 1 - 12. Durch den Restriktionsverdau entstanden bei den korrekt klonierten Klonen zwei Fragmente in der Größe von 3932 bp und 1025 bp. Die markierten Klone (→) wurden sequenziert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Die Klone 4, 6 und 11 wurden mit den Primern M13 forward und M13 reverse sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7). Die Klone 4 und 6 enthielten das korrekte *RLBP1*-Insert. Von diesen Klonen wurde ein Glyzerinstock nach dem Protokoll in Kapitel 2.2.8 angelegt.

3.2.3 Klonierung des *RLBP1*-Gens in den Expressionsvektor pcDNA3.1+

Die Plasmid-DNA pT-RLBP1-6 wurde über eine Midi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.9) isoliert und aufgereinigt. Im Anschluss daran wurde der DNA-Gehalt im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt. Er betrug 456 ng/ μ l.

Als Nächstes wurde ein Restriktionsverdau nach dem in Kapitel 2.2.5 angegebenen Protokoll mit dem 10 U/ μ l Restriktionsenzym *EcoRI* durchgeführt. Es wurde ein 20 μ l-Reaktionsansatz hergestellt.

Der komplette Restriktionsansatz wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.10 dargestellt. Die Bande des *RLBP1*-Inserts, entsprechend einer Länge von 1025 bp, wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Sie wog 105 mg.

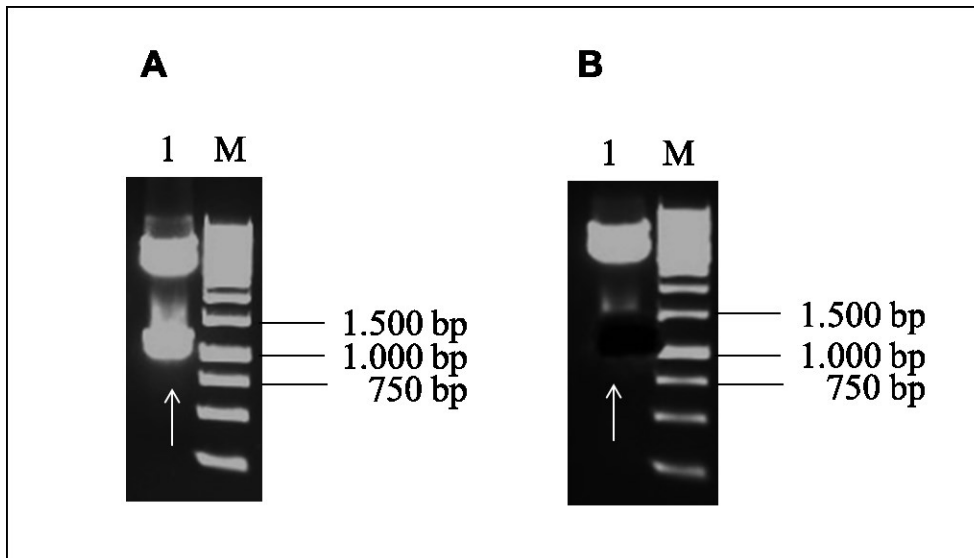


Abbildung 3.10: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT-RLBP1-6. (A) (1) Restriktionsverdau der Vektor-DNA pT-RLBP1-6 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. Durch den Restriktionsverdau entstanden zwei Fragmente. Das größere Fragment entsprach der Vektor-DNA. Das kleinere, 1025 bp-große Fragment (→) entsprach dem *RLBP1*-Insert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker. (B) (1) Das *RLBP1*-Insert (→) wurde aus dem Agarose-Gel extrahiert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Die DNA wurde mit dem NucleoSpin Extract-Kit (siehe Kapitel 2.2.10) isoliert und aufgereinigt. Danach wurde der DNA-Gehalt im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt. Dieser betrug 13 ng/μl. Davon wurden 5 μl in den Ligationsansatz mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1+ eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.12.1).

Der Expressionsvektor pcDNA3.1+ war zuvor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* verdaut worden, um den Vektor zu linearisieren und zwei entsprechende Schnittstellen für das Insert *RLBP1* herzustellen. Der Restriktionsverdau erfolgte in einem 10 μl-Ansatz nach dem in Kapitel 2.2.5 angegebenen Protokoll. In den 10 μl-Ansatz wurde 1 μl der zirkulären Plasmid-DNA pcDNA3.1+ eingesetzt.

Um eine Selbstligation zu verhindern, wurde der Expressionsvektor pcDNA3.1+ dephosphoryliert (siehe Kapitel 2.2.11).

Die Vektorkarte des in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ klonierten *RLBP1*-Gens ist in Abbildung 3.11 dargestellt.

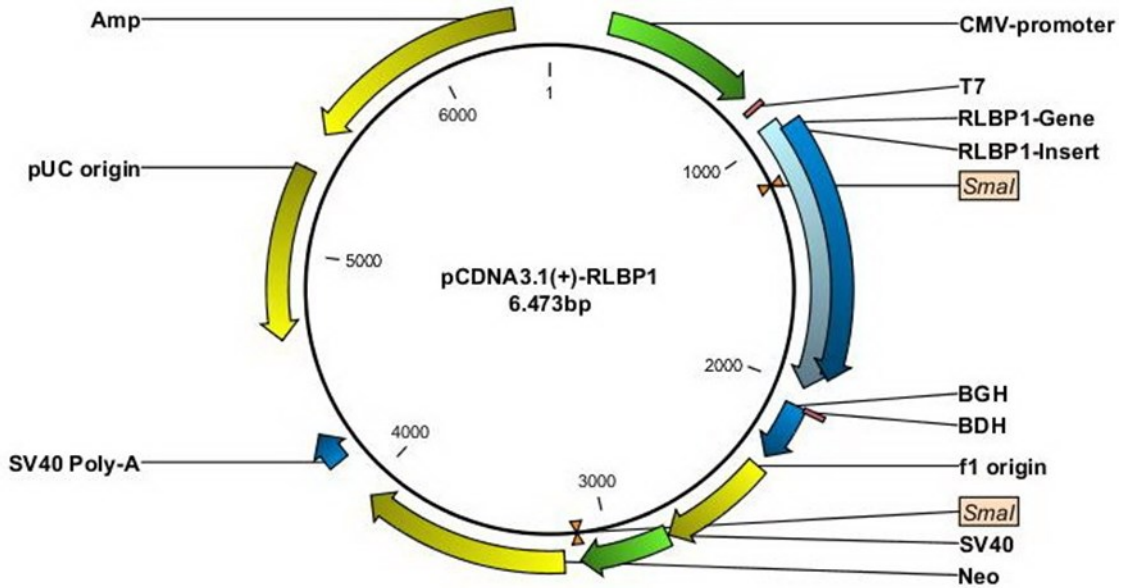


Abbildung 3.11: Vektorkarte des pCDNA3.1+RLBP1-Vektors. *RLBP1*-Insert: *RLBP1*-Insert aus pT-*RLBP1*-6 mit flankierenden *EcoRI*-Restriktionsschnittstellen, *RLBP1*-Gen: kodierendes Insert, *SmaI*: Restriktionsschnittstelle, T7, BGHrev: Sequenzierprimerbindestellen, Amp, Neo: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Neomycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, SV40poly und BGH: Polyadenylierungssignale, CMV und SV40: Promotoren.

Nach der Ligation wurde die Plasmid-DNA durch Elektroporation in XL1-Blue *E.coli*-Bakterienzellen transformiert (siehe Kapitel 2.2.14). Dabei betrug die Pulszeit $t = 3,6$ ms bei einer Spannung von $U = 1843$ V. Nach Abzentrifugieren des Transformationsansatzes wurden 800 μl des Überstands verworfen und abweichend vom Protokoll 100 μl des verbliebenen Zentrifugats auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausplattiert. Nach 12 h Inkubationszeit waren 7 Klone gewachsen. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde mittels Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach dem in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Protokoll für einen 10 μl -Reaktionsansatz mit dem Restriktionsenzym *SmaI* verdaut. *SmaI* besitzt eine Schnittstelle innerhalb des Inserts und eine außerhalb des Inserts. Daher sollten erwartungsgemäß 2 Fragmente entstehen. Das größere Fragment sollte eine Länge von 4518 bp, das kleinere Fragment eine Länge von 1955 bp aufweisen. Wie in Abbildung 3.12 ersichtlich, zeigte Klon 7 zwei Fragmente, die ungefähr den gesuchten Größenordnungen entsprachen.

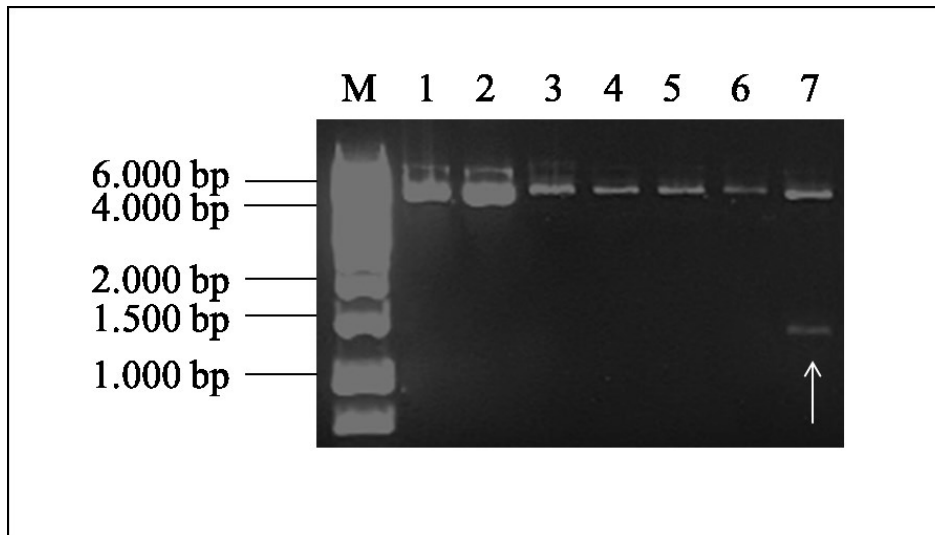


Abbildung 3.12: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdau der Vektor-DNA pcDNA3.1+RLBP1 mit dem Restriktionsenzym *Sma*I. (1 - 7) Restriktionsverdau der Klone 1 - 7. Durch den Restriktionsverdau entstanden bei den Klonen mit korrekt inseriertem Insert zwei Fragmente in der Größe von 4518 bp und 1955 bp. Der markierte Klon (→) wurde sequenziert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Es wurden jeweils 300 ng Plasmid-DNA in den 10 µl-Restriktionsansatz eingesetzt. Da es sich um einen FastDigest handelte, wurde der Reaktionsansatz abweichend von dem Protokoll in Kapitel 2.2.5 nur 20 min bei 37 °C inkubiert. 5 µl des Restriktionsansatzes wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen.

Die Plasmid-DNA des Klons 7 wurde mit den Primern M13 forward und M13 reverse sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7), um die Sequenztreue zu bestätigen. Außerdem wurde ein Glyzerinstock (siehe Kapitel 2.2.8) des Klons angefertigt. Aufgrund der beiden identischen *Eco*RI-Schnittstellen gab es zwei verschiedene Orientierungsmöglichkeiten, in denen das Gen hätte einkloniert werden können. Die Sequenzierung zeigte, dass das *RLBP1*-Gen nicht in der korrekten Orientierung im Vektor vorlag.

Um die korrekte Orientierung des *RLBP1*-Gens im Expressionsvektor zu erhalten, wurde die Plasmid-DNA des Klons 7 erneut mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI nach dem Protokoll für einen 10 µl-Reaktionsansatz in Kapitel 2.2.5 verdaut. Dazu wurden abweichend von diesem Protokoll 4,2 µg Plasmid-DNA in den 10 µl-Ansatz des Restriktionsverdau eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend 10 min bei 65 °C im Heizblock inaktiviert.

Danach erfolgte die Religation (siehe Kapitel 2.2.12.2). Dazu wurde zu dem Reaktionsansatz des Restriktionsverdau T4 DNA Ligase, T4 DNA Ligase Puffer und Aqua bidest. hinzugefügt.

Der Reaktionsansatz wurde anschließend in XL1-Blue *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.14). Dabei wurden abweichend vom Protokoll 3 µl des Religationsansatzes zu 100 µl XL1-Blue *E.coli* hinzugefügt. Die Transformation geschah durch Elektroporation. Die Pulszeit betrug $t = 1,3$ ms bei einer Spannung von $U = 1558$ V. 200 µl des Transformationsansatzes wurden ohne vorhergehende Zentrifugation auf einer 37 °C warmen, ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen.

Nach 12 h Inkubationszeit waren 11 Klone gewachsen. Die Plasmid-DNA dieser Klone wurde mittels Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt.

Die Plasmid-DNA wurde erneut mit dem Restriktionsenzym *SmaI* verdaut. In den 10 µl-Ansatz des Restriktionsverdau (siehe Kapitel 2.2.5) wurden abweichend von diesem Protokoll 1,5 µg der Plasmid-DNA eingesetzt. Es wurde der 10×Puffer Tango verwendet. Die Reaktionsansätze wurden 1 h bei 30 °C inkubiert.

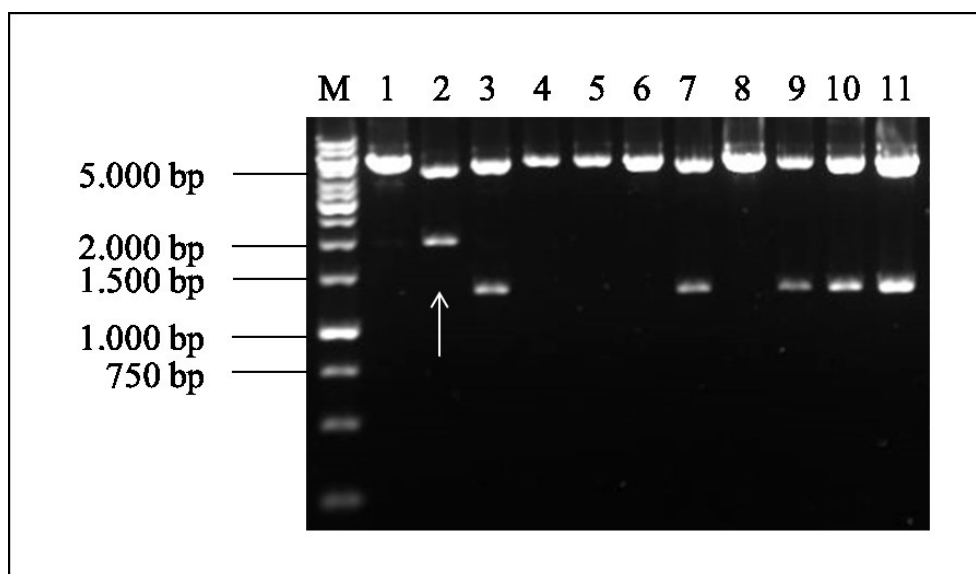


Abbildung 3.13: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdau der Vektor-DNA pcDNA3.1+RLBP1 mit dem Restriktionsenzym *SmaI*. (1 - 11) Restriktionsverdau der Klone 1 - 11. Durch den Restriktionsverdau entstanden bei dem korrekt klonierten Klon zwei Fragmente in der Größe von 4518 bp und 1955 bp. Der markierte Klon (→) wurde sequenziert. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Danach wurden 5 µl des Restriktionsverdau auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Das Ergebnis des Restriktionsverdau ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Bei nicht korrekter Orientierung des *RLBPI*-Gens im Vektor wären Fragmentgrößen von 1340 bp und 5133 bp zu erwarten gewesen, während sie bei richtiger Orientierung im Vektor 4518 bp und 1955 bp betragen sollten. Bei Klon 2 ließen sich zwei Banden in den gewünschten Größen von 4518 bp und 1955 bp darstellen.

Der Klon 2 wurde mit den Primern T7 forward und BGH reverse sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7) und besaß die richtige Orientierung im Expressionsvektor und die korrekte Sequenz. Davon wurde ein Glyzerinstock (siehe Kapitel 2.2.8) angelegt.

3.3 Einfügen der Punktmutation p.G238W in das *RDH5*-Gen

3.3.1 Mutagenese-PCR

Die Mutagenese-PCR erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.16 beschriebenen Protokoll. Die Punktmutation p.G238W wurde mit dem spezifischen Primerpaar RDH5G238Wa und RDH5G238Wb in das *RDH5*-Gen eingefügt.

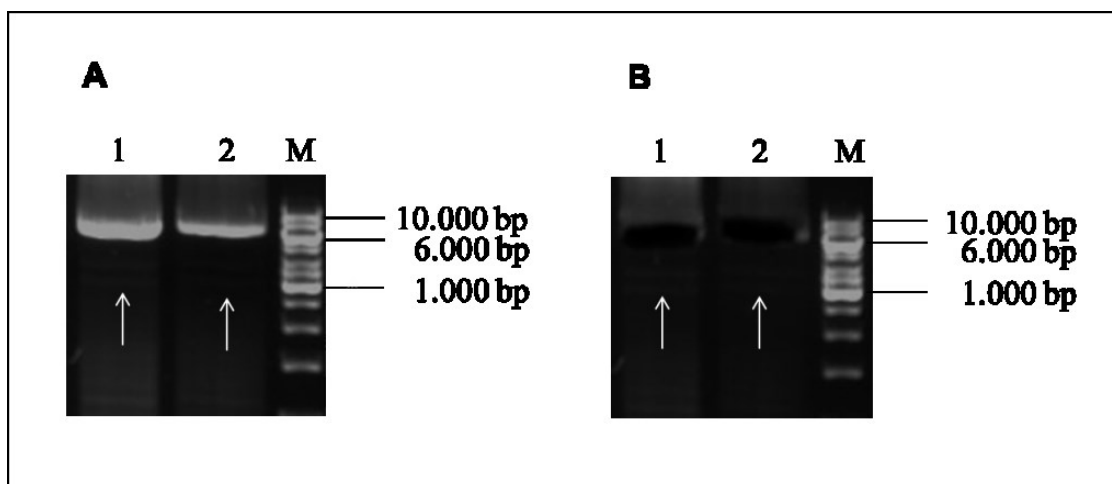


Abbildung 3.14: Agarose-Gelelektrophorese des Mutagenese-PCR-Produkts der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W. (A) (1 und 2) Das Mutagenese-PCR-Produkt der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W (→) zeigt die erwartete Größe von 6448 bp. (M) 1 kb DNA-Größenmarker. (B) (1 und 2) Das Mutagenese-PCR-Produkt wurde aus dem Agarose-Gel extrahiert (→). (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Dazu wurde eine Mutagenese-PCR mit der mittels Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.15) aufgereinigten Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5 durchgeführt. Davon wurden 290 ng in den Reaktionsansatz eingesetzt. Nach der Mutagenese-PCR lag die mutierte Plasmid-DNA linear mit zwei stumpfen 5'-phosphorylierten Enden vor.

Das Mutagenese-PCR-Produkt wurde auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Die 50 µl wurden auf zwei Geltaschen verteilt. Die Laufzeit betrug 60 min bei einer Spannung von 100 V. Das Ergebnis der Mutagenese-PCR ist in der Abbildung 3.14 dargestellt. Die erwartete Größe der linearen Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W beträgt 6448 bp.

Die Banden, entsprechend der Größe des Plasmids von 6448 bp, wurden aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten und abgewogen. Das Gewicht betrug für beide Banden zusammen 120 mg. Die Plasmid-DNA wurde im Folgenden über das NucleoSpin Extract-Kit (siehe Kapitel 2.2.10) aus dem Agarose-Gel extrahiert. Danach wurde der DNA-Gehalt im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) gemessen. Er betrug 16 ng/µl dsDNA.

3.3.2 Ligation stumpfer Enden

Anschließend wurde eine Ligation der stumpfen 5'-phosphorylierten Enden durchgeführt, um die lineare Plasmid-DNA wieder zu einer zirkulären Plasmid-DNA zu verschließen. Die Ligation der stumpfen Enden erfolgte nach dem Protokoll in Kapitel 2.2.12.3. In den Ligationsansatz wurden 128 ng, entsprechend einer Menge von 8 µl, der aufgereinigten Plasmid-DNA eingesetzt. In der Abbildung 3.15 ist die Vektorkarte der ligierten zirkulären Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W dargestellt.

Die zirkuläre Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W wurde als Nächstes in XL1-Blue *E.coli*-Bakterienzellen transformiert (siehe Kapitel 2.2.14). Dazu wurden abweichend von diesem Protokoll 3 µl des Ligationsansatzes verwendet. Die Pulszeit der Elektroporation betrug $t = 2,9$ ms bei einer Spannung von $U = 1796$ V. 200 µl des Transformationsansatzes wurden ohne vorheriges Zentrifugieren auf einer auf 37 °C vorgewärmten Agarplatte, welche mit dem Antibiotikum Ampicillin versetzt war, ausgestrichen. Der verbliebene Teil des Transformationsansatzes wurde 5 min bei $9167 \times g$ abzentrifugiert. 600 µl des Überstandes wurden abgenommen und die restlichen 200 µl der Transformation wurden auf einer weiteren ampicillinhaltigen, 37 °C warmen Agarplatte ausgestrichen.

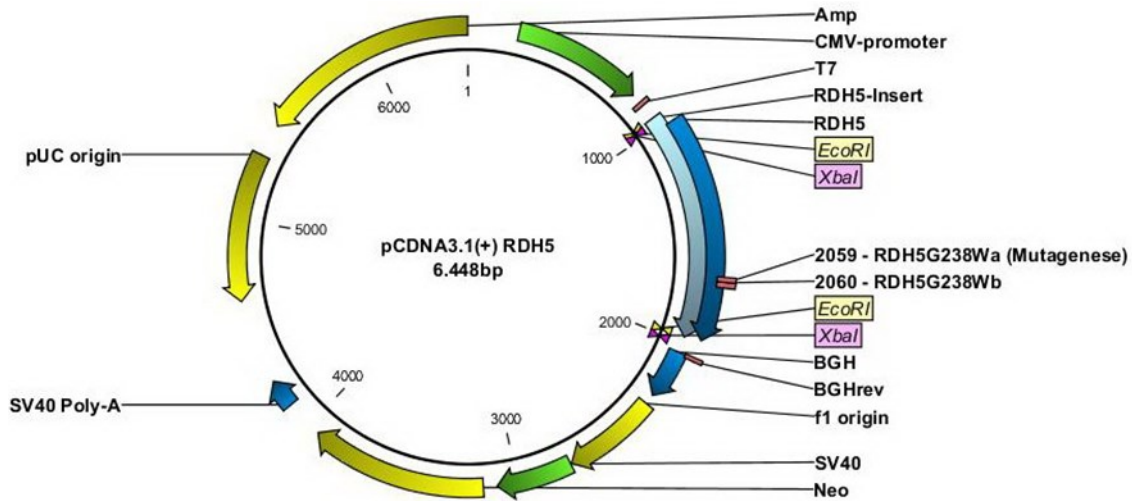


Abbildung 3.15: Vektorkarte des pcDNA3.1+RDH5-G238W-Vektors. *RDH5*-Insert: subkloniertes *RDH5*-Insert, *RDH5*-Gen: kodierendes Insert, *Xba*I, *Eco*RI: Restriktionsschnittstellen, T7, BGHrev: Sequenzierprimerbindestellen, Amp, Neo: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Neomycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, SV40poly und BGH: Polyadenylierungssignale, CMV und SV40: Promotoren, RDH5G238Wa und RDH5G238Wb: Mutageneseprimer.

Nach 12 h Inkubationszeit im Brutschrank waren auf beiden Agarplatten insgesamt 10 Klone gewachsen. Auf der Agarplatte, auf der der nicht abzentrifugierte Transformationsansatz ausgestrichen worden war, wuchsen die Klone 1 bis 6. Auf der Agarplatte mit dem abzentrifugierten Transformationsansatz wuchsen die Klone 7 bis 10. Die Klone wurden mittels Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt.

Die Plasmid-DNA der Klone 4 bis 8 wurde mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI sowie in einem weiteren, separaten Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *Xba*I verdaut (siehe Kapitel 2.2.5). In den 10 µl-Ansatz des Restriktionsverdaus wurden jeweils 3 µl der aufgereinigten Plasmid-DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden auf ein 1%iges Agarose-Gel (siehe Kapitel 2.2.2) aufgetragen. Die Laufzeit betrug 60 min bei einer Spannung von 100 V.

Erwartungsgemäß entstanden durch den Restriktionsverdau mit *Eco*RI zwei Fragmente in der Größe von 1020 bp und 5428 bp. Der Restriktionsverdau mit *Xba*I erzeugte wie erwartet zwei Fragmente in der Größe von 1038 bp und 5410 bp.

Das Ergebnis des Restriktionsverdaus der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W ist in der Abbildung 3.16 zu sehen.

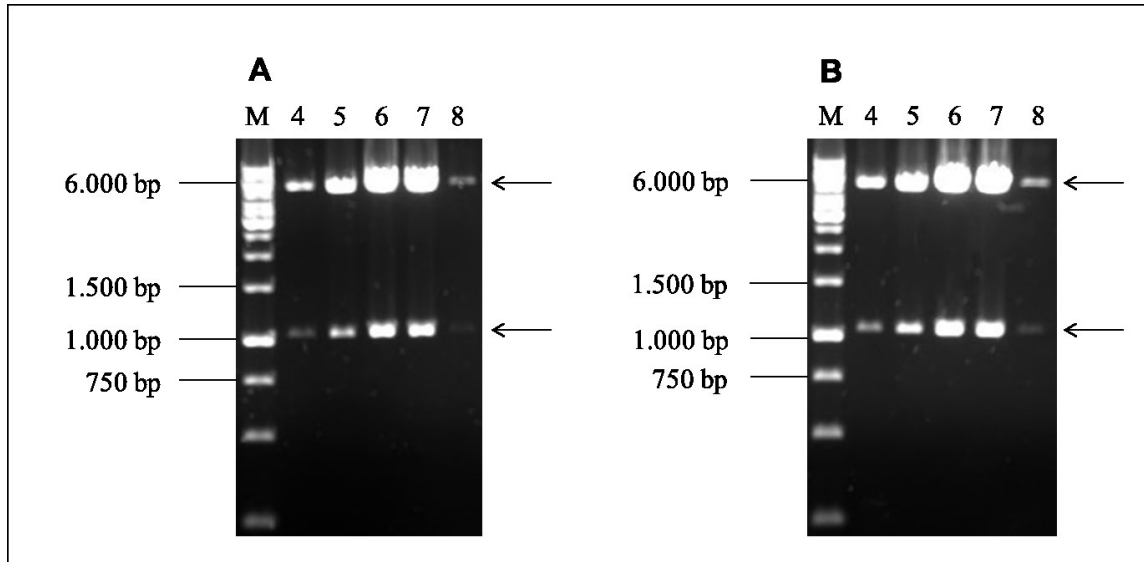


Abbildung 3.16: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *XbaI*. (A) (4 - 8) Restriktionsverdau der Klone 4 - 8 mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. Die korrekten Fragmente (→) besitzen eine Größe von 1020 bp und 5428 bp. (M) 1 kb DNA-Größenmarker. (B) (4 - 8) Restriktionsverdau der Klone 4 - 8 mit der Restriktionsendonuklease *XbaI*. Die korrekten Fragmente (→) besitzen eine Größe von 1038 bp und 5410 bp. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Damit konnte allerdings nicht sichergestellt werden, dass in das *RDH5*-Gen auch tatsächlich die Punktmutation p.G238W eingefügt worden war, sodass eine Sequenzierung unbedingt notwendig war, um zwischen dem Wildtyp und dem mutierten Gen differenzieren zu können.

Laut Sequenzierung mit den Primern T7 forward und BGH reverse (siehe Kapitel 2.2.7) lag in den Klonen 4 bis 8 die Wildtyp-DNA vor.

Daraufhin wurden die übrigen 5 Klone ohne vorherige Durchführung eines Restriktionsverdaus mit denselben Primern sequenziert. Davon enthielt Klon 1 die gesuchte Mutation. Von diesem Klon wurde ein Glycerinstock (siehe Kapitel 2.2.8) angelegt.

3.4 Einfügen der Punktmutation p.A294P in das *RDH5*-Gen

3.4.1 Mutagenese-PCR

Zum Einfügen der Punktmutation p.A294P in das *RDH5*-Gen wurde eine Mutagenese-Polymerase-Kettenreaktion nach dem in Kapitel 2.2.16 beschriebenen Protokoll mit der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5, die mittels Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.15) aufgereinigt worden war, und den Primern RDH5-294Pa und RDH5-294Pb durchgeführt.

Die Plasmid-DNA wurde 1:100 verdünnt. In den Reaktionsansatz wurden 11,6 ng Plasmid-DNA eingesetzt. 5 µl des Mutagenese-PCR-Produkts wurden mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.2). Die Laufzeit des Agarose-Gels betrug 75 min bei 100 V.

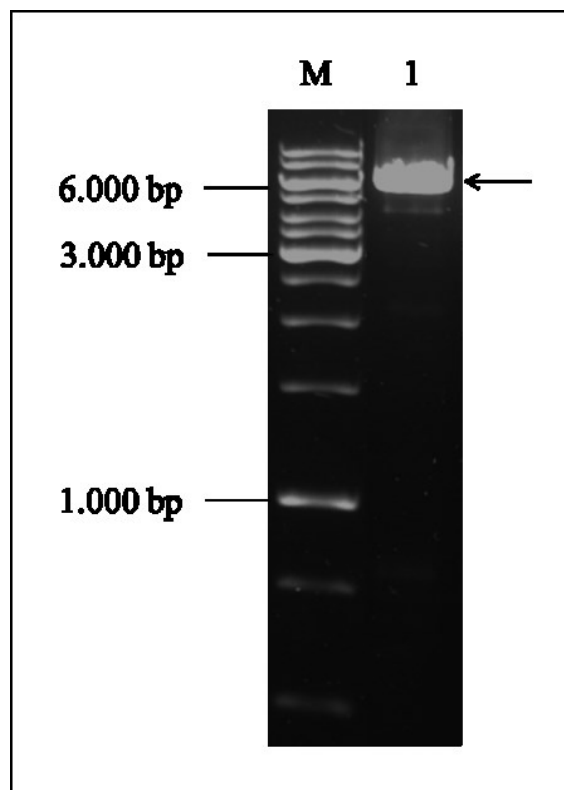


Abbildung 3.17: Agarose-Gelelektrophorese des Mutagenese-PCR-Produkts der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P. (1) Das Mutagenese-PCR-Produkt (→) zeigt eine Größe von 6448 bp, entsprechend der Größe der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Durch die Mutagenese-PCR wurde die Plasmid-DNA linearisiert und die 5'-Enden wurden phosphoryliert. Das entstandene PCR-Produkt sollte eine Größe von 6448 bp, entsprechend der Größe der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P, besitzen. In Abbildung 3.17 ist eine Bande in der gesuchten Größenordnung erkennbar.

3.4.2 Ligation stumpfer Enden

Es wurde eine Ligation der stumpfen 5'-phosphorylierten Enden des PCR-Produkts durchgeführt, um die DNA erneut zu einem Vektor zu verschließen. Die Ligation der stumpfen Enden erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.12.3 beschriebenen Protokoll. Dazu wurden 5 µl des PCR-Produkts in den Ligationsansatz eingesetzt. In der Abbildung 3.18 ist die Vektorkarte der ligierten zirkulären Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P dargestellt.

Das Ligationsprodukt wurde mittels Elektroporation in XL1-Blue *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.14). Es wurden abweichend von diesem Protokoll 1,5 µl des Ligationsansatzes zu 50 µl XL1-Blue *E.coli* hinzugefügt. Bei der Elektrotransformation betrug die Pulszeit $t = 3,5$ ms bei $U = 1843$ V.

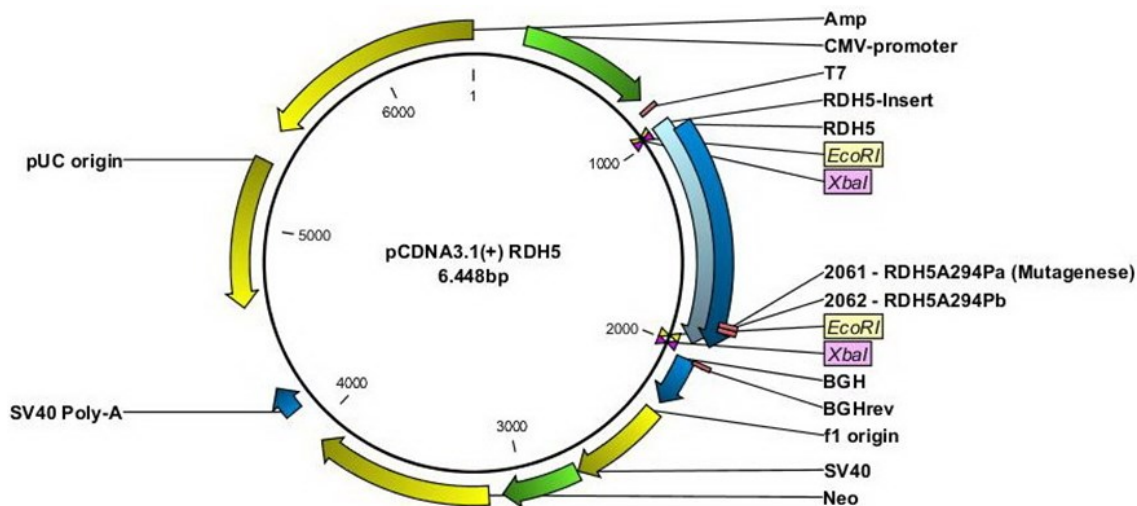


Abbildung 3.18: Vektorkarte des pcDNA3.1+RDH5-A294P-Vektors. *RDH5*-Insert: subkloniertes *RDH5*-Insert, *RDH5*-Gen: kodierendes Insert, *Xba*I, *Eco*RI: Restriktionsschnittstellen, T7, BGHrev: Sequenzierprimerbindestellen, Amp, Neo: Antibiotikaresistenzgene (Ampicillin, Neomycin), f1 und pUC origin: Replikationsstartpunkte, SV40poly und BGH: Polyadenylierungssignale, CMV und SV40: Promotoren, RDH5A294Pa und RDH5A294Pb: Mutageneseprimer.

Nach 1 h Inkubationszeit wurde die Lösung abzentrifugiert und 900 µl des Überstandes wurden verworfen, während die verbliebenen 100 µl auf einer ampicillinhaltigen Agarplatte ausgestrichen wurden. Es waren mehrere Klone gewachsen. 10 Klone davon wurden über eine Mini-Präparation (siehe Kapitel 2.2.4) isoliert und aufgereinigt.

Die Plasmid-DNA wurde einem Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* zugeführt. *EcoRI* spaltete die Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P in zwei Fragmente der Größe 1020 bp und 5428 bp. Es wurden 3 µl der Plasmid-DNA in den 10 µl-Ansatz eingesetzt (siehe Kapitel 2.2.5). 5 µl des Restriktionsansatzes wurden mit 3 µl DNA-Ladepuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.2). Dieses lief 45 min bei 100 V.

Das Ergebnis ist in der Abbildung 3.19 dargestellt. Obwohl bei fast allen Klonen die zu erwartenden Fragmente entstanden waren, wurde die Plasmid-DNA der 10 Klone mit den Primern T7 forward und BGH reverse sequenziert (siehe Kapitel 2.2.7), da der Restriktionsverdau nicht zur Bestätigung des Vorhandenseins der Mutation p.A294P im *RDH5*-Gen dienen konnte, sondern nur zum Nachweis des Inserts *RDH5*.

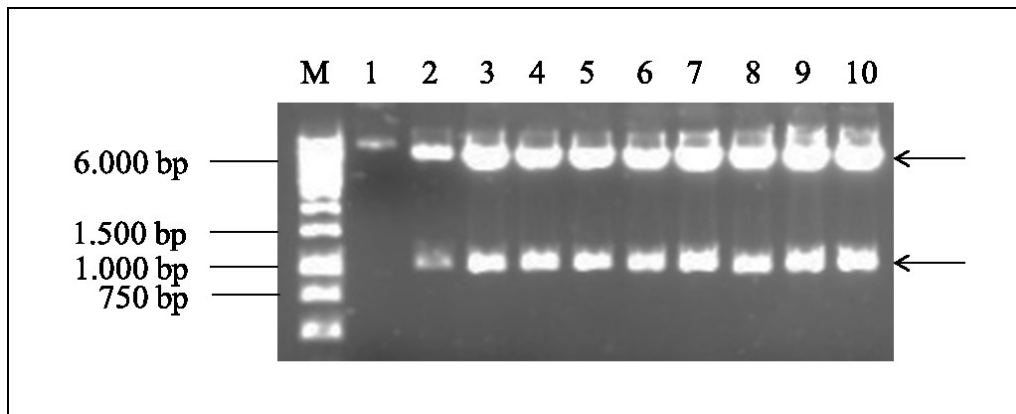


Abbildung 3.19: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P mit dem Restriktionsenzym *EcoRI*. (1 - 10) Restriktionsverdau der Klone 1 - 10. Durch *EcoRI* wurde die Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P in zwei Fragmente der Größe 1020 bp und 5428 bp (→) gespalten. (M) 1 kb DNA-Größenmarker.

Die Sequenzierung ergab, dass bei den Klonen 1 und 8 die Mutation p.A294P in homozygoter Form vorlag, während es sich bei Klon 5 um eine Doppeltransformation und bei den übrigen Klonen um die Wildtyp-DNA handelte.

Von Klon 1 und 8 wurde ein Glyzerinstock nach dem in Kapitel 2.2.8 angegebenen Protokoll angefertigt.

3.5 Darstellung der Expression des *RLBP1*-Gens im Western-Blot

Die Plasmid-DNA pcDNA3.1+RLBP1 wurde aus dem Glyzerinstock des Klons 2 mittels Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.15) isoliert und aufgereinigt. Anschließend wurde der DNA-Gehalt mithilfe des Photometers (siehe Kapitel 2.2.6) gemessen. Dieser betrug 1 µg/µl. Die Plasmid-DNA wurde sowohl in HEK293T- als auch in HeLa-Zellen transfiziert. Die HEK293T- und HeLa-Zellen wurden nach dem in Kapitel 2.2.17 beschriebenen Protokoll kultiviert und nach dem Protokoll in Kapitel 2.2.17.1 kryokonserviert. Die Transfektion erfolgte mittels Lipofektion nach dem in Kapitel 2.2.18.1 beschriebenen Protokoll. In den Transfektionsansatz zur Lipofektion wurden 4 µl der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RLBP1 eingesetzt. Nach 24 h Inkubationszeit und erfolgter Transfektion wurden die Proteine mittels M-PER-Proteinextraktionsreagens-Kit (siehe Kapitel 2.2.19) isoliert. Der Protein-Gehalt wurde mittels Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit gemessen (siehe Kapitel 2.2.20). Er betrug für das Extrakt aus HEK293T-Zellen 1914 µg/ml. Der Protein-Gehalt für das Extrakt aus HeLa-Zellen betrug 697 µg/ml. Der Protein-Gehalt des Extraktes aus nicht transfizierten HEK293T-Zellen, die als Negativ-Kontrolle dienten, betrug 1917 µg/ml.

Zunächst wurde eine denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.21). Die Proteinproben wurden mit dem reduzierenden 5×SDS-PAGE-(Lämmli-)Probenpuffer geladen. Es wurden 12 µg des jeweiligen Proteins in den Reaktionsansatz eingesetzt. Da 12 µg einem unterschiedlichen Volumen in µl entsprach, wurden die Ansätze mit 1×PBS auf 12 µg/20 µl eingestellt. Anschließend wurden 5 µl des 5×SDS-PAGE-(Lämmli-)Probenpuffers hinzugefügt.

Die Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot (siehe Kapitel 2.2.22) aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden nach dem Western-Blot mittels Immunfärbung detektiert. Als primärer Antikörper wurde Anti-RLBP1, der aus der Maus stammte, eingesetzt (siehe Tabelle 2.8). Der Antikörper wurde 1:10.000 in Blockierpuffer verdünnt. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-mouse-IgG-Peroxidase-conjugate (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Der Antikörper wurde ebenfalls 1:10.000 in

Blockierpuffer verdünnt. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 3.20 dargestellt. RLBP1 hat eine berechnete Größe von 36 kDa. RLBP1 wurde in HEK293T- und auch in HeLa-Zellextrakt nachgewiesen.

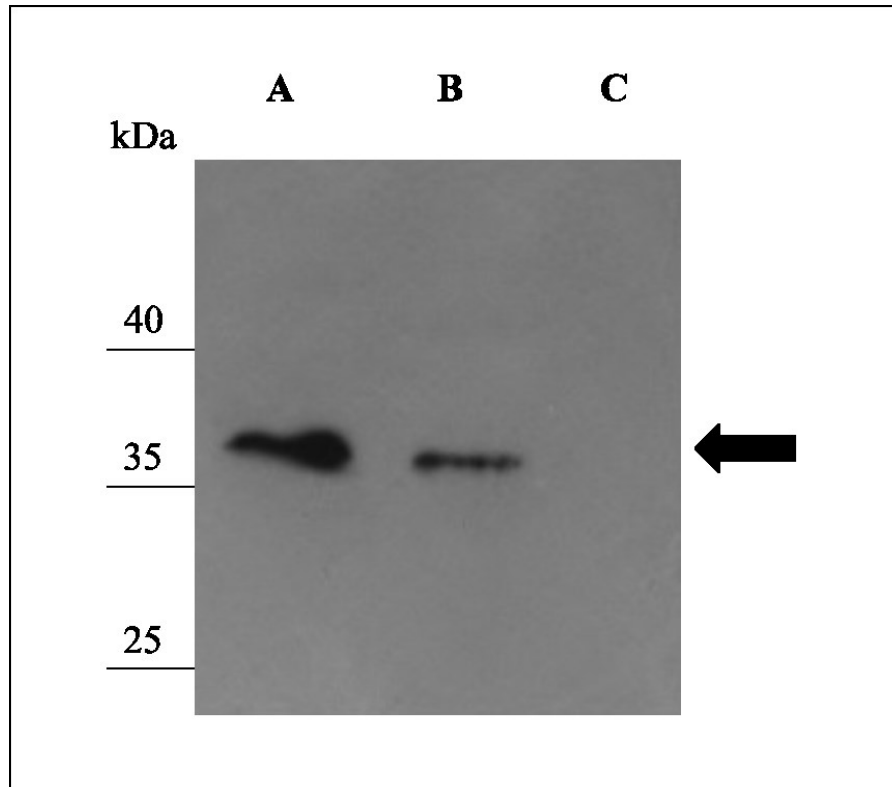


Abbildung 3.20: Immunfärbung des Western-Blots zur Detektion von RLBP1. (A) Darstellung der Expression des 36 kDa RLBP1 (→) in HEK293T-Zellen. (B) Darstellung der Expression des 36 kDa RLBP1 (→) in HeLa-Zellen. (C) Negativ-Kontrolle: Als Negativ-Kontrolle diente Proteinextrakt aus nicht transfizierten HEK293T-Zellen. In diesen konnte kein RLBP1 (→) nachgewiesen werden.

3.6 Darstellung der Expression des Wildtyp-*RDH5*-Gens und der *RDH5*-Mutanten im Western-Blot

Aus dem Glyzerinstock des Klons 2 wurde mittels Maxi-Präparation (siehe Kapitel 2.2.15) die Wildtyp-Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5 isoliert und aufgereinigt. Außerdem wurde die Plasmid-DNA der beiden Mutanten pcDNA3.1+RDH5-G238W und aus Klon 8 pcDNA3.1+RDH5-A294P mittels Maxi-Präparation isoliert und aufgereinigt. Der DNA-Gehalt wurde im Photometer (siehe Kapitel 2.2.6) bestimmt und auf 1 µg/µl eingestellt. Die Plasmid-DNA wurde mittels Lipofektion mit Roti[®]-Fect

Plus nach dem in Kapitel 2.2.18.2 beschriebenen Protokoll in HEK293T-Zellen transfiziert. In den Transfektionsansatz wurden jeweils 5 µl Plasmid-DNA eingesetzt. Als Negativ-Kontrolle dienten nicht transfizierte HEK293T-Zellen. Die exprimierten Proteine wurden mit dem M-PER-Proteinextraktionsreagens-Kit (siehe Kapitel 2.2.19) isoliert. Der Protein-Gehalt der Zellextrakte wurde mit dem Coomassie Plus (Bradford) Assay-Kit (siehe Kapitel 2.2.20) gemessen. Die Zellextrakte hatten die in Tabelle 3.1 zusammengefassten Proteinkonzentrationen.

Tabelle 3.1: Konzentration der Proteinextrakte nach Expression der RDH5-Plasmidklone in HEK293T-Zellen.

<i>Zellextrakt</i>	<i>Proteinkonzentration</i>
Nicht transfizierte HEK293T-Zellen (Negativ-Kontrolle)	2747 µg/ml
Transfektion pcDNA3.1+RDH5	1720 µg/ml
Transfektion pcDNA3.1+RDH5-G238W	2644 µg/ml
Transfektion pcDNA3.1+RDH5-A294P	1588 µg/ml

Es wurde eine denaturierende diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Lämmli durchgeführt. Es wurden 10 µg des jeweiligen Proteins in den Reaktionsansatz eingesetzt. Um das unterschiedliche Volumen in µl auszugleichen, wurden die Ansätze mit 1×PBS auf 10 µg/20 µl eingestellt. Anschließend wurden die Proteinproben mit 5 µl des reduzierenden 5×SDS-PAGE-(Lämmli-)Probenpuffers geladen. Die Laufzeit des Gels betrug 45 min bei 250 V.

Die Proteine wurden mittels Semi-Dry-Blot nach dem in Kapitel 2.2.22 angegebenen Protokoll aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Blot wurde abweichend von diesem Protokoll bei 200 mA über 35 min durchgeführt. Die Proteine auf der Nitrozellulosemembran wurden danach mittels Immunfärbung detektiert. Als primärer Antikörper wurde Anti-RDH5 (siehe Tabelle 2.8), der aus Kaninchenserum isoliert worden war, eingesetzt. Der Antikörper wurde 1:500 in Blockierpuffer verdünnt. Als sekundärer Antikörper wurde Anti-rabbit-IgG-Peroxidase-conjugate (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Der Antikörper wurde 1:100.000 in Blockierpuffer verdünnt. Das Ergebnis der Immundetektion ist in Abbildung 3.21 dargestellt. Sowohl die Wildtyp-RDH5 als auch die Mutanten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} wurden in HEK293T-Zellen exprimiert. RDH5 hat eine berechnete Größe von 32 kDa [Driessen *et al.* 1995, Simon *et al.* 1995].

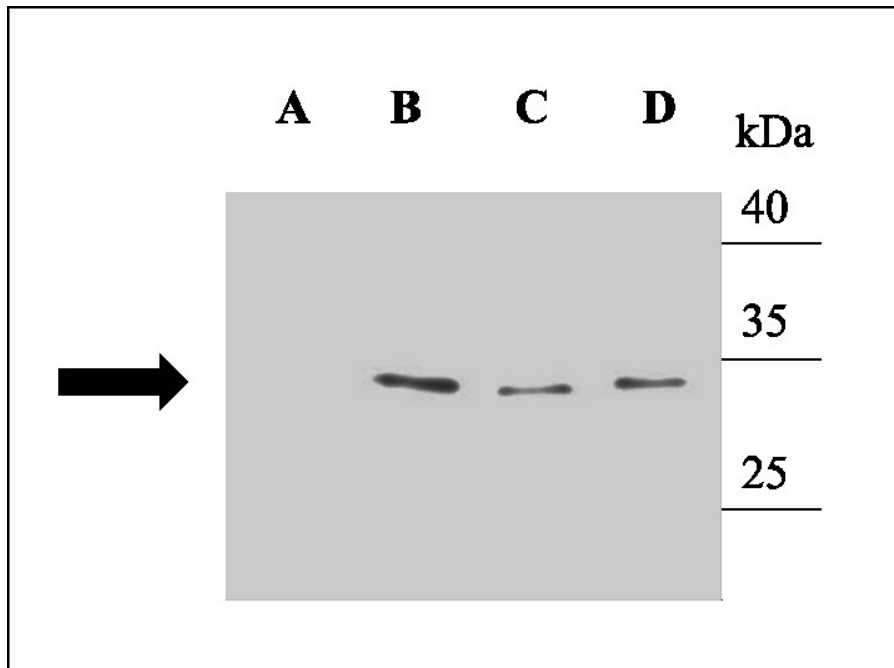


Abbildung 3.21: Immunfärbung des Western-Blots zur Detektion der Wildtyp-RDH5 sowie der Mutanten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P}. (A) Negativ-Kontrolle: Als Negativ-Kontrolle dienten nicht transfizierte HEK293T-Zellen. In diesen wurde die RDH5 nicht exprimiert (→). (B) Darstellung der Expression der 32 kDa Wildtyp-RDH5 (→) in HEK293T-Zellen. (C) Darstellung der Expression der 32 kDa RDH5^{G238W}-Mutante (→) in HEK293T-Zellen. (D) Darstellung der Expression der 32 kDa RDH5^{A294P}-Mutante (→) in HEK293T-Zellen.

3.7 Darstellung der intrazellulären Lokalisation des Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen

Zunächst wurde die intrazelluläre Expression und Lokalisation des Wildtyp-RLBP1 in humanen retinalen Pigmentepithelzellen, den ARPE-19-Zellen, zur Darstellung der physiologischen Verteilung untersucht.

Die indirekte Fluoreszenzmarkierung des RLBP1 in den ARPE-19-Zellen erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.23 angegebenen Immunhistochemie-Protokoll. Der primäre Antikörper wurde abweichend von diesem Protokoll 1:100 verdünnt. Es wurde dementsprechend 1 µg des primären Antikörpers Anti-RLBP1 (siehe Tabelle 2.8) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden 0,5 µg Alexa Fluor 430 Goat Anti-Mouse IgG (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 430 nm fluoreszierte der Sekundärantikörper unter Emission eines grüngelblichen Lichts. Die

eingesetzten Antikörperkonzentrationen waren optimiert. In der Negativkontrolle war keine Immunreaktion nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Zellkerne wurden durch eine DNA-Färbung mit DAPI bei Anregung mit ultraviolettem Licht unter Emission eines blauen Lichts dargestellt.

RLBP1 war im gesamten Zytoplasma der ARPE-19-Zelle nachweisbar. Es bildete eine netzartige Struktur aus, die perinukleär akzentuiert war und zur Peripherie hin ausdünnte, sich jedoch bis zur Zellmembran erstreckte (siehe Abbildung 3.22).



Abbildung 3.22: Fluoreszenzmarkierung des Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen. Gelbgrün: Fluoreszierender, an RLBP1 gebundener Sekundärantikörper. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der ARPE-19-Zellen. RLBP1 war intrazellulär im Zytoplasma der gesamten ARPE-19-Zelle nachweisbar. RLBP1 bildete eine netzartige Struktur (*), die akzentuiert um den Zellkern herum ausgebildet war und zur Zellperipherie hin dünner wurde.

3.8 Darstellung der intrazellulären Lokalisation der Wildtyp-RDH5 in ARPE-19-Zellen

Es folgte die Darstellung der physiologischen Expression und Lokalisation der Wildtyp-RDH5 in kultivierten humanen retinalen Pigmentepithelzellen, den ARPE-19-Zellen.

Die indirekte Fluoreszenzmarkierung der RDH5 erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.23 angegebenen Immunhistochemie-Protokoll. Dazu wurden 2 µg des primären Antikörpers Anti-RDH5 (siehe Tabelle 2.8) eingesetzt. Als Sekundärantikörper wurden 0,5 µg Alexa Fluor 430 Goat Anti-Rabbit IgG (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 430 nm fluoreszierte der Sekundärantikörper unter Emission eines gelbgrünen Lichts. Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen waren optimiert. In der Negativkontrolle konnte keine Immunreaktion nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Zellkerne wurden durch die DNA-Färbung mit DAPI bei Anregung mit ultraviolettem Licht unter Emission eines blauen Lichts dargestellt.

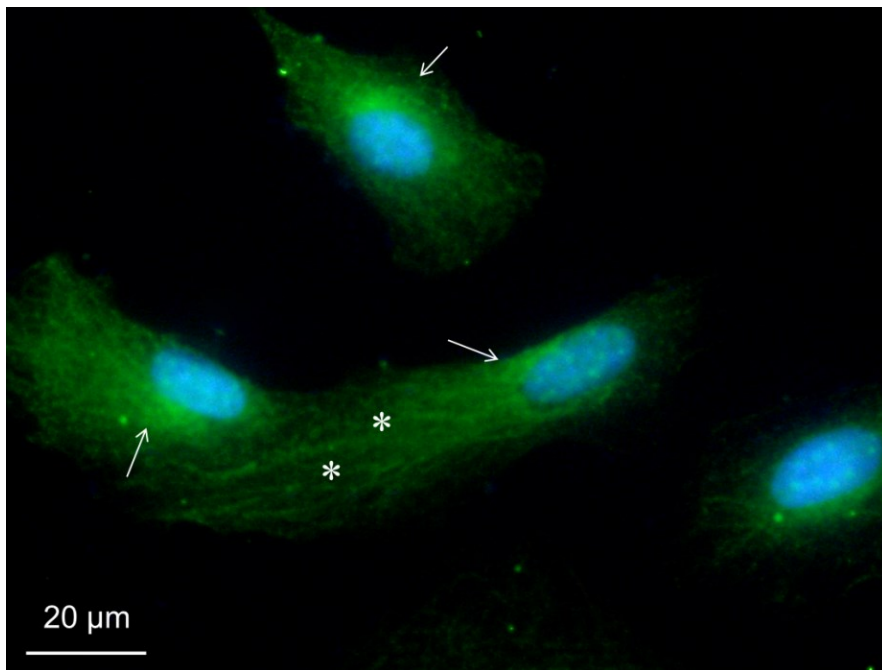


Abbildung 3.23: Fluoreszenzmarkierung der Wildtyp-RDH5 in ARPE-19-Zellen. Gelbgrün: Fluoreszierender, an RDH5 gebundener Sekundärantikörper. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der ARPE-19-Zellen. Die RDH5 war intrazellulär in den ARPE-19-Zellen betont perinukleär lokalisiert, während zur Zellperipherie hin die Konzentration abnahm. Perinukleär und im Bereich des Zellkerns bildete die RDH5 feinfleckige Formationen (→), während in der Peripherie ein filamentöses Verteilungsmuster ausgeprägt war (*).

Die RDH5 war im gesamten Zytoplasma der ARPE-19-Zellen verteilt. Jedoch lag sie in feinfleckiger Formation betont um den Zellkern herum vor. Im Zellkern zeigten sich

ebenfalls einzelne punktförmige Gruppierungen der RDH5. Zur Zellperipherie hin nahm die Konzentration ab. Peripher zeigte sich ein filamentöses Verteilungsmuster (siehe Abbildung 3.23).

3.9 Darstellung der intrazellulären Lokalisation des heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RLBP1

Die Transfektion der Plasmid-DNA pcDNA3.1+RLBP1 erfolgte in HeLa-Zellen durch Lipofektion nach dem in Kapitel 2.2.18.2 beschriebenen Roti[®]-Fect Plus-Protokoll. Abweichend von diesem Protokoll wurden 0,8 µg Plasmid-DNA pcDNA3.1+RLBP1 in 30 µl DMEM High Glucose gelöst. In einem weiteren Ansatz wurde 1 µl Roti[®]-Fect Plus mit 39,5 µl DMEM High Glucose gemischt. Die Lösungen wurden gemischt und anschließend zusammengeführt.

Nach der Inkubation wurde die Lösung in ein Loch der 8-Loch-Imaging-Kammer zu den darauf angezüchteten HeLa-Zellen gegeben. Das Kulturmedium der HeLa-Zellen wurde vor dem Hinzufügen des Transfektionsansatzes durch 200 µl DMEM (+++) ersetzt.

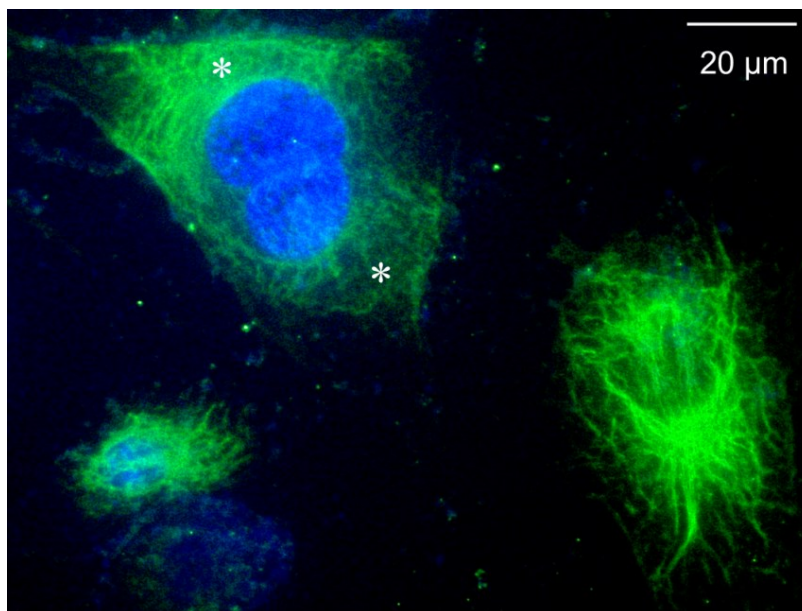


Abbildung 3.24: Fluoreszenzmarkierung des in HeLa-Zellen heterolog exprimierten Wildtyp-RLBP1. Gelbgrün: Fluoreszierender, an RLBP1 gebundener Sekundärantikörper. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der HeLa-Zellen. RLBP1 war intrazellulär netzartig (*) im Zytoplasma der gesamten HeLa-Zelle lokalisiert, akkumulierte jedoch perinukleär.

Die indirekte Fluoreszenzmarkierung des RLBP1 erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.23 angegebenen Immunhistochemie-Protokoll. Es wurden 2 µg des primären Antikörpers Anti-RLBP1 (siehe Tabelle 2.8) eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurden 0,5 µg Alexa Fluor 430 Goat Anti-Mouse IgG (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 430 nm fluoreszierte der Sekundärantikörper unter Emission eines grünelblichen Lichts.

Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen waren optimiert. In der Negativkontrolle war keine Immunreaktion nachweisbar (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Zellkerne wurden durch eine DNA-Färbung mit DAPI bei Anregung mit ultraviolettem Licht unter Emission eines blauen Lichts dargestellt.

Das in den HeLa-Zellen heterolog exprimierte RLBP1 war im gesamten Zytoplasma der HeLa-Zellen netzartig verteilt. Jedoch war die netzartige Struktur perinukleär ausgeprägter als peripher im Bereich der Zellmembran (siehe Abbildung 3.24).

3.10 Darstellung der intrazellulären Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 sowie der RDH5-Mutanten

Die Transfektion der Wildtyp-Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5 sowie der mutierten Plasmid-DNA pcDNA3.1+RDH5-G238W und pcDNA3.1+RDH5-A294P erfolgte in HeLa-Zellen durch Lipofektion nach dem in Kapitel 2.2.18.2 beschriebenen Roti[®]-Fect Plus-Protokoll. Abweichend von diesem Protokoll wurden 0,8 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in 30 µl DMEM High Glucose gelöst. 1 µl Roti[®]-Fect Plus wurde mit 39,5 µl DMEM High Glucose gemischt. Die Lösungen wurden gemischt und anschließend zusammengeführt.

Nach der Inkubation wurde die Lösung in ein Loch der 8-Loch-Imaging-Kammer zu den darauf angezüchteten HeLa-Zellen gegeben. Das Kulturmedium der HeLa-Zellen wurde vor dem Hinzufügen des Transfektionsansatzes durch 200 µl DMEM (+++) ersetzt.

Die indirekte Fluoreszenzmarkierung der RDH5 sowie der Mutanten erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.23 angegebenen Immunhistochemie-Protokoll.

Dazu wurden 2 μg des primären Antikörpers Anti-RDH5 (siehe Tabelle 2.8) eingesetzt.

Als Sekundärantikörper wurden zur Fluoreszenzmarkierung der Wildtyp-RDH5 und der Mutante RDH5^{G238W} 0,5 μg Alexa Fluor 430 Goat Anti-Rabbit IgG (siehe Tabelle 2.8) verwendet. Unter Anregung mit Licht der Wellenlänge 430 nm fluoreszierte der Sekundärantikörper unter Emission eines gelbgrünen Lichts (siehe Abbildung 3.25 und 3.26).

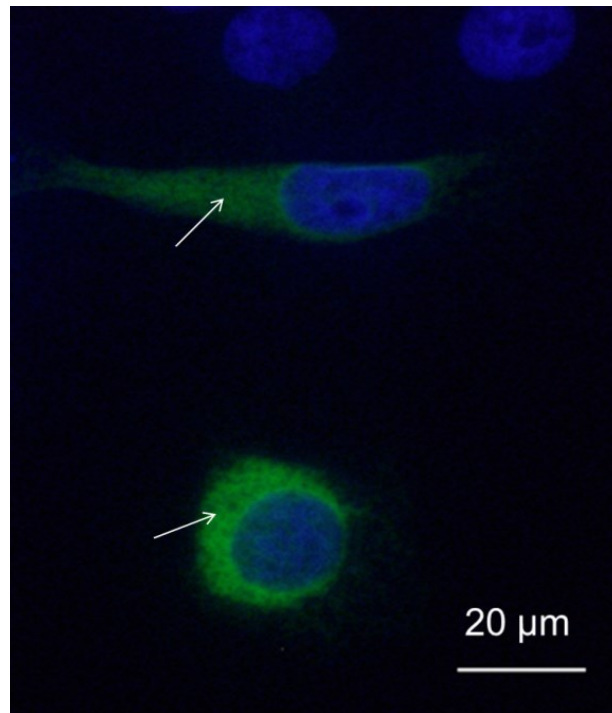


Abbildung 3.25: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5. Gelbgrün: Immunfluoreszenzmarkierung der exprimierten Wildtyp-RDH5. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der HeLa-Zellen. Die Wildtyp-RDH5 bildete ein homogenes, feinfleckiges Muster (→) aus, das das gesamte Zytoplasma gleichmäßig ausfüllte.

Zur Fluoreszenzmarkierung der Mutante RDH5^{A294P} wurden 0,5 μg des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 546 Goat Anti-Rabbit IgG (siehe Tabelle 2.8) eingesetzt. Dieser fluoreszierte unter Emission eines rotfarbenen Lichts (siehe Abbildung 3.27).

Die eingesetzten Antikörperkonzentrationen waren optimiert, sodass in den Negativkontrollen keine Immunreaktion nachgewiesen werden konnte (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die Zellkerne wurden durch die DNA-Färbung mit DAPI bei Anregung mit ultraviolettem Licht unter Emission eines blauen Lichts dargestellt.

Die in den HeLa-Zellen heterolog exprimierte Wildtyp-RDH5 bildete ein homogenes, feinfleckiges Muster aus, das das gesamte Zytoplasma gleichmäßig ausfüllte (siehe Abbildung 3.25).

Die in den HeLa-Zellen heterolog exprimierte mutierte RDH5^{G238W} war akzentuiert um den Zellkern herum nachweisbar. Aber auch im Bereich der Zellmembran akkumulierte die mutierte RDH5^{G238W} (siehe Abbildung 3.26).

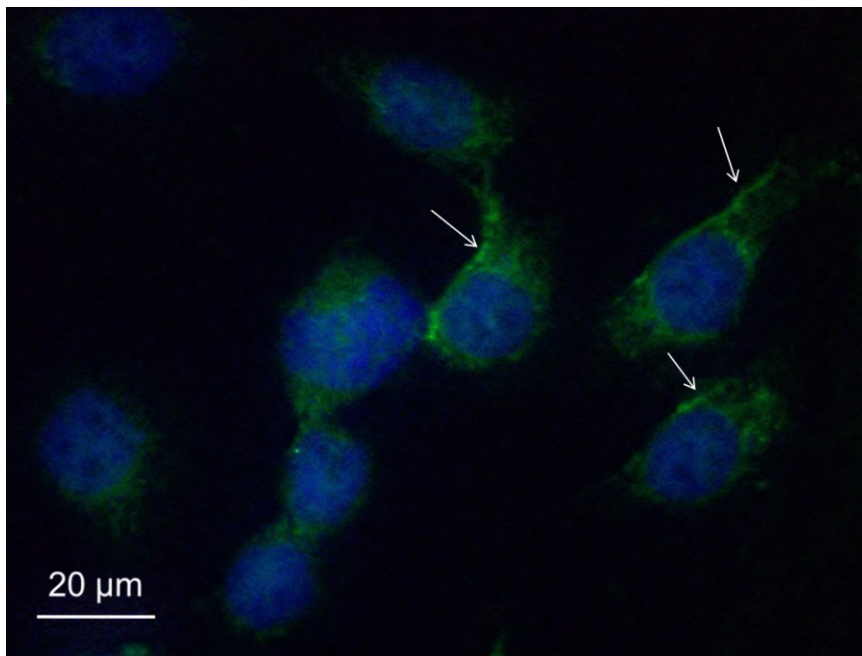


Abbildung 3.26: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5^{G238W}. Gelbgrün: Immunfluoreszenzmarkierung der RDH5^{G238W}. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der HeLa-Zellen. Die mutierte RDH5^{G238W} war akzentuiert um den Zellkern herum nachweisbar. Aber auch im Bereich der Zellmembran (→) akkumulierte die mutierte RDH5^{G238W}.

Die in den HeLa-Zellen heterolog exprimierte mutierte RDH5^{A294P} bildete feinfleckige Strukturen im gesamten Zytoplasma aus, die sich bis zur Zellmembran erstreckten. Im Bereich der Zellmembran zeigte sich eine besonders ausgeprägte Anhäufung immunpositiven Materials (siehe Abbildung 3.27).

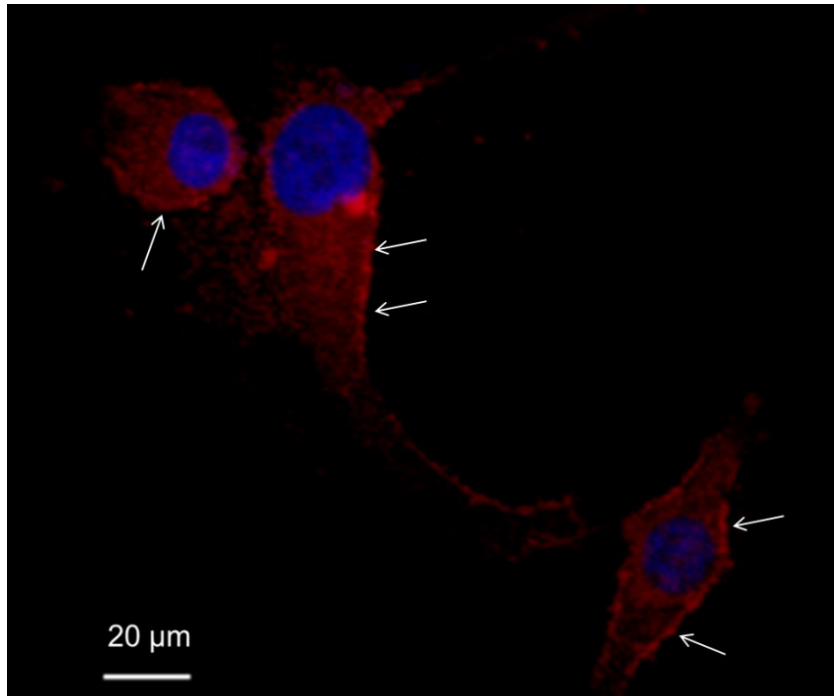


Abbildung 3.27: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten $RDH5^{A294P}$. Rot: Immunfluoreszenzmarkierung der mutierten $RDH5^{A294P}$. Blau: DAPI-Färbung der Zellkerne der HeLa-Zellen. Die mutierte $RDH5^{A294P}$ bildete feinfleckige Strukturen im gesamten Zytoplasma aus, die sich bis zur Zellmembran erstreckten. Im Bereich der Zellmembran (\rightarrow) zeigte sich eine besonders ausgeprägte Anhäufung immunpositiven Materials.

4 Diskussion

Die Erkrankung Fundus albipunctatus ist mit Mutationen im *RDH5*-Gen assoziiert. Das *RDH5*-Gen kodiert für die Retinoldehydrogenase 5 [Cideciyan *et al.* 2000, Driessen *et al.* 2001, Gonzalez-Fernandez *et al.* 1999, Hirose *et al.* 2000, Kuroiwa *et al.* 2000, Nakamura *et al.* 2000, Wada *et al.* 2000, Yamamoto *et al.* 1999].

Mutationen im *RDH5*-Gen können die Expression und Funktion der RDH5 einschränken [Lidén *et al.* 2001, Yamamoto *et al.* 1999]. Der Funktionsverlust der RDH5 könnte mit einer veränderten intrazellulären Lokalisation der mutierten RDH5 zusammenhängen, die die Interaktion mit RLBP1 beeinträchtigt und zu einer verringerten Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal führt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression und intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp-RDH5 und zweier RDH5-Mutanten zu überprüfen. Dazu wurden die beiden Punktmutationen p.G238W und p.A294P ausgewählt, da die Arbeitsgruppe von Schatz in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Lorenz, der Direktorin der hiesigen Klinik und Poliklinik für Augenheilkunde, bereits Patienten mit diesen Punktmutationen untersucht hatte, bei denen der Phänotyp Fundus albipunctatus vorlag. Bei diesen Patienten konnten Verdickungen im retinalen Pigmentepithel und eine reduzierte Autofluoreszenz mit den typischen weißen Flecken an den Fundi der Patienten korreliert werden, was auf eine verringerte Produktion des Chromophors 11-cis-Retinal hindeutete [Schatz *et al.* 2010].

Des Weiteren sollte die intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten mit der Lokalisation des RLBP1 verglichen werden, um so einen Rückschluss bezüglich deren Interaktion ziehen zu können.

Dazu wurden das *RDH5*- und *RLBP1*-Gen in einen Expressionsvektor kloniert. In das *RDH5*-Gen wurde zum einen die Punktmutation p.G238W und zum anderen die Punktmutation p.A294P eingefügt. Die Plasmid-DNA wurde einerseits in HEK293T- und andererseits in HeLa-Zellen transfiziert. In diesen Zelllinien wurden die Proteine exprimiert und lokalisiert. Zusätzlich wurden zum Vergleich mit den heterolog exprimierten Proteinen die Wildtyp-RDH5 und das Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen lokalisiert.

4.1 Klonierung der Gene

Die erfolgreiche Klonierung der Wildtyp-Gene *RDH5* und *RLBPI* zunächst in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor und anschließend in den Expressionsvektor pcDNA3.1+ konnte durch Sequenzanalyse bestätigt werden. Die Methode der TA-Klonierung in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor wurde gewählt, um große Mengen der Plasmid-DNA gewinnen zu können. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der TA-Klonierung zur Klonierung von PCR-Produkten hatte mehrere Vorteile gegenüber der konventionellen Methode nach Scharf *et al.* [1986], bei der die Klonierung der PCR-Produkte durch das Einfügen von Restriktionsschnittstellen und die darauffolgende Spaltung durch Restriktionsenzyme erfolgt. Zum einen war die Ausbeute bei der TA-Klonierungsmethode dadurch erhöht, dass nur das Insert in den Vektor kloniert werden konnte und die Selbstligation des Vektors durch die Topoisomerase verhindert wurde. Zum anderen war es im Gegensatz zu der herkömmlichen Methode nach Scharf *et al.* [1986] nicht notwendig, eine Restriktionsschnittstelle in den Primer einzubauen [Shuman 1994]. Denn die in dieser Arbeit zur Amplifikation des Gens verwendete HotStar HiFidelity DNA-Polymerase produzierte am 3'-Ende der synthetisierten DNA ein zusätzliches dATP [Clark 1988], mit dem die synthetisierte DNA in den pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor mit Thymidin-Überhang am 3'-Ende inkloniert werden konnte [Marchuk *et al.* 1990].

Da der pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektor an seiner Multiplen-Klonierungsstelle zwei *EcoRI*-Schnittstellen besaß, von denen eine Schnittstelle vor dem Insert und die andere hinter dem Insert lokalisiert war, konnte das Insert durch einen Restriktionsverdau mit *EcoRI* aus dem Vektor ausgeschnitten werden. Der Expressionsvektor pcDNA3.1+, der mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* gespalten worden war, hatte ebenfalls *EcoRI*-Schnittstellen an beiden Enden. Die zwei gleichen *EcoRI*-Schnittstellen hatten den Nachteil, dass das Insert in zwei verschiedenen Richtungen inkloniert werden konnte. Bei falscher Orientierung im Expressionsvektor musste das Insert umkloniert werden.

4.2 Mutagenese

In dieser Arbeit erfolgte die Mutagenese der Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5 durch eine Mutagenese-PCR. Die Punktmutationen p.G238W und p.A294P wurden zielgerichtet durch Amplifikation der gesamten Vektor-DNA mit spezifischen Primern, die die Punktmutation enthielten, eingefügt. Die erfolgreiche Mutagenese wurde durch

die Sequenzierung der Vektor-DNA bestätigt. Diese Methode hatte den Vorteil, dass keine Restriktionsschnittstellen in der Nähe der einzufügenden Mutation benötigt wurden, da keine erneute Klonierung notwendig war [Hemsley *et al.* 1989]. Die Phosphorylierung der hier zur Mutagenese-PCR verwendeten Primer an deren 5'-Ende ermöglichte den direkten Einsatz des linearisierten PCR-Produkts in die Ligation ohne vorherigen Phosphorylierungsschritt. Im Gegensatz zur Taq-Polymerase produzierte die hier verwendete Phusion Polymerase keine Basenüberhänge, sondern stumpfe 5'-phosphorylierte Enden, sodass ein weiterer Schritt zur Glättung der Enden des PCR-Produkts entfiel [Weiner *et al.* 1994].

4.3 Darstellung der Genexpression durch den Western-Blot

Die erfolgreiche Expression der klonierten Wildtyp-Gene *RDH5* und *RLBP1* sowie der mutierten *RDH5*-Gene konnte durch die Immunfärbung im Western-Blot gezeigt werden. Durch die vorausgehende Denaturierung wurde die native Form der Proteine zerstört, sodass die Auftrennung der Proteine allein nach deren molaren Massen erfolgte. Der in dieser Arbeit verwendete reduzierende Proteinauftragspuffer führte außerdem dazu, dass die Disulfidbrückenbindungen der Proteine aufgehoben wurden. Aufgrund der starken Denaturierung konnte das Vorliegen der *RDH5* als nichtkovalent gebundenes Homodimer [Lidén *et al.* 2001] nicht überprüft werden. Das in dieser Arbeit gewählte Semi-Dry-Blotverfahren nach Kyhse-Andersen zur Übertragung der Proteine von der SDS-PAGE-Gelmembran auf die Nitrozellulosemembran hatte im Vergleich zu dem Western-Blot-Verfahren nach Bittner *et al.* [1980], bei dem die Blotting-Apparatur vertikal angeordnet ist, einen effizienteren Transfer der Proteine sowie eine kürzere Transferzeit und eine geringere Hitzeentwicklung zum Vorteil [Kyhse-Andersen 1984].

4.3.1 Expression des Wildtyp-RLBP1 und der Wildtyp-RDH5

Die Expression in HEK293T-Zellen der in dieser Arbeit hergestellten Vektorkonstrukte, bestehend aus dem Expressionsvektor pcDNA3.1+ und dem darin subklonierten Wildtyp-Gen *RLBP1* bzw. *RDH5*, konnte durch die Immunfärbung im Western-Blot dargestellt werden.

Farjo *et al.* [2009] hatten bereits ein ähnliches Vektorkonstrukt hergestellt. Dieses bestand aus dem Expressionsvektor pcDNA6/V5/His und dem Wildtyp-*RLBP1*-Gen,

dessen Expression in HEK293-LRAT-Zellen durch den Western-Blot dargestellt werden konnte. Im Gegensatz zu dem Expressionsvektor, der von Farjo *et al.* [2009] verwendet worden war, war der in dieser Arbeit verwendete pcDNA3.1+-Expressionsvektor nicht mit einer Markierung versehen. Damit sollten Einflüsse der Markierung auf die Genexpression und die intrazelluläre Lokalisation des Proteins vermieden werden.

Maw *et al.* [1997] hingegen verwendeten keine humane Zelllinie, sondern *E.coli*-Bakterienzellen zur Expression des Wildtyp-RLBP1. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Verwendung humaner Zelllinien bevorzugt, da die menschliche genetische Ausstattung darin vorhanden war und der Proteinsyntheseapparat der Zelle zur Expression des klonierten Gens ausgenutzt werden konnte. Sowohl die hier ausgewählte humane HeLa-Zelllinie als auch die HEK293T-Zelllinie haben sich bereits in mehreren Studien zur Expression rekombinanter Proteine bewährt. Die Vorteile dieser Zelllinien bestehen in ihrer schnellen Teilungsrates und der relativ hohen Transfektionseffizienz [Lucey *et al.* 2009, Thomas und Smart 2005]. Eine endogene Expression des RLBP1 oder der RDH5 ist in diesen Zelllinien bisher nicht bekannt, obwohl in einer Arbeit von Wang *et al.* [1999] auch in humanem Nieren- und Uterusgewebe die Aktivität der RDH5 nachgewiesen werden konnte. In dieser Arbeit konnte jedoch mittels Western-Blot keine endogene RDH5- und RLBP1-Expression in den nicht transfizierten HEK293T-Zellen nachgewiesen werden. Die HEK293T-Zelllinie wurde in dieser Arbeit der HeLa-Zelllinie für die Expression mittels SDS-PAGE und Western-Blot vorgezogen, da die HEK293T-Zellen durch ihr dichtes und oft haufenartiges Wachstumsverhalten [Graham *et al.* 1977] viel Material liefern, das für die SDS-PAGE und den Western-Blot notwendig ist [Thomas und Smart 2005]. Die adhären epithelialen HeLa-Zellen wurden dagegen aufgrund ihres eher einschichtigen Wachstums zur Immunhistochemie verwendet, da dies zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop vorteilhafter war.

4.3.2 Expression der mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P}

Nicht nur die Expression der Wildtyp-RDH5, sondern auch die Expression der mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} in HEK293T-Zellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Die Transfektion erfolgte hier durch Lipofektion.

Auch in der Arbeit von Yamamoto *et al.* [1999] konnte bereits die Expression der Wildtyp-RDH5 und der mutierten RDH5^{G238W} im Immunoblot nachgewiesen werden. Yamamoto *et al.* [1999] stellten ein Vektorkonstrukt her, das sich aus dem Expressionsvektor pSG5 und dem darin subklonierten *RDH5*-Gen zusammensetzte. Die Genmutation p.G238W wurde über eine Einzelstrang-Mutagenese in das *RDH5*-Gen eingefügt. Die Vektoren wurden nach der Diethylaminoethyl(DEAE)-Dextran-Methode in COS-1-Zellen transfiziert [Yamamoto *et al.* 1999]. Yamamoto *et al.* [1999] konnten zusätzlich die Expressionsrate der mutierten RDH5^{G238W} durch Messung der Intensität des Signals im Immunoblot abschätzen. Die Expressionsrate der mutierten RDH5^{G238W} in COS-1-Zellen war 8 - 12mal geringer als die des Wildtyp-Enzyms.

Lidén *et al.* [2001] führten ebenfalls eine Subklonierung der cDNA des *RDH5*-Gens in den Expressionsvektor pSG5 durch. Durch Einzelstrang-Mutagenese wurden in der Arbeit von Lidén *et al.* [2001] die Mutationen p.G238W und p.A294P eingefügt und die Vektoren in COS-1-Zellen transfiziert. Die Expressionsrate wurde im Immunoblot quantifiziert. Sie betrug für die mutierte RDH5^{G238W} 2% der Expressionsrate der Wildtyp-RDH5. Die Expressionsrate der mutierten RDH5^{A294P} hatte einen Anteil von 22% an der Expressionsrate des Wildtyp-Enzyms [Lidén *et al.* 2001].

Eine Quantifizierung des Western-Blots wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen, da die Fragestellung dieser Arbeit auf die intrazelluläre Lokalisationsbeschreibung der Wildtyp-RDH5 und der Mutanten fokussiert war. Eine genaue Aussage über die Expressionsrate der Wildtyp-RDH5 im Vergleich zur mutierten RDH5 konnte daher in dieser Arbeit nicht getroffen werden. Allerdings wurden im Western-Blot für den Nachweis der Wildtyp-RDH5 die gleichen Gesamtproteinmengen aufgetragen wie für den Nachweis der mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P}. Die mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} zeigten im Vergleich zur Wildtyp-RDH5 bei Betrachten des Immunoblots eine tendenziell geringere Signalstärke.

4.4 Darstellung der Genexpression und Lokalisation der Proteine mittels Immunhistochemie

Die in dieser Arbeit hergestellten Vektorkonstrukte wurden heterolog in HeLa-Zellen exprimiert. Mittels Immunhistochemie konnten die heterolog exprimierten Proteine in den HeLa-Zellen lokalisiert werden. Die intrazelluläre Lokalisation der heterolog

exprimierten Wildtyp-Proteine wurde zunächst mit der intrazellulären Lokalisation der Wildtyp-Proteine in humanen retinalen Pigmentepithelzellen, den ARPE-19-Zellen, verglichen.

Für die mutierten Proteine lag kein Material humaner retinaler Pigmentepithelzellen vor, das zum Vergleich mit den heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5-Mutanten herangezogen werden konnte.

4.4.1 Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 im Vergleich zur Lokalisation der RDH5 in ARPE-19-Zellen

Die intrazelluläre Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 war weitestgehend mit der intrazellulären Lokalisation der RDH5 in den ARPE-19-Zellen vergleichbar, sodass davon ausgegangen werden konnte, dass sich die Expression und Lokalisation des in dieser Arbeit klonierten *RDH5*-Gens in HeLa-Zellen ähnlich wie die Expression und Lokalisation des *RDH5*-Gens in humanen retinalen Pigmentepithelzellen verhält. In beiden Zelllinien war die RDH5 im gesamten Zytoplasma in einem weitgehend feinfleckigen Verteilungsmuster lokalisiert. Im Gegensatz zu den HeLa-Zellen fiel in den ARPE-19-Zellen jedoch zusätzlich eine fädige Verteilungsstruktur der RDH5 in der Zellperipherie auf. Das fädige Verteilungsmuster erinnerte an die intrazelluläre Struktur der Mikrofilamente. Da die RDH5 ein membranständiges Enzym ist [Lidén *et al.* 2001, Tryggvason *et al.* 2001], steht sie möglicherweise über Vesikel oder Retinosomen gebunden mit den Mikrofilamenten in Kontakt. Die Vesikel bzw. Retinosomen können entlang der Mikrofilamente transportiert [Goode *et al.* 2000] oder stabilisiert werden [Langford 1995]. Die fehlende Ausprägung der filamentösen Struktur in den HeLa-Zellen könnte damit zusammenhängen, dass der Proteinsyntheseapparat der HeLa-Zellen im Gegensatz zu dem der ARPE-19-Zellen diese Vesikel bzw. Retinosomen weniger produzierte. Des Weiteren war im Unterschied zu den HeLa-Zellen in den ARPE-19-Zellen das feinfleckige Verteilungsmuster perinukleär akzentuierter als peripher. In den ARPE-19-Zellen war auch im Bereich des Zellkerns eine fleckförmige Verteilungsstruktur der RDH5 ausgeprägt. Die Flecken im Bereich des Zellkerns könnten sich jedoch artefaktbedingt auf den Zellkern projiziert haben. Denn mit dem in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzmikroskop konnte die in Wirklichkeit dreidimensionale Zelle nur in einem zweidimensionalen Schnitt betrachtet werden. Des Weiteren sprechen die Ergebnisse von Simon *et al.* [1999] dafür, dass es sich bei den

Ergebnissen dieser Arbeit am ehesten um Projektionsartefakte der RDH5 auf den Zellkern handelte. Denn in der Arbeit von Simon *et al.* [1999] konnte durch die immunhistochemische Färbung von Gewebeschnitten boviner RPE-Zellen die RDH5 ausschließlich zytoplasmatisch lokalisiert werden. Im Bereich des Zellkerns konnte die RDH5 nicht nachgewiesen werden [Simon *et al.* 1999].

Außerdem stimmte das Ergebnis dieser Arbeit, dass die RDH5 in den ARPE-19-Zellen akzentuiert perinukleär im Zytoplasma lokalisiert war, mit den Ergebnissen von Simon *et al.* [1999] und Huang *et al.* [2009] überein. Anhand der Immunfärbung eines Gewebeschnitts der Maus- und Rattenretina konnten Huang *et al.* [2009] die RDH5 im Bereich des Zellkörpers der RPE-Zelle nachweisen, während die apikalen Fortsätze der RPE-Zellen ausgespart blieben. Die RDH5 lag in den Gewebeschnitten von Simon *et al.* [1999] konzentriert in punktförmigen Untergruppen, vermehrt in der basolateralen Hälfte der Zellkörper, im Zytoplasma der RPE-Zellen vor. Durch die Elektronenmikroskopie konnten Simon *et al.* [1999] die zytoplasmatische Lokalisation der RDH5 bestätigen. Außerdem konnten sie zeigen, dass die RDH5 subzellulär vorwiegend in der Nähe des glatten ERs und kaum im Bereich der Plasmamembran der RPE-Zellen lokalisiert ist [Simon *et al.* 1999].

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangten auch Romert *et al.* [2000], die eine Transfektion der Plasmid-DNA, die sich aus der cDNA der RDH4 und dem Expressionsvektor pCMX-PL1 zusammensetzte, in Chinese Hamster Ovary(CHO)-Zellen durchführten. Die RDH4 der Maus entspricht nach Angaben von Romert *et al.* [2000] weitestgehend der humanen RDH5. Die Fluoreszenzmarkierung der RDH4 erfolgte mit dem spezifischen RDH4-Immunglobulin und einem sekundären Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Antikörper, während die Fluoreszenzmarkierung des ERs mit dem ER-Marker Concanavalin A erfolgte. Es zeigte sich ein ähnliches Verteilungsmuster der RDH4 und des ERs, woraus Romert *et al.* [2000] folgerten, dass sich die Lokalisation der RDH4 auf das ER beschränkt [Romert *et al.* 2000].

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind mit der Vermutung, dass die RDH5 subzellulär mit der Plasmamembran des glatten ERs assoziiert ist, vereinbar. Denn das intrazelluläre, weitgehend homogene, fleckige, in den ARPE-19-Zellen perinukleär betonte Verteilungsmuster der Wildtyp-RDH5 könnte mit der intrazellulären Verteilungsstruktur des glatten ERs übereinstimmen. Auch die Funktion des glatten ERs als Entgiftungsort toxischer Substanzen [Lodish *et al.* 2008] und die Ergebnisse von Bhattacharya *et al.* [2002] bestätigen die Vermutung, dass die RDH5 am ER lokalisiert

ist. Bhattacharya *et al.* [2002] konnten einen Enzymkomplex, bestehend aus der LRAT, die die entgiftende Veresterung des Retinols katalysiert [Saari *et al.* 1993], dem RPE65 und der RDH5, in Mikrosomen, dem Zerfallsprodukt des ERs [Rassow *et al.* 2012], nachweisen [Bhattacharya *et al.* 2002].

Abgesehen davon deutete die filamentöse Struktur in den ARPE-19-Zellen darauf hin, dass die RDH5 nicht nur am ER lokalisiert ist, sondern möglicherweise auch über die Retinosomenmembran in Verbindung mit den Mikrofilamenten steht.

4.4.2 Lokalisation des heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RLBP1 im Vergleich zur Lokalisation des RLBP1 in ARPE-19-Zellen

Die Lokalisation und intrazelluläre Verteilungsstruktur des heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RLBP1 stimmte mit der Lokalisation und intrazellulären Verteilungsstruktur des in ARPE-19-Zellen exprimierten RLBP1 überein. Sowohl in den HeLa-Zellen als auch in den ARPE-19-Zellen bildete das RLBP1 eine netzartige Struktur, die perinukleär akzentuiert war, jedoch auch im gesamten übrigen Zytoplasma zu erkennen war. Daraus ließ sich schließen, dass die hier gewonnenen Ergebnisse in der HeLa-Zelllinie mit den Ergebnissen in Zellkulturen retinaler Pigmentepithelzellen (ARPE-19) vergleichbar sind.

Die netzartige, perinukleär akzentuierte Verteilung des RLBP1 im Zytoplasma der HeLa- und ARPE-19-Zellen ähnelte der intrazellulären Anordnung des Mikrotubulin-Zytoskeletts in polarisierten epithelialen Zellen. Die Mikrotubuli ordnen sich in polarisierten epithelialen Zellen in longitudinalen Bündeln in der apiko-basalen Achse der Zelle an. Die Enden der Mikrotubuli sind polarisiert. Das Plus-Ende zeigt zur basolateralen Zellmembran, während das Minus-Ende der apikalen Zellmembran zugewandt ist [Mays *et al.* 1994]. Das Mikrotubulin-Zytoskelett steht mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung. Die Aktinfilamente sind im Gegensatz zu den Mikrotubuli kleiner und bilden eine Quervernetzung aus [Langford 1995], die hauptsächlich in einem schmalen Areal unterhalb der Plasmamembran lokalisiert ist [Lodish *et al.* 2000]. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass RLBP1 hauptsächlich mit dem Mikrotubulin-Zytoskelett assoziiert sein könnte, da RLBP1 vorwiegend zytoplasmatisch netzartig um den Zellkern herum lokalisiert werden konnte. Eine Verbindung des RLBP1 zum Aktin-Zytoskelett ist jedoch aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse nicht ausgeschlossen, denn die netzartige Verteilung des RLBP1 war im gesamten Zytoplasma nachweisbar, wenn auch im Bereich der Zellmembran weniger ausgeprägt.

Das Ergebnis dieser Arbeit, dass das RLBP1 im gesamten Zytoplasma nachgewiesen werden konnte, stimmt mit den Ergebnissen von Huang *et al.* [2009] überein. Diese konnten anhand der Immunfärbung eines Gewebeschnitts der Maus- und Rattenretina ebenfalls zeigen, dass RLBP1 in der gesamten RPE-Zelle lokalisiert ist, sowohl im Zellkörper als auch in den apikalen Fortsätzen der RPE-Zelle. Das ist mit der Funktion des RLBP1 als Transporter der Retinoide zwischen den apikalen Zellfortsätzen und dem Zellkörper vereinbar [Huang *et al.* 2009]. Auch Bunt-Milam und Saari [1983] konnten mittels Immunfluoreszenzfärbung eines Gewebeschnitts der Rinder- und Affenretina die Expression von RLBP1 im Zytoplasma der RPE-Zellen nachweisen, während die Zellkerne ausgespart blieben. In einer weiteren Immunfärbung der Affenretina konnte die bevorzugte Lokalisation des RLBP1 in den Mikrovilli, deren Zytoskelett sich vor allem aus Aktinfilamenten zusammensetzt [Lodish *et al.* 2008], an der apikalen RPE-Zellmembran nachgewiesen werden [Bunt-Milam und Saari 1983]. Dass eine Verbindung zwischen dem Aktin-Zytoskelett und dem RLBP1 besteht, zeigten bereits Nawrot *et al.* [2004]. Da die Aktinfilamente und Mikrotubuli beim intrazellulären Transport von Vesikeln miteinander kooperieren [Lodish *et al.* 2008], wäre es durchaus denkbar, dass sich RLBP1 als Transportprotein sowohl am apikalen Zellpol in Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett aufhält, als auch sich entlang des Mikrotubulin-Zytoskeletts durch die gesamte Zelle bewegt. Im Allgemeinen bewerkstelligen Motorproteine den Langstreckentransport von Vesikeln und Zellorganellen über die Mikrotubuli, während der Kurzstreckentransport entlang der Aktinfilamente stattfindet [Goode *et al.* 2000, Hirokawa 1998]. Das Mikrotubulin-Zytoskelett sorgt dabei für die intrazelluläre Translokation der Zellorganellen, während das Aktin-Zytoskelett für die Aufrechterhaltung der intrazellulären Lokalisation der Zellorganellen verantwortlich ist [Langford 1995]. Aber nicht nur Vesikel und Zellorganellen, sondern auch nichtmembranöse Fracht kann über die Motorproteine entlang des Zytoskeletts bewegt werden [Lodish *et al.* 2008]. So könnte RLBP1 als Transportprotein von 11-cis-Retinal und 11-cis-Retinal möglicherweise in vergleichbarer Art entlang des Zytoskeletts bewegt werden.

4.4.3 Vergleich zwischen der Lokalisation der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten

Sowohl die heterolog in den HeLa-Zellen exprimierte Wildtyp-RDH5 als auch die heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5-Mutanten waren in einer feinfleckigen

Struktur im gesamten Zytoplasma vorzufinden. Die RDH5-Mutanten waren wie die Wildtyp-RDH5 in den ARPE-19-Zellen akzentuiert perinukleär lokalisiert. Im Gegensatz zur Wildtyp-RDH5 war bei den heterolog exprimierten mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} zusätzlich eine Akkumulation immunpositiven Materials im Bereich der Zellmembran nachweisbar. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass bei einer Mutation im *RDH5*-Gen eine Lokalisation der mutierten RDH5 sowohl perinukleär als auch im Bereich der Zellmembran bevorzugt wird.

Die feinfleckige zytoplasmatische Verteilungsstruktur der mutierten RDH5 deutete wie die Lokalisation der Wildtyp-RDH5 auf eine Verbindung der mutierten RDH5 zum ER hin.

Die zusätzliche Akkumulation der mutierten RDH5 im Bereich der Zellmembran könnte zum einen mit der subzellulären Lokalisation der RDH5 an der Retinosomenmembran übereinstimmen, zum anderen könnte es sein, dass die mutierte RDH5 direkt mit der Zellmembran der RPE-Zellen assoziiert ist. Vermutlich können die Retinosomen in die Plasmamembran integriert werden. Das könnte dazu führen, dass die mutierte RDH5 nicht nur an der Retinosomenmembran, sondern auch in der Plasmamembran akkumuliert.

Diese Vermutung wäre mit den Ergebnissen von Mata *et al.* [1998b] vereinbar. Mata *et al.* [1998b] konnten die Speicherung von 11-cis-Retinylestern in der Plasmamembran von RPE-Zellen nachweisen. Bei einer Mutation im *RDH5*-Gen werden vermehrt 11-cis-Retinylester hergestellt [Driessen *et al.* 2000], die in der Plasmamembran gespeichert werden können [Mata *et al.* 1998b]. Die 11-cis-Retinylester werden durch die 11-cis-LRAT am ER hergestellt [Mata und Tsin 1998a]. Durch die in der Plasmamembran lokalisierte Retinylesterhydrolase und die RDH5 [Mata *et al.* 1998b] können die 11-cis-Retinylester wieder zu 11-cis-Retinal umgewandelt werden [Mata und Tsin 1998a]. Die Zunahme der 11-cis-Retinylester bei einer *RDH5*-Mutation könnte mit einer Zunahme der mutierten RDH5 in der Plasmamembran einhergehen. Es bliebe jedoch unklar, wie und warum bei einer Mutation im *RDH5*-Gen eine erhöhte Konzentration der mutierten RDH5 in der Plasmamembran zustande kommen könnte.

Die Annahme, dass die RDH5 mit der Membran der Retinosomen assoziiert sein könnte, stimmt mit den Ergebnissen von Imanishi *et al.* [2004a] und Simon *et al.* [1999] überein. Imanishi *et al.* [2004a] zeigten bereits, dass sich die Retinosomen in RPE-

Zellen der Maus subzellulär konzentriert im Bereich der Plasmamembran befinden. Sie vermuteten, dass es sich bei den Retinosomen um Fettkörperchen handelt, die am ER entstehen, sich von dort abschnüren und von einer Monomembranschicht des ERs umgeben sind [Imanishi *et al.* 2004b]. Simon *et al.* [1999] konnten anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen von Rinder-RPE-Zellen zeigen, dass die RDH5 mit der Membran des ERs assoziiert ist. Sie stellten weiterhin aufgrund von Untersuchungen der Transmembrandomänen der RDH5 die Vermutung auf, dass die RDH5 in der Membran des ERs verankert ist [Simon *et al.* 1999]. Die in dieser Arbeit dargestellte Lokalisation passt zu der Vermutung, dass die mutierte RDH5 ein membranständiges Enzym ist, das zum einen mit der Membran des ERs und zum anderen mit der Membran der Retinosomen, die aus dem ER hervorgeht, in Kontakt steht. Denn die mutierte RDH5 wurde in dieser Arbeit zum einen zytoplasmatisch, vermutlich in Assoziation mit der Membran des ERs, und zum anderen in punktförmigen Gruppierungen in der Nähe der Plasmamembran nachgewiesen. Außerdem bildete die Wildtyp-RDH5 in den ARPE-19-Zellen eine fädige Struktur aus, die auf eine Verbindung der RDH5, möglicherweise über die Retinosomen, zum Zytoskelett hindeutete. Ausgehend davon, dass die Retinosomen in RPE-Zellen weitestgehend Fettkörperchen entsprechen [Orban *et al.* 2011], werden die Retinosomen möglicherweise wie die Fettkörperchen in anderen Zellen entlang des Zytoskeletts bewegt [Welte 2009] und in der Nähe der Plasmamembran gespeichert. Boström *et al.* [2005] zeigten, dass zur Zusammenlagerung mehrerer Fettkörperchen eine Interaktion zwischen dem Mikrotubulin-Zytoskelett und den Fettkörperchen notwendig ist.

Jedoch bliebe die Frage offen, weshalb die mutierte RDH5 im Gegensatz zur Wildtyp-RDH5 vermehrt an der Plasma- und Retinosomenmembran vorliegt, während die Wildtyp-RDH5 hauptsächlich an der Membran des ERs lokalisiert zu sein scheint. Die Annahme, dass eine Größenzunahme der Retinosomen wie bei den Fettkörperchen in anderen Zellen durch Fusion erfolgt [Boström *et al.* 2005], könnte erklären, weshalb in dieser Arbeit die mutierte RDH5 im Bereich der Plasmamembran stärker als die Wildtyp-RDH5 nachweisbar war. Eine Vermutung wäre, dass bei einer Mutation im *RDH5*-Gen vermehrt Retinosomen gebildet werden, die die Retinylester, die akkumulieren [Driessen *et al.* 2000], speichern. Diese Retinosomen, an deren Membran die RDH5 lokalisiert ist, könnten sich im Bereich der Plasmamembran zusammenlagern und fusionieren. Die Retinosomen könnten in die Plasmamembran integriert werden.

Damit würde bei einer Erhöhung der Anzahl bzw. Vergrößerung der Retinosomen durch Fusion auch der RDH5-Gehalt in der Retinosomen- und Plasmamembran steigen.

Daraus ergebe sich jedoch die Frage, ob die RDH5 tatsächlich als integrales Membranprotein am ER vorliegt [Lidén *et al.* 2001, Tryggvason *et al.* 2001], oder ob sie in einer anderen Form an die Membran des ERs und der Retinosomen gebunden vorliegt. Denn laut Brown [2001] ist es unwahrscheinlich, dass sich ein integrales Membranprotein mit einem Fettkörperchen vom ER abschnüren kann, da dessen Transmembrandomäne zu kurz wäre, um die dickere Lipiddoppelschicht der Fettkörperchen durchspannen zu können [Brown 2001]. Jedoch existieren weitere Theorien über die Abschnürung von Fettkörperchen. Bei der Theorie des Abschnürens eines Vesikels von der Membran des ERs könnten die Fettkörperchen z.B. von einer Lipiddoppelschicht des ERs umgeben sein [Walther und Farese 2009] und damit auch integrale Membranproteine mitabgeschnürt werden.

Dass bei einer Mutation im *RDH5*-Gen im Vergleich zur Wildtyp-RDH5 vermehrt Retinosomen an der apikalen RPE-Membran eingelagert werden, würde auch zu der Vermutung passen, dass die Retinosomen mit den darin gespeicherten Retinylestern die weißen Punkte am Fundus der an Fundus albipunctatus erkrankten Patienten erzeugen [Preising und Lorenz 2009].

4.4.4 Lokalisation der Wildtyp-RDH5 im Vergleich zur Lokalisation des Wildtyp-RLBP1

Sowohl die Wildtyp-RDH5 als auch das Wildtyp-RLBP1 konnten in dieser Arbeit ubiquitär im Zytoplasma der ARPE-19- bzw. HeLa-Zellen nachgewiesen werden. Das intrazelluläre Verteilungsmuster variierte jedoch zwischen der Wildtyp-RDH5 und dem Wildtyp-RLBP1. Die Wildtyp-RDH5 wurde in einem annähernd homogenen, feinfleckigen Muster, in den ARPE-19-Zellen betont um den Zellkern herum, lokalisiert (Abbildung 3.23). Diese zytoplasmatische Verteilung der Wildtyp-RDH5 erinnerte an die Verteilungsstruktur des ERs. Dagegen zeigte das Wildtyp-RLBP1 intrazellulär ein netzartiges Verteilungsmuster (Abbildung 3.24), das den Schluss nahelegte, dass das Transportprotein RLBP1 mit dem Tubulin-Zytoskelett assoziiert ist. Die Lokalisationen der Wildtyp-RDH5 und des Wildtyp-RLBP1 waren überlappend, sodass eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen möglich sein kann. Die überlappende Lokalisation der RDH5 und des RLBP1 könnte auf die überlappende Lokalisation von

ER und Tubulin-Zytoskelett zurückzuführen sein. Denn Terasaki *et al.* [1986] stellten bereits fest, dass zwischen dem Tubulin-Zytoskelett und dem ER eine enge Verbindung besteht, auch wenn die Strukturen nicht die gleiche intrazelluläre zytoplasmatische Verteilungsstruktur besitzen [Terasaki *et al.* 1986]. Damit wäre die Lokalisation der RDH5, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde, mit den Ergebnissen von Huang *et al.* [2009] vereinbar. Huang *et al.* [2009] vermuten, dass das Enzym RDH5 mit der Membran des ERs assoziiert ist und dort die Umsetzung von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal stattfindet. Zwischen RLBP1 und RDH5 müsste eine Interaktion am ER stattfinden, damit RLBP1 das Retinoid der RDH5 zur Oxidation bereitstellen und es anschließend entlang des Tubulin-Zytoskeletts an die apikale Zellmembran transportieren kann. Dass eine Interaktion zwischen RLBP1 und RDH5 an der Membran des ERs stattfindet, steht im Einklang mit den Ergebnissen von Bhattacharya *et al.* [2002]. Diese beschrieben mittels Immunpräzipitation eine Interaktion zwischen RLBP1 und RDH5 an der Mikrosomenmembran [Bhattacharya *et al.* 2002]. Unter Mikrosomen versteht man kleine Vesikel, in die das ER zerfällt, wenn die Zellen im Labor aufgebrochen werden [Rassow *et al.* 2012]. Auch Saari und Bredberg [1982] stellten fest, dass die Reduktion von 11-cis-Retinal durch die in den Mikrosomen lokalisierte RDH5 in Anwesenheit des RLBP1 stattfindet.

4.4.5 Lokalisation der RDH5-Mutanten im Vergleich zur Lokalisation des Wildtyp-RLBP1

Die RDH5-Mutanten wurden in dieser Arbeit heterolog in HeLa-Zellen exprimiert und lokalisiert. Ein Vergleich mit einer homologen Expression wie bei dem RDH5-Wildtyp in ARPE-19-Zellen konnte nicht vorgenommen werden. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, dass sich die Lokalisation des RDH5-Wildtyps in den ARPE-19-Zellen von dem heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5-Wildtyp insofern unterschied, dass in den ARPE-19-Zellen peripher fädige Strukturen im Zytoplasma nachzuweisen waren. Diese fädigen Strukturen ließen schlussfolgern, dass die Wildtyp-RDH5, möglicherweise an Zellorganellen gebunden, Kontakt zu den Mikrofilamenten besitzt. Bei den heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5-Mutanten konnte die fädige Struktur ebenso wenig wie bei dem heterolog exprimierten RDH5-Wildtyp gezeigt werden, was am ehesten auf die Proteinausstattung der HeLa-Zellen zurückzuführen ist.

Die mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} waren in dieser Arbeit im gesamten Zytoplasma der HeLa-Zellen verteilt. Die Lokalisation der RDH5-Mutanten war, wie die des RDH5-Wildtyps in HeLa-Zellen, mit einer Lokalisation am ER vereinbar.

Im Gegensatz zur Wildtyp-RDH5 war bei den RDH5-Mutanten jedoch zusätzlich eine positive Immunreaktion in punktförmigen Gruppierungen im Bereich der Plasmamembran zu sehen, die aufgrund einer vermehrten Lokalisation der Retinosomen an der Plasmamembran durch die membranständige mutierte RDH5 zustande kommen könnte.

Eine fleckige Lokalisation im Bereich des Zellkerns wie bei dem RDH5-Wildtyp in den ARPE-19-Zellen war kaum nachweisbar.

RLBP1 war dagegen im gesamten Zytoplasma in einem netzartigen Verteilungsmuster angeordnet. RLBP1 hält sich als Transportprotein vermutlich entlang des Zytoskeletts auf.

Die intrazellulären Lokalisationen der RDH5-Mutanten und des RLBP1 waren überlappend. Aufgrund dessen wäre auch für die RDH5-Mutanten eine Interaktion am ER mit RLBP1 nicht auszuschließen. Die in dieser Arbeit untersuchten Mutationen im *RDH5*-Gen scheinen die Lokalisation der mutierten RDH5 am ER nicht zu verändern. Am ER könnte die membranständige mutierte RDH5 das von RLBP1 bereitgestellte 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal oxidieren.

Jedoch deutete die in dieser Arbeit gezeigte Akkumulation der mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} in der Plasmamembran auf die verringerte Enzymaktivität der mutierten RDH5 hin. Einen reduzierten Umsatz von 11-cis-Retinol zu 11-cis-Retinal durch die mutierte RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} konnten bereits Lidén *et al.* [2001] feststellen. Driessen *et al.* [2000] konnten zeigen, dass es bei RDH5-Knockout-Mäusen zur Akkumulation von 11-cis-Retinol und 11-cis-Retinylestern kommt. Die 11-cis-Retinylester könnten in Retinosomen gespeichert und zur Plasmamembran transportiert werden, wo die Retinosomen in die Plasmamembran integriert werden. Damit könnte es auch zu einem erhöhten Einbau der membranständigen mutierten RDH5 in die Plasmamembran kommen. Die in der Plasmamembran gespeicherten 11-cis-Retinylester könnten anschließend in einem von RLBP1 unabhängigen Weg wieder zu 11-cis-Retinal umgewandelt werden [Mata und Tsin 1998a], da sich eine 11-cis-Retinylesterhydrolase und die RDH5 in der Plasmamembran befinden [Mata *et al.* 1998b]. Eine Interaktion mit RLBP1 an der Plasmamembran wäre daher nicht mehr

notwendig [Mata und Tsin 1998a]. Bonilha *et al.* [2004] konnten jedoch die Wildtyp-RDH5 und das Wildtyp-RLBP1 auch apikal im RPE der Maus nachweisen und vermuteten anhand dessen, dass eine Interaktion zwischen den beiden Proteinen an der Plasmamembran stattfinden kann [Bonilha *et al.* 2004].

4.5 Schlussfolgerung bezüglich der Wirkung der Mutationen im *RDH5*-Gen auf die Lokalisation und Interaktion zwischen RDH5 und RLBP1

Die intrazelluläre Lokalisation der in dieser Arbeit heterolog exprimierten Wildtyp-RDH5 konnte dem ER zugeordnet werden. Das fädige Verteilungsmuster in den ARPE-19-Zellen deutete zudem auf eine Verbindung der membranständigen Wildtyp-RDH5 über die Retinosomen zu den Mikrofilamenten hin.

Die intrazelluläre Lokalisation der heterolog exprimierten RDH5-Mutanten konnte wie die der heterolog exprimierten Wildtyp-RDH5 dem ER zugeordnet werden. Die Lokalisation der RDH5-Mutanten am ER scheint durch die hier untersuchten Mutationen nicht verändert zu werden. Bei den RDH5-Mutanten konnte jedoch zusätzlich eine Akkumulation immunpositiven Materials im Bereich der Plasmamembran dargestellt werden. Das könnte auf eine Akkumulation der membranständigen RDH5-Mutanten in der Retinosomen- und Plasmamembran hindeuten.

Die intrazelluläre Lokalisation des in dieser Arbeit heterolog exprimierten Wildtyp-RLBP1 wurde dem Zytoskelett zugeordnet.

Aufgrund der überlappenden intrazellulären Lokalisationen von ER und Zytoskelett [Terasaki *et al.* 1986] wurde anhand der Ergebnisse dieser Arbeit angenommen, dass eine Interaktion zwischen der Wildtyp-RDH5 und dem Wildtyp-RLBP1 genauso wie zwischen den RDH5-Mutanten und dem Wildtyp-RLBP1 am ER stattfinden kann.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern keinen Anhalt dafür, dass bei *RDH5*-Mutationen die Interaktion zwischen den RDH5-Mutanten und dem RLBP1 am ER gestört sein könnte.

4.6 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit klonierten Vektoren konnte die Grundlage zur Untersuchung der Lokalisation des RLBP1 und der RDH5 sowie der RDH5-Mutanten in humanen Zelllinien geschaffen werden.

Auch die Funktionsbestimmung der mutierten RDH5 im Rahmen einer Hochdruckflüssigkeitschromatographie bzw. Umkehrphasenchromatographie, wie sie in den Arbeiten von Yamamoto *et al.* [1999] und Lidén *et al.* [2001] bereits durchgeführt wurde, ist mit den in dieser Arbeit heterolog exprimierten Genen denkbar. Damit kann jedoch nicht die Ursache, sondern nur die Tatsache eines verminderten Umsatzes von 11-cis-Retinol bei einer Mutation im *RDH5*-Gen gezeigt werden. Deshalb lag der Fokus dieser Arbeit auf der Lokalisations- und mutmaßlichen Interaktionsbestimmung zwischen der mutierten RDH5 und RLBP1.

Anhand der Basis dieser Arbeit ist es möglich, weitere Versuche zur genaueren Lokalisationsbeschreibung der Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten im Vergleich zum RLBP1 sowie zur Interaktion der beiden Proteine durchzuführen.

Wichtig wäre die weitere Klärung der Frage, ob zwischen den RDH5-Mutanten und dem RLBP1 tatsächlich eine Interaktion, wie in dieser Arbeit vermutet, stattfindet. Die genauere Interaktionsbestimmung der beiden Proteine kann mittels Koimmunpräzipitation in Western-Blots untersucht werden. Mittels Koimmunpräzipitation können Protein-Protein-Interaktionen im Zytoplasma untersucht werden. Voraussetzung dafür wäre jedoch die Proteinmarkierung, z.B. mit einem Polyhistidin-Tag. Dazu müssten entweder das Wildtyp-*RDH5*-Gen und die mutierten *RDH5*-Gene oder aber das *RLBP1*-Gen aus den in dieser Arbeit klonierten pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektoren isoliert und in einen Expressionsvektor, der für einen Protein-Tag kodiert, umkloniert werden. Das transfizierte Gen sollte dann mitsamt des Protein-Tags in humanen Zellen exprimiert werden. Aus dem Zelllysat kann das markierte Protein mithilfe des passenden Antikörpers gegen den Protein-Tag präzipitiert werden. Bei einer Interaktion des markierten Proteins mit einem anderen Protein würden somit beide Proteine präzipitiert und in einer denaturierenden SDS-PAGE dargestellt werden können [Clark und Pazdernik 2009]. Auf die Markierung der Proteine mit einem Protein-Tag wurde in dieser Arbeit zunächst verzichtet, um die

Darstellung der intrazellulären Lokalisation nicht durch unphysiologische Modifikationen zu beeinflussen.

Eine Darstellung der Interaktion zwischen den exprimierten Proteinen RLBP1 und RDH5 mittels nativer Gelelektrophorese wäre eine weitere Alternative zur Koimmunpräzipitation. Dazu wäre zunächst die Durchführung einer Kotransfektion zur heterologen Expression des *RLBP1*-Gens mit dem Wildtyp-*RDH5*-Gen sowie jeweils mit den mutierten *RDH5*-Genen in humanen Zellen, wie z.B. den HEK293T-Zellen, denkbar. Bei der nativen Gelelektrophorese werden die Proteine im Gegensatz zu der in dieser Arbeit durchgeführten denaturierenden SDS-PAGE in einem geeigneten Ladepuffer ohne denaturierende Agentien gelöst, um so die Proteine in ihrer nativen Form auftrennen und die Proteininteraktionen darstellen zu können. Die Proteine werden dabei sowohl nach ihrer Größe als auch nach ihrer Ladung aufgetrennt. Die Protein-Protein-Interaktionen bleiben dabei intakt [Egger und Bienz 1994]. Die native Gelelektrophorese funktioniert mit hydrophilen Proteinen gut, während hydrophobe und amphiphile Proteine, wie z.B. Membranproteine, ein nichtionisches Detergens benötigen, um während der Separation in Lösung zu bleiben. Dieses Detergens verhindert jedoch beim darauffolgenden Blotten die Immobilisation der Proteine auf der Nitrozellulosemembran [Bjerrum *et al.* 1987].

Des Weiteren bliebe die Frage nach der genauen intrazellulären Lokalisation der mutierten RDH5 - in Assoziation mit der ER-, Plasma- und Retinosomenmembran, wie in dieser Arbeit vermutet - zu klären. Außerdem sollte der Interaktionsort der mutierten RDH5 mit dem RLBP1 genauer untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für eine Interaktion der beiden Proteine am ER.

Die Lokalisationsbeschreibung der Proteine innerhalb der Zelle kann zum einen durch eine Kotransfektion zur heterologen Expression des *RLBP1*-Gens mit dem Wildtyp-*RDH5*-Gen bzw. den mutierten *RDH5*-Genen in HeLa-Zellen präzisiert werden. Die Interaktion sowie der Interaktionsort der beiden Proteine sind durch die Kolokalisationsbestimmung der Proteine innerhalb der Zelle genauer einschätzbar. Zusätzlich käme eine Fluoreszenzmarkierung des ERs, der Retinosomen, der Plasmamembran und des Zytoskeletts in Betracht, um die dortige Lokalisation der RDH5 und des RLBP1 bestimmen zu können. Außerdem kann durch die Betrachtung der transfizierten Zellen mit dem konfokalen Lasermikroskop anstatt des in dieser

Arbeit verwendeten Fluoreszenzmikroskops die Auflösung in verschiedenen Ebenen erhöht werden.

Kann keine Pathologie bezüglich der Interaktion zwischen der mutierten RDH5 und dem RLBP1 gefunden werden, sollte auch eine gestörte Interaktion zwischen der mutierten RDH5 und dem RPE65 als Ursache für die Erkrankung Fundus albipunctatus in Betracht gezogen werden. Denn unter der Annahme, dass RLBP1 nicht als Substratträgerprotein für die RDH5 dient [Simon *et al.* 1999], sondern RPE65 und RDH5 einen Proteinkomplex am ER bilden [Golczak *et al.* 2010, Wenzel *et al.* 2005], könnte es durch eine gestörte Interaktion zwischen RPE65 und RDH5 ebenfalls zur Unterbrechung des Retinolzyklus kommen.

5 Zusammenfassung

Der Retinolzyklus in den retinalen Pigmentepithelzellen dient der Wiederherstellung des Retinoids 11-cis-Retinal, das für den Sehvorgang des menschlichen Auges essentiell ist. Am Retinolzyklus sind die Proteine RDH5 und RLBP1 beteiligt, die miteinander interagieren. Mutationen im *RDH5*-Gen führen zu einer verminderten Produktion des Retinoids 11-cis-Retinal und einer Akkumulation der Vorstufe 11-cis-Retinol, welches zu 11-cis-Retinylestern verstoffwechselt wird, die vermutlich in Retinosomen gespeichert werden. Phänotypisch äußert sich die Mutation im *RDH5*-Gen durch weiße Flecken am Fundus der Patienten, dem Fundus albipunctatus, der zur Nachtblindheit führt.

Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob die mutierte RDH5 eine veränderte intrazelluläre Lokalisation im Vergleich zur Wildtyp-RDH5 besitzt, die eine Interaktion mit RLBP1 verhindern würde und so für die verminderte Produktion des Retinoids 11-cis-Retinal verantwortlich sein könnte. In dieser Arbeit wurden die beiden Punktmutationen p.G238W und p.A294P im *RDH5*-Gen auf molekularer Ebene untersucht.

Zunächst wurde mittels RT-PCR die DNA des *RDH5*- und *RLBP1*-Gens aus humaner RNA gewonnen. Die Gene wurden zuerst in pCR[®]2.1-TOPO[®]-Vektoren und anschließend in pcDNA3.1+-Expressionsvektoren kloniert. Durch eine Mutagenese-PCR wurden die Punktmutationen p.G238W und p.A294P in das *RDH5*-Gen eingefügt. Die heterologe Expression der Wildtyp-Gene und der mutierten *RDH5*-Gene wurde in der humanen HEK293T-Zelllinie überprüft. Nachdem die dortige Expression gelungen war, wurde die intrazelluläre Lokalisation der Proteine in HeLa-Zellen untersucht.

Die Lokalisation der RDH5-Mutanten wurde mit der der Wildtyp-RDH5 verglichen. Sowohl die RDH5-Mutanten als auch die Wildtyp-RDH5 zeigten ein perinukleär akzentuiertes, gleichmäßiges, feinfleckiges Verteilungsmuster, das mit einer Lokalisation der RDH5 am Endoplasmatischen Retikulum vereinbar war. Im Gegensatz zur Wildtyp-RDH5 konnte bei den mutierten RDH5^{G238W} und RDH5^{A294P} jedoch zudem eine Akkumulation immunpositiven Materials im Bereich der Plasmamembran gezeigt werden. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit die Vermutung aufgestellt, dass die mutierte RDH5 bevorzugt in der Plasmamembran und an den Retinosomen, die bei einer Mutation im *RDH5*-Gen vermehrt hergestellt werden, lokalisiert ist. Des Weiteren

wurde in dieser Arbeit die intrazelluläre Lokalisation der Wildtyp-RDH5 und der RDH5-Mutanten mit der Lokalisation des RLBP1 verglichen. Die intrazelluläre Lokalisation von RLBP1 zeigte eine perinukleär betonte, netzartige Verteilungsstruktur und wurde dem Zytoskelett zugeordnet. Aufgrund der überlappenden intrazellulären Lokalisation wurde eine Interaktion zwischen der Wildtyp-RDH5 und dem RLBP1 ebenso wie zwischen den RDH5-Mutanten und dem RLBP1 am Endoplasmatischen Retikulum für möglich gehalten.

6 Summary

The visual cycle in the retinal pigment epithelium serves as a pathway for the regeneration of the retinoid 11-cis-retinal, which is essential for vision of the human eye. The proteins RDH5 and RLBP1 are components of the visual cycle. There is an interaction known between these two proteins. Mutations in the *RDH5* gene lead to a reduced production of the retinoid 11-cis-retinal and an accumulation of its precursor 11-cis-retinol. 11-cis-retinol can be converted into 11-cis-retinyl esters, which presumably can be stored in retinosomes. Phenotypically the fundus of the patients with mutations in the *RDH5* gene shows white spots. Therefore, the disease is called fundus albipunctatus. It leads to night blindness.

The aim of this work was to check whether a difference in the intracellular localization of the mutated RDH5 in comparison with the wild-type RDH5 could be shown, which would impede the interaction with RLBP1 and thus could be the reason for the reduced production of the retinoid 11-cis-retinal. In this work, the point mutations p.G238W and p.A294P in the *RDH5* gene were examined at molecular level.

At first the DNA of the *RDH5* and *RLBP1* gene was obtained by RT-PCR of human RNA. Next, the genes were first cloned into pCR[®]2.1-TOPO[®]-vectors and after that into pcDNA3.1+-expression vectors. The point mutations p.G238W and p.A294P were inserted into the *RDH5* gene by mutagenesis PCR. The heterologous expression of the wild-type genes and the mutated *RDH5* genes was tested in the human HEK293T cell line. After the expression in the HEK293T cell line had been successful, the intracellular localization of the proteins was examined in the HeLa cells.

The intracellular localization of the mutated RDH5 was compared with the localization of the wild-type RDH5. Both the RDH5 mutants and the wild-type RDH5 showed a perinuclear accentuated, uniquely fine spotted pattern. This was compatible with the localization of the RDH5 in the endoplasmic reticulum. In contrast to the localization of the wild-type RDH5, the RDH5 mutants also showed an accumulation of immunopositive material in the plasma membrane. Due to this, it was assumed, that the RDH5 mutants were preferentially localized in the plasma membrane and the retinosomes. The production of the retinosomes seemed to be increased. Furthermore, the intracellular localization of the wild-type RDH5 and the RDH5 mutants was compared to the localization of RLBP1. The intracellular localization of the RLBP1

showed a perinuclear accentuated, netlike distribution pattern, which was assigned to the cytoskeleton. Because of the overlapping intracellular localization it can be considered possible that there is an interaction between the wild-type RDH5 and the RLBP1 as well as between the RDH5 mutants and the RLBP1, which takes place at the endoplasmic reticulum.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
ABCA4	ATP-bindender Kassettentransporter der Untergruppe A, Nummer 4
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
APS	Ammoniumpersulfat
ARAT	Acyl-CoA-Retinol-Acyltransferase
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BGH	Bovine-Growth-Hormon
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Zweifach positiv geladenes Calcium
CHO	Chinese Hamster Ovary
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalievirus
CoA	Coenzym A
COS	Zelllinie, die aus der Niere der Grünen Meerkatze stammt und genetisches SV40-Material trägt.
CRAIBP	zelluläres Retinaldehyd-bindendes Protein
CRBPI	zelluläres Retinol-bindendes Protein Typ I
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol

dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DOTMA	N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Grün fluoreszierendes Protein
EBP50	ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-bindendes Phosphoprotein 50
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERG	Elektroretinogramm
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
et al.	et alii
FA	Fundus albipunctatus
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
G _α -GTP	α-Untereinheit des G-Proteins mit gebundenem Guanosintriphosphat
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GMP	Guanosinmonophosphat

G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HEK	Human Embryonic Kidney
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HSV-TK	Herpes simplex virus-Thymidinkinase
IgG	Immunglobulin G
IRBP	Interphotorezeptor-Retinoid-bindendes Protein
K ⁺	Einfach positiv geladenes Kalium
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Broth
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
M	Molare Masse
µg	Mikrogramm
min	Minute
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
ms	Millisekunde
Na ⁺	Einfach positiv geladenes Natrium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Zelldichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDE6	Phosphodiesterase 6
PFA	Paraformaldehyd
pmol	Pikomol
RBP	Retinol-bindendes Protein
RBP1	Retinol-bindendes Protein 1
RBP4	Retinol-bindendes Protein 4
RDH5	11-cis-Retinaldehydrogenase 5
RLBP1	Retinaldehyd-bindendes Protein 1
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	Retinitis pigmentosa
RPA	Retinitis punctata albescens
RPE	Retinales Pigmentepithel
RPE65	spezifisches 65 kDa Protein im retinalen Pigmentepithel
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SV40	Simian virus 40
T	Thymidin
Taq	Thermus aquaticus
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

U	Unit
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	volume to volume
w/v	weight to volume
z.B.	zum Beispiel

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes <i>RDH5</i>	58
Abbildung 3.2:	Vektorkarte des pT-RDH5-Vektors	59
Abbildung 3.3:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT-RDH5 mit dem Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	60
Abbildung 3.4:	Agarose-Gelelektrophorese des <i>EcoRI</i> -Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT-RDH5-8	61
Abbildung 3.5:	Vektorkarte des pcDNA3.1(+) <i>RDH5</i> -Vektors	62
Abbildung 3.6:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> mit dem Restriktionsenzym <i>XbaI</i> .	63
Abbildung 3.7:	Agarose-Gelelektrophorese des RT-PCR-Produktes <i>RLBP1</i>	65
Abbildung 3.8:	Vektorkarte des pT- <i>RLBP1</i> -Vektors	66
Abbildung 3.9:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT- <i>RLBP1</i> mit dem Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	67
Abbildung 3.10:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pT- <i>RLBP1</i> -6	68
Abbildung 3.11:	Vektorkarte des pcDNA3.1+ <i>RLBP1</i> -Vektors:	69
Abbildung 3.12:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+ <i>RLBP1</i> mit dem Restriktionsenzym <i>SmaI</i>	70
Abbildung 3.13:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+ <i>RLBP1</i> mit dem Restriktionsenzym <i>SmaI</i>	71
Abbildung 3.14:	Agarose-Gelelektrophorese des Mutagenese-PCR-Produkts der Plasmid-DNA pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> -G238W.....	72
Abbildung 3.15:	Vektorkarte des pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> -G238W-Vektors	74
Abbildung 3.16:	Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> -G238W mit den Restriktionsenzymen <i>EcoRI</i> und <i>XbaI</i>	75
Abbildung 3.17:	Agarose-Gelelektrophorese des Mutagenese-PCR-Produkts der Plasmid-DNA pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> -A294P.	76
Abbildung 3.18:	Vektorkarte des pcDNA3.1+ <i>RDH5</i> -A294P-Vektors.....	77

Abbildung 3.19: Agarose-Gelelektrophorese des Restriktionsverdaus der Vektor-DNA pcDNA3.1+RDH5-A294P mit dem Restriktionsenzym <i>EcoRI</i>	78
Abbildung 3.20: Immunfärbung des Western-Blots zur Detektion von RLBP1	80
Abbildung 3.21: Immunfärbung des Western-Blots zur Detektion der Wildtyp-RDH5 sowie der Mutanten RDH5 ^{G238W} und RDH5 ^{A294P}	82
Abbildung 3.22: Fluoreszenzmarkierung des Wildtyp-RLBP1 in ARPE-19-Zellen....	83
Abbildung 3.23: Fluoreszenzmarkierung der Wildtyp-RDH5 in ARPE-19-Zellen.....	84
Abbildung 3.24: Fluoreszenzmarkierung des in HeLa-Zellen heterolog exprimierten Wildtyp-RLBP1	85
Abbildung 3.25: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten Wildtyp-RDH5	87
Abbildung 3.26: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5 ^{G238W}	88
Abbildung 3.27: Fluoreszenzmarkierung der heterolog in HeLa-Zellen exprimierten RDH5 ^{A294P}	89

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1:	Verwendete Geräte	22
Tabelle 2.2:	Verwendete Materialien	23
Tabelle 2.3:	Verwendete Chemikalien	24
Tabelle 2.4:	Verwendete Enzyme	25
Tabelle 2.5:	Verwendete Primer	25
Tabelle 2.6:	Verwendete Vektoren und Plasmide	26
Tabelle 2.7:	Verwendete Größenmarker	28
Tabelle 2.8:	Verwendete Antikörper	28
Tabelle 2.9:	Verwendete Bakterienzellen	31
Tabelle 2.10:	Verwendete Zelllinien	31
Tabelle 2.11:	Verwendete Reagenziensysteme und Kits	32
Tabelle 2.12:	PCR-Bedingungen	35
Tabelle 2.13:	Mutagenese-PCR-Bedingungen	47
Tabelle 3.1:	Konzentration der Proteinextrakte nach Expression der RDH5-Plasmidklone in HEK293T-Zellen.	81

10 Literaturverzeichnis

Amengual J, Golczak M, Palczewski K, Lintig J (2012)

Lecithin: retinol acyltransferase is critical for cellular uptake of vitamin A from serum retinol-binding protein.

The Journal of biological chemistry. 287:24216-24227.

Berson EL (1993)

Retinitis pigmentosa. The Friedenwald lecture.

Investigative ophthalmology & visual science. 34:1659-1675.

Bhattacharya SK, Wu Z, Jin Z, Yan L, Miyagi M, West K, Nawrot M, Saari JC, Crabb JW (2002)

Proteomic approach to identification of a mammalian visual cycle protein complex [Internet]. Online im Internet: URL:

http://vision.lerner.ccf.org/eye/crabb/documents/sanjoy_arvo.pdf

[Stand: 05.10.2013].

Bittner M, Kupferer P, Morris CF (1980)

Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets.

Analytical Biochemistry. 102:459-471.

Bjerrum OJ, Selmer JC, Lihme A (1987)

Native immunoblotting: Transfer of membrane proteins in the presence of non-ionic detergent.

Electrophoresis. 8:388-397.

Bonilha V, Bhattacharya SK, West KA, Crabb JS, Sun J, Rayborna ME, Nawrot M, Saari JC, Crabb JW (2004)

Support for a proposed retinoid-processing protein complex in apical retinal pigment epithelium.

Experimental eye research. 79:419-422.

Boström P, Rutberg M, Ericsson J, Holmdahl P, Andersson L, Frohman MA, Borén J, Olofsson SO (2005)

Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation.

Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology. 25:1945-1951.

Bradford MM (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Analytical Biochemistry. 72:248-254.

Bridges CDB (1976)

Vitamin A and the role of the pigment epithelium during bleaching and regeneration of rhodopsin in the frog eye.
Experimental eye research. 22:435-455.

Brown DA (2001)

Lipid droplets: Proteins floating on a pool of fat.
Current Biology. 11:R446-R449.

Brown TA (2007)

Genome und Gene.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 43.

Bunt-Milam AH, Saari JC (1983)

Immunocytochemical localization of two retinoid-binding proteins in vertebrate retina.
The Journal of Cell Biology. 97:703-712.

Burns ME, Lamb TD (1993)

Visual transduction by rod and cone photoreceptors. *The visual Neuroscience*, 215-233 [Internet]. Online im Internet: URL:
[http://burnslab.ucdavis.edu/publications/Burns,%20M.E.%20and%20Lamb,%20T.D.%20\(2003\).%20%20Visual%20Transduction%20by%20Rod%20and%20Cone%20Photoreceptors%20In%20Visual%20Neurosciences.pdf](http://burnslab.ucdavis.edu/publications/Burns,%20M.E.%20and%20Lamb,%20T.D.%20(2003).%20%20Visual%20Transduction%20by%20Rod%20and%20Cone%20Photoreceptors%20In%20Visual%20Neurosciences.pdf)
[Stand: 06.10.2013].

Burstedt MSI, Sandgren O, Holmgren G, Forsman-Semb K (1999)

Bothnia dystrophy caused by mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) on chromosome 15q26.
Investigative ophthalmology & visual science. 40:995-1000.

Bustamante JJ, Ziari S, Ramirez RD, Tsin ATC (1995)

Retinyl ester hydrolase and the visual cycle in the chicken eye.
The American journal of physiology. 269:1346-1350.

Carr RE (1974)

Congenital stationary nightblindness.
Transactions of the American Ophthalmological Society. 72:448-487.

Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994)
Green fluorescent protein as a marker for gene expression.
Science. 263:802-805.

Cideciyan A, Haeseleer F, Fariss RN, Aleman TS, Jang GF, Verlinde CLMJ,
Marmor MF, Jacobson SG, Palczewski K (2000)
Rod and cone visual cycle consequences of a null mutation in the 11-cis-retinol
dehydrogenase gene in man.
Visual neuroscience. 17:667-678.

Clark DP, Pazdernik NJ (2009)
Molekulare Biotechnologie.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 83-289.

Clark JM (1988)
Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic
and eucaryotic DNA polymerases.
Nucleic acids research. 16:9677-9686.

Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S (1996)
FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP).
Gene. 173:33-38.

Crabb JW, Gaur VP, Garwin GG, Marx SV, Chapline C, Johnson CM, Saari JC
(1991)
Topological and epitope mapping of the cellular retinaldehyde-binding protein
from retina.
The Journal of biological chemistry. 266:16674-16683.

D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS (2011)
Vitamin A metabolism: an update.
Nutrients. 3:63-103.

Das SR, Bhardwaj N, Kjeldbye H, Gouras P (1992)
Muller cells of chicken retina synthesize 11-cis-retinol.
The Biochemical journal. 285:907-913.

Driessen CAGG, Janssen BPM, Winkens HJ, van Vugt AHM, de Leeuw TLM,
Janssen JJM (1995)
Cloning and expression of a cDNA encoding bovine retinal pigment epithelial
11-cis retinol dehydrogenase.
Investigative ophthalmology & visual science. 36:1988-1996.

Driessen CAGG, Winkens HJ, Hoffmann K, Kuhlmann LD, Janssen BPM, Van Vugt AHM, Preston van Hooser J, Wieringa BE, Deutman AF, Palczewski K, Ruether K, Janssen JJM (2000)

Disruption of the 11-*cis*-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of *cis*-retinols and *cis*-retinyl esters.

Molecular and cellular biology. 20:4275-4287.

Driessen CAGG, Janssen BPM, Winkens HJ, Kuhlmann LD, Van Vugt AHM, Pinckers AJLG, Deutman AF, Janssen JJM (2001)

Null mutation in the human 11-*cis* retinol dehydrogenase gene associated with fundus albipunctatus.

Ophthalmology. 108:1479-1484.

Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM (1996)

ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties.

Experimental eye research. 62:155-169.

Edwards RB, Adler AJ (1994)

Exchange of retinol between IRBP and CRBP.

Experimental eye research. 59:161-170.

Edwards RB, Adler AJ (2000)

IRBP enhances removal of 11-*cis*-retinaldehyde from isolated RPE membranes.

Experimental eye research. 70:235-245.

Egger D, Bienz K (1994)

Protein (western) blotting.

Molecular Biotechnology. 1:289-305.

Eichers ER, Green JS, Stockton DW, Jackman CS, Whelan J, McNamara JA, Johnson GJ, Lupski JR, Katsanis N (2002)

Newfoundland rod-cone dystrophy, an early-onset retinal dystrophy, is caused by splice-junction mutations in *RLBP1*.

American journal of human genetics. 70:955-964.

Ellis DS, Heckenlively JR (1983)

Retinitis punctata albescens: fundus appearance and functional abnormalities.

Retina. 3:27-31.

- Farjo KM, Moiseyev G, Takahashi Y, Crouch RK, Ma J (2009)
The 11-cis-retinol dehydrogenase activity of RDH10 and its interaction with visual cycle proteins.
Investigative ophthalmology & visual science. 50:5089-5097.
- Felgner P, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M (1987)
Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 84:7413-7417.
- Fishman GA, Roberts MF, Derlacki DJ, Grimsby JL, Yamamoto H, Sharon D, Nishiguchi KM, Dryja TP (2004)
Novel mutations in the cellular retinaldehyde-binding protein gene (RLBP1) associated with retinitis punctata albescens.
Archives of ophthalmology. 122:70-75.
- Fountoulakis M (1992)
Unfolding intermediates of the extracellular domain of the interferon γ receptor.
The Journal of biological chemistry. 267:7095-7100.
- Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT (1952)
Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium.
Cancer research. 12:264-265.
- Golczak M, Kiser PD, Lodowski DT, Maeda A, Palczewski K (2010)
Importance of membrane structural integrity for RPE65 retinoid isomerization activity.
The Journal of biological chemistry. 285:9667-9682.
- Gollapalli R, Rando RR (2003)
All-trans-retinyl esters are the substrates for isomerization in the vertebrate visual cycle.
Biochemistry. 42:5809-5818.
- Golovleva I, Bhattacharya S, Wu Z, Shaw N, Yang Y, Andrabi K, West KA, Burstedt MSI, Forsman K, Holmgren G, Sandgren O, Noy N, Qin J, Crabb JW (2003)
Disease-causing mutations in the cellular retinaldehyde binding protein tighten and abolish ligand interactions.
The Journal of biological chemistry. 278:12397-12402.

Gonzalez-Fernandez F, Kurz D, Bao Y, Newman S, Conway BP, Young JE, Han DP, Khani SC (1999)
11-cis retinol dehydrogenase mutations as a major cause of the congenital night-blindness disorder known as fundus albipunctatus.
Molecular vision. 5:41.

Goode BL, Drubin DG, Barnes G (2000)
Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons.
Current opinion in cell biology. 12:63-71.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977)
Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.
The Journal of general virology. 36:59-72.

Gränse L, Abrahamson M, Ponjavic V, Andréasson S (2001)
Electrophysiological findings in two young patients with Bothnia dystrophy and a mutation in the RLBP1 gene.
Ophthalmic genetics. 22:97-105.

Green MR, Sambrook J (2012)
Molecular cloning: a laboratory manual.
New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1622.

Hajali M, Fishman GA, Dryja TP, Sweeney MO, Lindeman M (2009)
Diagnosis in a patient with fundus albipunctatus and atypical fundus changes.
Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology. 118:233-238.

Hauri HP, Bucher K (1986)
Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution.
Analytical biochemistry. 159:386-389.

Hecht S, Haig C, Chase AM (1937)
The influence of light adaptation on subsequent dark adaptation of the eye.
The Journal of general physiology. 20:831-850.

Heckenlively J (1998)
Congenital stationary night blindness. In: Traboulsi EI, Hrsg. *Genetic Diseases of the Eye*.
New York: Oxford University Press, 389-396.

Heckenlively JR, Sparkes RS, Bateman JB (1991)

Molecular genetics of retinitis pigmentosa.

The Western journal of medicine. 155:388-399.

Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G, Galas DJ (1989)

A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction.

Nucleic acids research. 17:6545-6551.

Hirokawa N (1998)

Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.

Science. 279:519-526.

Hirose E, Inoue Y, Morimura H, Okamoto N, Fukuda M, Yamamoto S, Fujikado T, Tano Y (2000)

Mutations in the 11-*cis* retinol dehydrogenase gene in Japanese patients with fundus albipunctatus.

Investigative ophthalmology & visual science. 41:3933-3935.

Hofmann KP, Pulvermüller A, Buczyk J, Van Hoosers P, Palczewski K (1992)

The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin.

The Journal of biological chemistry. 22:15701-15706.

Huang J, Possin DE, Saari JC (2009)

Localizations of visual cycle components in retinal pigment epithelium.

Molecular vision. 15:223-234.

Humbert G, Delettre C, Sénéchal A, Bazalgette C, Barakat A, Bazalgette C, Arnaud C, Lenaers G, Hamel CP (2006)

Homozygous deletion related to alu repeats in RLBP1 causes retinitis punctata albescens.

Investigative ophthalmology & visual science. 47:4719-4724.

Imanishi Y, Batten ML, Piston DW, Baehr W, Palczewski K (2004a)

Noninvasive two-photon imaging reveals retinyl ester storage structures in the eye.

The Journal of cell biology. 164:373-383.

Imanishi Y, Gerke V, Palczewski K (2004b)

Retinosomes: new insights into intracellular managing of hydrophobic substances in lipid bodies.

The Journal of cell biology. 166:447-453.

Iannaccone A, Tedesco SA, Gallaher KT, Yamamoto H, Charles S, Dryja TP (2007)

Fundus albipunctatus in a 6-year old girl due to compound heterozygous mutations in the RDH5 gene.

Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology. 115:111-116.

Jansohn M, Rothhämel S (2012)

Gentechnische Methoden. 5. Auflage.

Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1-2.

Jones G, Crouch RK, Wiggert B, Cornwall MC, Chader GJ (1989)

Retinoid requirements for recovery of sensitivity after visual-pigment bleaching in isolated photoreceptors.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 86:9606-9610.

Kapuscinski J (1995)

DAPI: a DNA-specific fluorescent probe.

Biotechnic and histochemistry. 70:220-233.

Kaschulaa CH, Jina M, Desmond-Smitha NS, Travis GH (2006)

Acyl CoA:retinol acyltransferase (ARAT) activity is present in bovine retinal pigment epithelium.

Experimental eye research. 82:111-121.

Katsanis N, Shroyer NF, Lewis RA, Cavender JC, Al-Rajhi AA, Jabak M, Lupski JR (2001)

Fundus albipunctatus and retinitis punctata albescens in a pedigree with an R150Q mutation in RLBP1.

Clinical genetics. 59:424-429.

Kim TS, Maeda A, Maeda T, Heinlein C, Kedishvili N, Palczewski K, Nelson PS (2005)

Delayed dark adaptation in 11-cis-retinol dehydrogenase-deficient mice.

The Journal of biological chemistry. 280:8694-8704.

Kuroiwa S, Kikuchi T, Yoshimura N (2000)

A novel compound heterozygous mutation in the RDH5 gene in a patient with fundus albipunctatus.

American journal of ophthalmology. 130:672-675.

Kyhse-Andersen J (1984)

Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.

Journal of biochemical and biophysical methods. 10:203-209.

Lamb TD, Pugh EN (2004)

Dark adaptation and the retinoid cycle of vision.

Progress in retinal and eye research. 23:307-380.

Lamb TD, Pugh EN (2006)

Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration. The Proctor Lecture.

Investigative ophthalmology & visual science. 47:5138-5152.

Lämmli UK (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature. 227:680-685.

Langford GM (1995)

Actin- and microtubule-dependent organelle motors: interrelationships between the two motility systems.

Current opinion in cell biology. 7:82-88.

Lauber H (1910)

Die sogenannte Retinitis punctata albescens.

Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde. 48:133-148.

Lehman IR (1974)

DNA ligase: structure, mechanism, and function.

Science. 186:790-797.

Lidén M, Romert A, Tryggvason K, Persson B, Eriksson U (2001)

Biochemical defects in 11-cis-retinol dehydrogenase mutants associated with fundus albipunctatus.

The Journal of biological chemistry. 276:49251-49257.

- Lodish H, Berk A, Zipursky SL (2000)
Molecular Cell Biology. 4. Auflage. New York: W. H. Freeman. Lektion 18.1:
The Actin Cytoskeleton [Internet]. Online im Internet: URL:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21493/>
[Stand: 06.11.2013].
- Lodish H, Berk A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Bretscher A, Ploegh H
(2008)
Molecular Cell Biology. 6. Auflage.
New York: W.H. Freeman and Company, 713-777.
- Lorenz B, Preising M, Stieger K (2010)
Retinal blinding disorders and gene therapy - molecular and clinical aspects.
Current gene therapy. 10:350-370.
- Lottspeich F, Engels JW (2006)
Bioanalytik. 2. Auflage.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 744.
- Lottspeich F, Engels JW (2012)
Bioanalytik. 3. Auflage.
Berlin: Springer-Verlag, 740-742, 1000.
- Lucey BP, Nelson-Rees WA, Hutchins GM (2009)
Henrietta Lacks, HeLa cells, and cell culture contamination.
Archives of pathology & laboratory medicine. 133:1463-1467.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D (2009)
Der Experimentator: Immunologie. 3. Auflage.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 139-157.
- Marchuk D, Drumm M, Saulino A, Collins FS (1990)
Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of
unmodified PCR products.
Nucleic acids research. 19:1154.
- Marmorstein AD (2001)
The polarity of the retinal pigment epithelium.
Traffic. 2:867-872.

Mata NL, Tsin ATC (1998a)

Distribution of 11-cis LRAT, 11-cis RD and 11-cis REH in bovine retinal pigment epithelium membranes.

Biochimica et biophysica acta. 1394:16-22.

Mata NL, Villazana ET, Tsin ATC (1998b)

Colocalization of 11-cis retinyl esters and retinyl ester hydrolase activity in retinal pigment epithelium plasma membrane.

Investigative ophthalmology & visual science. 39:1312-1319.

Mata NL, Radu RA, Clemmons RS, Travis GH (2002)

Isomerization and oxidation of vitamin A in cone-dominant retinas: a novel pathway for visual-pigment regeneration in daylight.

Neuron. 36:69-80.

Mata NL, Ruiz A, Radu RA, Bui TV, Travis GH (2005)

Chicken retinas contain a retinoid isomerase activity that catalyzes the direct conversion of all-trans-retinol to 11-cis-retinol.

Biochemistry. 44:11715-11721.

Maw MA, Kennedy B, Knight A, Bridges R, Roth KE, Mani EJ, Mukkadan JA, Nancarrow D, Crabb JW, Denton MJ (1997)

Mutation of the gene encoding cellular retinaldehyd-binding protein in autosomal recessive retinitis pigmentosa.

Nature genetics. 17:198-200.

Mays RW, Beck KA, Nelson WJ (1994)

Organization and function of the cytoskeleton in polarized epithelial cells: a component of the protein sorting machinery.

Current opinion in cell biology. 6:16-24.

Miyake Y, Shiroyama N, Sugita S, Horiguchi M, Yagasaki K (1992)

Fundus albipunctatus associated with cone dystrophy.

The British journal of ophthalmology. 76:375-379.

Morimura H, Berson EL, Dryja TP (1999)

Recessive mutations in the *RLBPI* gene encoding cellular retinaldehyde-binding protein in a form of retinitis punctata albescens.

Investigative ophthalmology & visual science. 40:1000-1004.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J (1974)

Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*.

Biochemistry. 13:2656-2662.

Mühlhardt C (2009)

Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics. 6.Auflage.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 50-140.

Muniz A, Villazana-Espinoza ET, Thackeray B, Tsin ATC (2006)

11-cis ARAT activity in primary culture of chicken muller cells.
Biochemistry. 45:12265-12273.

Muniz A, Villazana-Espinoza ET, Hatch AL, Trevino SG, Allen DM,
Tsin ATC (2007)

A novel cone visual cycle in the cone-dominated retina.
Experimental eye research. 85:175-184.

Nakamura M, Hotta Y, Tanikawa A, Terasaki H, Miyake Y (2000)

A high association with cone dystrophy in fundus albipunctatus caused by
mutations of the RDH5 gene.
Investigative ophthalmology & visual science. 41:3925-3932.

Nawrot M, West K, Huang J, Possin D, Bretscher A, Crabb JW, Saari JC
(2004)

Cellular retinaldehyde-binding protein interacts with ERM-binding
phosphoprotein 50 in retinal pigment epithelium.
Investigative ophthalmology & visual science. 45:393-401.

Niwa Y, Kondo M, Ueno S, Nakamura M, Terasaki H, Miyake Y (2005)

Cone and rod dysfunction in fundus albipunctatus with RDH5 mutation: an
electrophysiological study.
Investigative ophthalmology & visual science. 46:1480-1485.

Noy N (2000)

Retinoid-binding proteins: mediators of retinoid action.
The Biochemical journal. 348:481-495.

Orban T, Palczewska G, Palczewski K (2011)

Retinyl ester storage particles (retinosomes) from the retinal pigmented
epithelium resemble lipid droplets in other tissues.
The Journal of biological chemistry. 286:17248-17258.

Parker RO, Fan J, Nickerson JM, Liou GI, Crouch RK (2009)

Normal cone function requires the interphotoreceptor retinoid binding protein.
The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for
Neuroscience. 29:4616-4621.

Parker RO, Crouch RK (2010)

Retinol dehydrogenases (RDHs) in the visual cycle.
Experimental eye research. 91:788-792.

Parker R, Wang JS, Kefalov VJ, Crouch RK (2011)

IRBP as the physiologically relevant carrier of 11-cis retinol in the cone visual cycle.

The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience. 31:4714-4719.

Preising MN, Lorenz B (2009)

Genetische Erkrankungen des retinalen Pigmentepithels.
Der Ophthalmologe: Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft. 106:311-319.

Radu RA, Hu J, Peng J, Bok D, Mata NL, Travis GH (2008)

Retinal pigment epithelium-retinal G protein receptor-opsin mediates light-dependent translocation of all-trans-retinyl esters for synthesis of visual chromophore in retinal pigment epithelial cells.

The Journal of biological chemistry. 283:19730-19738.

Rassow J, Deutzmann R, Netzker R, Hauser K (2012)

Duale Reihe Biochemie. 3. Auflage.
Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 720.

Reinhard T (2010)

Molekularbiologische Methoden.
Stuttgart: Eugen Ulmer Verlag, 195-216.

Rittenhouse J, Marcus F (1984)

Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at aspartyl-prolyl peptide bonds in sodium dodecyl sulfate-containing buffers.
Analytical biochemistry. 138:442-448.

Roberts RJ, Belfort M, Bestor T, Bhagwat AS, Bickle TA, Bitinaite J, Blumenthal RM, Degtyarev SK, Dryden DTF, Dybvig K, Firman K, Gromova ES, Gumport RI, Halford SE, Hattman S, Heitman J, Hornby DP, Janulaitis A, Jeltsch A, Josephsen J, Kiss A, Klaenhammer TR, Kobayashi I, Kong H, Krüger DH, Lacks S, Marinus MG, Miyahara M, Morgan RD, Murray NE, Nagaraja V, Piekarowicz A, Pingoud A, Raleigh E, Rao DN, Reich N, Repin VE, Selker EU, Shaw PC, Stein DC, Stoddard BL, Szybalski W, Trautner TA, Van Etten JL, Vitor JMB, Wilson GG, Xu S (2003)

A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes.

Nucleic acids research. 31:1805-1812.

Rodriguez KA, Tsin ATC (1989)

Retinyl esters in the vertebrate neuroretina.

The American journal of physiology. 256:255-258.

Romert A, Tuvendal P, Tryggvason K, Dencker L, Eriksson U (2000)

Gene structure, expression analysis, and membrane topology of RDH4.

Experimental cell research. 256:338-345.

Saari JC (2000)

Biochemistry of visual pigment regeneration: the Friedenwald lecture.

Investigative ophthalmology & visual science. 41:337-348.

Saari JC, Bredberg L (1982)

Enzymatic reduction of 11-cis-retinal bound to cellular retinal-binding protein.

Biochimica et biophysica acta. 716:266-272.

Saari JC, Bredberg DL, Farrell DF (1993)

Retinol esterification in bovine retinal pigment epithelium: reversibility of lecithin: retinol acyltransferase.

The Biochemical journal. 291:697-700.

Saari JC, Bredberg L, Noy N (1994)

Control of substrate flow at a branch in the visual cycle.

Biochemistry. 33:3106-3112.

Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J, Possin DE, Crabb JW (2001)

Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation.

Neuron. 29:739-748.

Saari JC, Crabb JW (2005)

Focus on molecules: cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP).
Experimental eye research. 81:245-246.

Saari JC, Nawrot M, Stenkamp RE, Teller DC, Garwin GG (2009)

Release of 11-cis-retinal from cellular retinaldehyde-binding protein by acidic lipids.
Molecular vision. 15:844-854.

Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA (1986)

Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences.
Science. 233:1076-1078.

Schatz P, Preising M, Lorenz B, Sander B, Larsen M, Eckstein C, Rosenberg T (2010)

Lack of autofluorescence in fundus albipunctatus associated with mutations in *RDH5*.
Retina. 10:1-10.

Shuman S (1994)

Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase.
The Journal of biological chemistry. 269:32678-32684.

Simon A, Hellman U, Wernstedt C, Eriksson U (1995)

The retinal pigment epithelial-specific 11-cis retinol dehydrogenase belongs to the family of short chain alcohol dehydrogenases.
The Journal of biological chemistry. 270:1107-1112.

Simon A, Romert A, Gustafson AL, McCaffery JM, Eriksson U (1999)

Intracellular localization and membrane topology of 11-cis retinol dehydrogenase in the retinal pigment epithelium suggest a compartmentalized synthesis of 11-cis retinaldehyde.
Journal of cell science. 112:549-558.

Strachan T, Read AP (2005)

Molekulare Humangenetik. 3.Auflage.
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 150-151.

Strauss O (2005)

The retinal pigment epithelium in visual function.
Physiological reviews. 85:845-881.

- Takahashi Y, Moiseyev G, Chen Y, Ma JX (2006)
The roles of three palmitoylation sites of RPE65 in its membrane association and isomerohydrolase activity.
Investigative ophthalmology & visual science. 47:5191-5196.
- Terasaki M, Chen LB, Fujiwara K (1986)
Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures.
The Journal of cell biology. 103:1557-1568.
- Thomas P, Smart TG (2005)
HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins.
Journal of pharmacological and toxicological methods. 51:187-200.
- Thompson DA, Gal A (2003)
Vitamin A metabolism in the retinal pigment epithelium: genes, mutations, and diseases.
Progress in retinal and eye research. 22:683-703.
- 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. 76:4350-4354.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1989)
Immunoblotting in the clinical laboratory.
Journal of clinical chemistry and clinical biochemistry. 27:495-501.
- Tryggvason K, Romert A, Eriksson U (2001)
Biosynthesis of 9-cis-retinoic acid in vivo.
The Journal of biological chemistry. 276:19253-19258.
- Tsien RY (1998)
The green fluorescent protein.
Annual review of biochemistry. 67:509-544.
- Van Soest S, Westerveld A, De Jong PTVM, Bleeker-Wagemakers EM, Bergen AAB (1999)
Retinitis pigmentosa: defined from a molecular point of view.
Survey of ophthalmology. 43:321-334.

Vogelstein B, Gillespie D (1979)

Preparative and analytical purification of DNA from agarose.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 76:615-619.

Wada Y, Abe T, Fuse N, Tamai M (2000)

A frequent 1085delC/insGAAG mutation in the *RDH5* gene in Japanese patients with fundus albipunctatus.

Investigative ophthalmology & visual science. 41:1894-1897.

Walther TC, Farese RV (2009)

The life of lipid droplets.

Biochimica et biophysica acta. 6:459-466.

Wang J, Chai X, Eriksson U, Napoli JL (1999)

Activity of human 11-cis-retinol dehydrogenase (Rdh5) with steroids and retinoids and expression of its mRNA in extra-ocular human tissue.

The Biochemical journal. 338:23-27.

Wang JS, Kefalov VJ (2011).

The cone-specific visual cycle.

Progress in retinal and eye research. 30:115-128.

Weiner MP, Costa GL, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer JC (1994)

Site-directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction.

Gene. 151:119-123.

Welte MA (2009)

Fat on the move: intracellular motion of lipid droplets.

Biochemical Society transactions. 37:991-996.

Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH (1999)

Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in *abcr* knockout mice.

Cell. 98:13-23.

Wenzel A, Oberhauser V, Pugh EN, Lamb TD, Grimm C, Samardzija M, Fahl E, Seeliger MW, Remé CE, von Lintig J (2005)

The retinal G protein-coupled receptor (RGR) enhances isomerohydrolase activity independent of light.

The Journal of biological chemistry. 280:29874-29884.

Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJN, Thorpe GHG (1979)
Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory.
Clinical chemistry. 25:1531-1546.

Wu Z, Hasan A, Liu T, Teller DC, Crabb JW (2004)
Identification of CRALBP ligand interactions by photoaffinity labeling,
hydrogen/deuterium exchange, and structural modeling.
The Journal of biological chemistry. 279:27357-27364.

Wu Z, Bhattacharya SK, Jin Z, Bonilha VL, Liu T, Nawrot M, Teller DC, Saari
JC, Crabb JW (2006)
CRALBP ligand and protein interactions.
Advances in experimental medicine and biology. 572:477-483.

Yamamoto H, Simon A, Eriksson U, Harris E, Berson EL, Dryja TP (1999)
Mutations in the gene encoding 11-cis retinol dehydrogenase cause delayed
dark adaptation and fundus albipunctatus.
Nature genetics. 22:188-191.

Yamamoto H, Yakushijin K, Kusuhara S, Escano MFT, Nagai A, Negi A
(2003)
A novel *RDH5* gene mutation in a patient with fundus albipunctatus presenting
with macular atrophy and fading white dots.
American journal of ophthalmology. 136:572-574.

Zhou X, Huang L (1994)
DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine:
characterization and mechanism of action.
Biochimica et biophysica acta. 1189:195-203.

Zimmerman WF (1976)
Subcellular distribution of 11-cis retinol dehydrogenase activity in bovine
pigment epithelium.
Experimental eye research. 23:159-164.

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. Markus Preising für die Vergabe des Themas und die hervorragende, stets zuverlässige Betreuung meiner Doktorarbeit bedanken. Insbesondere bedanke ich mich für die ausgezeichnete Unterstützung durch das zeitaufwendige Korrekturlesen sowie die Hilfestellung bei der Laborarbeit und die ständige Diskussionsbereitschaft bezüglich der Auswertung der Ergebnisse.

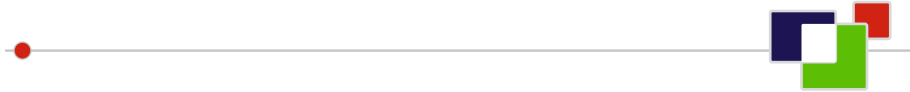
Frau Prof. Dr. Birgit Lorenz danke ich für die freundliche Bereitstellung der Laborräume.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Annabella Janise, die mich in all den Jahren nicht nur durch ihr enormes Fachwissen, sondern auch ganz besonders aufgrund ihrer stets ermutigenden, freundlichen und hilfsbereiten Art sehr unterstützt hat. Vielen herzlichen Dank für die große Hilfe bei der Laborarbeit und deine motivierenden Worte!

Ein großer Dank auch an Herrn Tobias Wimmer für die geduldige Einarbeitung in die Labormethoden.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Ophthalmologie für die gute Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft, den Erfahrungsaustausch und die vielen wertvollen Anregungen und konstruktiven Ratschläge, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Außerdem danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für ihren Rückhalt und die immer gegenwärtige Unterstützung während des Studiums und der Durchführung dieser Arbeit.



édition scientifique

VVB LAUFERSWEILER VERLAG

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFBENGRING 15
D-35396 GIESSEN**

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6262-0



9 783835 196262 0